



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CAMILA DO NASCIMENTO BODACK

**Análises das Diferentes Metodologias de Contagem de Reticulócitos e seu Impacto na
Interpretação Laboratorial dos Resultados**

Florianópolis

2015

CAMILA DO NASCIMENTO BODACK

Análises das Diferentes Metodologias de Contagem de Reticulócitos e seu Impacto na Interpretação Laboratorial dos Resultados

Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para conclusão da Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (ACL 5142).

Orientador (a):

Prof.^a Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes.

Florianópolis

2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Omar Bodack e Maria Aparecida do Nascimento Bodack, pelo amor, carinho, apoio e ensinamentos ao longo da minha vida. Amo vocês mais do que tudo.

Ao meu companheiro, Wellington Rodrigues de Olivera, pelo amor, paciência e apoio nos momentos em que tive imensa dificuldade em superar, inclusive, não posso esquecer-me de agradecer as suas aulas de informática.

À minha orientadora, Ana Carolina Rabello de Moraes, por apoiar e acreditar em ideias que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, além de guiá-lo com profissionalismo, dedicação, carinho e compreensão.

Às minhas colegas de faculdade, Jéssica Daiane Rosa e Flávia Cardoso Amaral, por compartilharem momentos de alegria e tristeza, que, sem dúvidas, serviram de apoio em muitos momentos.

À secretária do curso de farmácia, Rosalba Otilia Zeferino Testi, pela amizade e apoio ao longo desses cinco anos.

Às avaliadoras, Maria Cláudia Santos da Silva e Solange Lúcia Blatt, pelas sugestões que contribuíram para o delineamento desse trabalho.

Às farmacêuticas do setor de hematologia, Adriana Scotti e Francieli Joaquim Dassoler, pelo apoio técnico e fornecimento de informações que foram essenciais para obtenção dos resultados.

Ao meu colega, Guilherme Augusto Rodrigues dos Santos, pela assessoria com termos da língua inglesa.

E a todas as pessoas que fizeram parte das minhas experiências pessoais e que, de alguma forma, tornaram oportunidades de ensino em experiências de verdadeiro aprendizado.

RESUMO

Anemia é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo das necessidades fisiológicas. A contagem de reticulócitos é capaz de avaliar a capacidade proliferativa da série eritróide da medula óssea e, portanto, classificar os indivíduos como portadores de anemias hiperproliferativas ou hipoproliferativas. Dessa forma, a contagem de reticulócitos é útil no processo de diagnóstico e acompanhamento do tratamento de indivíduos anêmicos. No entanto, existem diversas metodologias de contagem de reticulócitos, o que pode gerar resultados diferentes entre si. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo verificar se as diferentes metodologias de contagem de reticulócitos proporcionam interpretações e classificações laboratoriais divergentes. Para tanto, foram coletados resultados de exames realizados pelo setor de hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do Hospital Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) durante o período de janeiro de 2014 a março de 2015. As informações coletadas foram resultados de: contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito, contagem relativa de reticulócitos (CRR) e contagem absoluta de reticulócitos (CAR). A partir desses dados, foram calculados a contagem corrigida de reticulócitos (CCR) e o índice de produção de reticulócitos (IPR). Para determinar a concordância entre os resultados dos exames, foi utilizado o teste Kappa. As sensibilidades e especificidades foram calculadas pela Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) adotando-se como padrão ouro a CAR. Foram incluídos no estudo dados provenientes de 121 indivíduos anêmicos e 23 indivíduos clinicamente saudáveis. Os indivíduos clinicamente saudáveis apresentaram os seguintes resultados: CRR: $1,2 \pm 0,3$ %; CAR: $54,5 \pm 14,3/\text{mm}^3$; CCR: $1,1 \pm 0,3$ %; e IPR: $1,1 \pm 0,3$. Os indivíduos clinicamente saudáveis apresentaram resultados dentro dos valores de referência. Os resultados dos portadores de anemia foram: CRR: $17,1 \pm 28,5$ %; CAR: $450,3 \pm 732,7/\text{mm}^3$; CCR: $12,3 \pm 23$ %; e IPR $7,9 \pm 15,1$. Todos os métodos de contagem de reticulócitos tiveram concordância entre moderada e excelente ($P \leq 0,05$), sendo que a melhor concordância foi entre a CAR e o IPR (Coeficiente de Kappa = 0,851). Todas as metodologias apresentaram valor diagnóstico, com excelentes sensibilidades, especificidades e acurácia. O IPR foi a metodologia que apresentou melhor acurácia (área sob a curva - AUC = 0,991). Os resultados obtidos mostram que as diferentes metodologias de contagem de reticulócitos são concordantes. Dessa forma, a escolha de qual parâmetro reticulocitário será utilizado na clínica deve respeitar a doença de base que desencadeou a anemia e os motivos clínicos da solicitação dos exames.

Palavras chave: Anemia. Reticulócito. Índice de Produção de Reticulócitos.

ABSTRACT

Anemia is defined by World Health Organization (WHO) as a condition when the hemoglobin content in blood is under the physiologic needs. The reticulocyte count evaluates the proliferative status of bone marrow and is useful to classify individuals with hypoproliferative anemia or hyperproliferative anemia. Thus, reticulocyte count is useful on the process of diagnosing and following the clinical treatment of the individuals with anemia. However, several methods to count reticulocytes are available, and the different methods may represent different results. That being said, the present study had as goal to verify if the different methods of counting reticulocytes provide divergent interpretation and classification of the bone marrow proliferative status. Therefore, results of the exams were obtained from internal register of the hematological sector from the clinical analysis division of Polydoro Ernani the São Thiago Hospital comprehending the period from January of 2014 to March of 2015. The information collected was erythrocyte count, hemoglobin concentration, hematocrit, relative reticulocyte count (RRC) and absolute reticulocyte count (ARC). From the data obtained RPI and correct reticulocyte count (CRC) were calculated. Kappa concordance coefficient was used to determine the concordance between the different reticulocyte parameters. Sensibility and specificity were calculated by ROC (Receiver Operating Characteristic) curve using as gold standard ARC. Were included data obtained from 121 individuals with anemia, and 23 healthy individuals. The results obtained from healthy individuals were : RRC : $1,2 \pm 0,3$ %; ARC: $54,5 \pm 14,3/\text{mm}^3$; CRC: $1,1 \pm 0,3$ %; and RPI: $1,1 \pm 0,3$. The healthy individuals showed results between the reference range. The results from individuals with anemia: RRC: $17,1 \pm 28,5$ %; ARC $450,3 \pm 732,7/\text{mm}^3$; CRC: $12,3 \pm 23$ % and RPI $7,8 \pm 15,1$. All reticulocyte count methods had concordance between moderate to excellent ($P \leq 0,05$), and the best concordance occurs between ARC and RPI (Kappa = 0,851). All methods had good diagnosis value, with excellent sensibility, specificity and accuracy. RPI was the methodology that represents the best accuracy (Area Under the Curve - AUC = 0,991). The results represents that the different reticulocyte count agreed with each other, so, the choice of which reticulocyte parameter used must respect the etiology of the anemia and the clinical suspicion.

Key words: Anemia. Reticulocyte. Reticulocyte Production Index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principal mecanismo de produção de eritrócitos.	15
Figura 2. Fluxograma de classificação de anemias com base na produção percentual de reticulócitos e no volume corpuscular médio (VCM)	21
Figura 3. Reticulócitos corados por corante supravital azul de cresil brilhante.	24
Figura 4. Classificação em normo/hiproliferativo e hiperproliferativo segundo os resultados da CCR, CCR, CAR e IPR.	34
Figura 5. Comparação das curvas ROC.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores causais de anemia, segundo a ordem de importância.	17
Tabela 2. Principais métodos automatizados e os parâmetros reticulocitários avaliados.	22
Tabela 3. Tempo (em dias) de maturação dos reticulócitos de acordo com o hematócrito.....	30
Tabela 4. Valores de corte adotados para o IPR.....	31
Tabela 5. Resultados das contagens de reticulócitos de 23 doadores voluntários de sangue clinicamente saudáveis.	32
Tabela 6. Parâmetros reticulocitários de 121 amostras provenientes de portadores de anemia.	33
Tabela 7. Concordância entre as classificações em normo/hipoproliferativo e hiperproliferativo segundo as diferentes formas de expressar a contagem de reticulócitos.....	35
Tabela 8. Sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC das diferentes metodologias de contagem de reticulócitos, utilizando-se a CAR de reticulócitos como padrão ouro.	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais interferentes das contagens automatizadas de reticulócitos.	23
---------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASM	Anemia severa desencadeada por malária
AUC	Área sob a curva (do inglês: <i>Area Under the Curve</i>)
CAR	Contagem absoluta de reticulócitos
CCR	Contagem corrigida de reticulócitos
CEPSH	Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CRR	Contagem relativa de reticulócitos
DACL	Divisão de análises clínicas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EPO	Eritropoetina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HU	Hospital Universitário
IRC	Insuficiência renal crônica
IPR	Índice de produção de reticulócitos
ICSH	<i>International Council for Standardization in Hematology</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NIRC	Indivíduos não portadores de insuficiência renal crônica
MELD	Model For End-Stage Liver Disease
OMS	Organização das Nações Unidas
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos (do inglês: <i>Red Cell Distribution Width</i>)
RSF	Fator de tamanho das células vermelhas (do inglês: <i>Red Blood Cell Size Factor</i>)
TP-RNI	Tempo de protrombina - Razão Normalizada Internacional
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

VCM Volume corpuscular médio

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Eritrócitos	14
1.2 Anemia	16
1.3 Diagnóstico das anemias	18
1.3.1 Eritrograma	18
1.3.2 Reticulocitograma	20
2 JUSTIFICATIVA	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.1.1 Objetivos específicos	28
3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA	29
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Coleta dos dados	29
3.2.1 Dados provenientes de doadores de sangue clinicamente saudáveis	29
3.2.2 Dados provenientes de portadores de anemia	29
3.3 Contagem corrigida de reticulócitos (CCR)	30
3.4 Cálculo do índice de produção de reticulócitos (IPR)	30
3.5 Análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

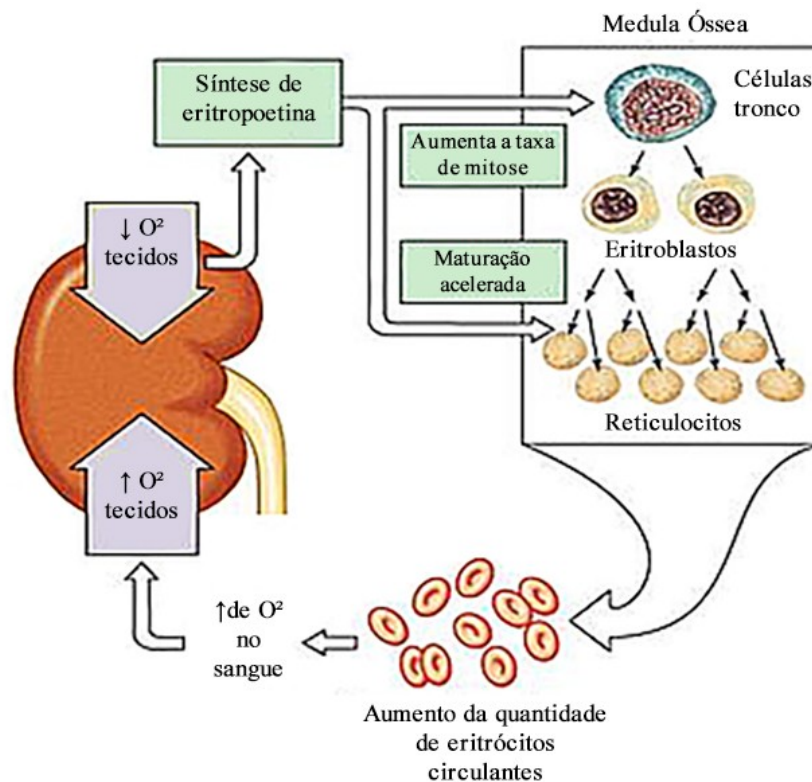
1.1 Eritrócitos

Além de participar ativamente da comunicação entre os tecidos, o sangue também desempenha funções que são essenciais para a vida, como transporte de nutrientes, distribuição de calor e de oxigênio e remoção de dióxido de carbono. A composição sanguínea básica é de aproximadamente 1 % de células pertencentes à série branca, 45 % de células pertencentes à série vermelha e 54 % de plasma, que é a porção fluída do sangue (ECKMAN; PLATT, 2006).

A cada dia, em torno de 1 % do total de eritrócitos de um adulto saudável, ou seja, aproximadamente 2×10^{11} eritrócitos, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. Para repor essas células, a medula óssea “libera” diariamente para a circulação quantidades semelhante de eritrócitos jovens ou reticulócitos (KOURY; RHODES, 2012).

Os eritrócitos são produzidos a partir de células tronco hematopoiéticas que, uma vez estimuladas por fatores de crescimento como a eritropoietina (EPO), se diferenciam em unidades formadoras de colônias que darão origem ao primeiro precursor eritroide identificável na medula óssea, o proeritroblasto (Figura 1). Por meio de sucessivas mitoses, o proeritroblasto se converte em eritroblasto basófilo, em eritroblasto policromático e, por fim, em eritroblasto ortocromático. A cada uma dessas etapas maturativas, os eritroblastos diminuem de tamanho, aumentam a condensação da cromatina e também aumentam o seu conteúdo de hemoglobina. Na etapa de eritroblasto ortocromático, a célula termina a produção do RNAm e realiza a expulsão do núcleo, originando os reticulócitos. Os reticulócitos ricos em RNAm terminam o seu processo de hemoglobinizacão e tornam-se eritrócitos maduros (HOFFBRAND, 2013).

Figura 1. Principal mecanismo de produção de eritrócitos.



Fonte: Adaptado de Universidade Internacional da Flórida. Disponível em: http://bioserv.fiu.edu/~walterm/human_online/blood1/blood_lecture.htm. Acesso em 16 de nov. de 2015.

A síntese de novos eritrócitos depende de muitos fatores, entre eles estão: o estímulo à eritropoiese pela síntese de EPO e a disponibilidade de elementos essenciais para produção de eritrócitos, como ferro, folato e vitamina B₁₂ (ROCHA et al., 2011).

No interior dos eritrócitos está a hemoglobina, essa é uma proteína especializada em realizar o transporte de O₂ e CO₂. Por serem ricos em hemoglobina, os eritrócitos são células especializadas nas trocas gasosas entre os tecidos e o meio ambiente, consequentemente, essas células são essenciais na regulação do pH no organismo (Despopouols; Silbernagl, 2003, apud MIRZADEH et al., 2010). As hemácias captam oxigênio fornecido pelos pulmões através de seus grupamentos que contém ferro (grupamento heme) que compõem a hemoglobina. Dessa forma, uma consequência da queda da concentração de hemoglobina é a diminuição da oxigenação dos tecidos, o que gera algum grau de hipóxia no organismo. Essa baixa tensão de oxigênio é detectada pelos rins, que aumentam a produção de EPO, o qual estimula a eritropoiese na medula óssea. Embora a hipóxia tecidual seja crucial para que

fisiologicamente o mecanismo de síntese renal de EPO ocorra, diversos são os fatores que podem também influenciar na produção e/ou distribuição desse hormônio no organismo (BUTTHEP et al., 2015). Altas concentrações de EPO são observadas no plasma de indivíduos portadores de anemia aplásica, e alterações bruscas nas concentrações plasmáticas de EPO ocorrem após sessões de quimioterapia, durante suplementação com vitamina B₁₂ e reposição de ferro (BIRGEGARD; SIMONSSON; WIDE, 1989; SCHAPIRA et al., 1990; BEGUIN; CAZZOLA, 1992; CAVIL; KENDALL; NORFOLK, 1992; DAS et al., 1992; SCHREZENMEIER et al., 1994).

1.2 Anemia

A palavra anemia deriva do grego *anaimia*, que significa “sem sangue” (ECKMAN; PLATT, 2006). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define a anemia como “a condição na qual a concentração de hemoglobina no sangue está abaixo dos valores de referência”, sendo considerados anêmicos homens com dosagens de hemoglobina inferiores a 13 g/dL e mulheres com dosagens inferiores a 12 g/dL (OMS, 2008).

No período entre 1993 e 2005, 24,8 % da população mundial era portadora de algum tipo de anemia. No mesmo período, a prevalência de anemia entre os 35 países que compõem a América era de 58 %, sendo que a população mais afetada eram as crianças pré-escolares de até cinco anos de idade. No Brasil, a prevalência de anemia é acima de 40 % em diferentes estados. Estudos realizados com crianças das cidades de Criciúma, no estado de Santa Catarina, e de Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul, mostraram que até 50 % das crianças dessas cidades são portadoras de anemia (OPAS, 2002; OMS, 2008, apud MARTINS, 2011; COSTA; JOÃO; PINTO, 2008). Na cidade de Florianópolis, Massucheti (2007) constatou que, no ano de 2003, a prevalência de anemia entre mulheres grávidas atendidas pela rede pública de saúde do município era de 24,7 %, e que no ano de 2004 essa prevalência reduziu para 18,4 %. A diminuição dessa prevalência foi atribuída à implantação de medidas de saúde pública com foco na prevenção de anemias carenciais, que regulamentaram, no ano de 2002, a suplementação de farinhas com ferro e ácido fólico (UNICEF, 1999; OMS, 2001 apud MASSUCHETI, 2007; BERNARDI; FILHO; JORDÃO, 2009).

Existem três principais mecanismos que favorecem o desenvolvimento da anemia: aumento na taxa de destruição dos eritrócitos, produção insuficiente de novos eritrócitos, e perdas crônicas ou agudas de sangue (Tabela 1) (JONKER; VAN HENS BROEK, 2014).

Tabela 1. Fatores causais de anemia, segundo a ordem de importância.

Causas Diretas	Componentes em Ordem de Importância
Produção insuficiente ou anormal de hemoglobina	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa ingestão alimentar e/ou absorção de ferro · Baixa ingestão alimentar e/ou absorção de vitaminas (A, B₁₂, folato, B₆, C, e B₂) · Aumento das necessidades de nutrientes devido a crescimento acelerado ou desencadeado por agentes infecciosos (ex. HIV) · Outras doenças infecciosas (ex. Tuberculose, malária) · Doenças genéticas (ex. Talassemia)
Destruição excessiva de hemoglobina	<ul style="list-style-type: none"> · Malária
Perda excessiva de hemoglobina	<ul style="list-style-type: none"> · Infecções causadas por parasitos (ex. Helmintos) · Infecções virais ou bacterianas (ex. Úlcera péptica, gastrite, e diarreia) · Reprodução (ex. Excessivas perdas sanguíneas durante períodos menstruais, parto e/ou pós-parto, e curto período entre gestações)
Causas Contribuintes	Componentes
Hábitos e conhecimentos	<ul style="list-style-type: none"> · Pouca ou nenhuma noção sobre anemia, suplementação férrica, e outras formas de prevenção da anemia e suas intervenções · Presença de tabus e crenças culturais · Práticas alimentares restritivas, incluindo hábitos alimentares deficientes na infância e introdução tardia de determinados alimentos · Baixa adesão aos bons hábitos recomendados
Meio ambiente	<ul style="list-style-type: none"> · Contaminação por metais pesados
Acesso a serviços	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa frequência a atendimento pré-natal e outros serviços que forneçam suplementação de ferro · Ausência de pessoas treinadas para controlar a perda de sangue durante o parto · Ausência de serviços sanitários que reduzam as infestações por helmintos · Ausência de métodos para prevenir a transmissão de malária
Pobreza	<ul style="list-style-type: none"> · Baixa renda para adquirir alimentos com taxas adequadas de ferro ou obter suplementos de ferro, tratamento de malária, sapatos para prevenir a transmissão de helmintos e outros serviços preventivos.

Fonte: MEDS/PHNI. The Monitoring, Evaluation, and Design Support/ The Population, Health and Nutrition Information. Anemia Prevention and Control: What Works. Part I: Program Guidance. EUA, 2003 apud MASSUCHETTI, 2007. Adaptada de MASSUCHETTI, 2007.

O modo orgânico de combater a anemia/hipóxia tecidual é por meio de uma eritropoiese eficaz. Para que a eritropoiese ocorra de forma eficiente, quatro fatores devem estar presentes: o estímulo para produção de eritrócitos na medula óssea, a habilidade das células precursoras hematopoiéticas de responderem corretamente ao estímulo, a disponibilidade de nutrientes essenciais para a síntese de novos eritrócitos e o tempo de vida

útil adequado dessas células (LANE; VIETH, 2014). O aumento da eritropoiese tem como objetivo elevar a concentração da hemoglobina circulante, e, conseqüentemente, reequilibrar as trocas gasosas nos tecidos (FAILACE, 2009; HOFFBRAND, 2013). Quando o aumento da produção de eritrócitos ocorre adequadamente, a anemia é classificada como hiperproliferativa. São exemplos dessa classe de anemias, as anemias hemolíticas e as decorrentes de sangramentos agudos e crônicos. Contudo, em muitos casos de anemia, essa resposta medular à EPO não acontece, ou ocorre de forma inadequada. Essas anemias são classificadas como hipoproliferativas e geralmente decorrem de aplasia medular e carências nutricionais (GARCÍA, 2006; OMS, 2008; FAILACE, 2009).

Dentro desse contexto, uma das abordagens mais práticas frente a um indivíduo portador de anemia é a avaliação da contagem do número de reticulócitos, uma vez que esta pode ser utilizada como indicativo de regeneração medular frente a um processo de anemia. De fato, a contagem de reticulócitos é um método tradicional de acompanhamento no diagnóstico, classificação e monitorização de pacientes com quadros de anemia (COSTA; JOÃO; PINTO, 2008).

1.3 Diagnóstico das anemias

1.3.1 Eritrograma

Como já mencionado, as anemias são um grupo heterogêneo de doenças que podem ser causadas por diferentes mecanismos. Essa etiologia variada faz com que seja necessária a realização de um conjunto de exames para elucidar o diagnóstico da anemia. Contudo, geralmente, o processo de diagnóstico da anemia se inicia pela análise do hemograma e, principalmente, do eritrograma.

O principal propósito da análise dos parâmetros laboratoriais em hematologia é caracterizar, a nível hematológico, a saúde do indivíduo. Os parâmetros que compõem um eritrograma completo são capazes de proporcionar informações suficientes para que seja possível estimar informações vitais para a saúde de uma pessoa. A dosagem de hemoglobina, o hematócrito (HCT) e a contagem de eritrócitos totais estimam a capacidade total de distribuição de oxigênio e retirada de gás carbônico dos tecidos (HIGGINS, 2015). O tamanho de uma hemácia é fornecido pelo parâmetro denominado volume corpuscular médio (VCM), que é utilizado para avaliar se as hemácias possuem, na sua maioria, volumes normais (80-99 fL). Se o VCM corresponder a um valor normal, as hemácias serão consideradas normócitos.

Se o VCM for elevado ou diminuído, considera-se que no hemograma estão presentes macrócitos e micrócitos, respectivamente. A hemoglobina corpuscular média (HCM) expressa a quantidade de hemoglobina que é encontrada por hemácia. Baixos valores de HCM podem indicar que existem anormalidades nas etapas de produção de hemoglobina (ex. hemoglobinopatias). A divisão da concentração de hemoglobina pelo HCT fornece a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), essa medida reflete o grau de saturação de hemoglobina pelas hemácias, sendo assim, esse parâmetro também costuma apresentar-se alterado em doenças que decorrem de alterações na síntese de hemoglobina. O CHCM é também uma ferramenta que auxilia na avaliação do grau de hipocromia das hemácias nas extensões sanguíneas. Quando baixos valores de CHCM estão presentes, considera-se que, provavelmente, a extensão possui algum grau de hipocromia. A amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) traduz, numericamente, a homogeneidade ou heterogeneidade no tamanho dos eritrócitos. A avaliação da intensidade da variação no tamanho dos eritrócitos possibilita obter a informação do grau de anisocitose presente na amostra, valores de RDW normais significam que as células possuem homogeneidade de tamanho, enquanto resultados elevados caracterizam uma população de eritrócitos com tamanhos diferentes entre si (GIGLIO; KALIKS, 2007; LANE; VIETH, 2014).

Nas anemias, podem ocorrer alterações na forma, tamanho e quantidade dos eritrócitos. Essas modificações estão diretamente relacionadas com a causa do processo anêmico e acabam por alterar os parâmetros que compõem o eritograma. Dessa forma, é possível e interessante para o processo de elucidação do diagnóstico classificar as anemias quanto à morfologia dos eritrócitos, o VCM, a HCM, a CHCM e a RDW (GARCÍA et al, 2006). As causas de anemia mais frequentemente relacionadas com valores de VCM, HCM e CHCM dentro da faixa de normalidade (anemias normocíticas/normocrômicas) são câncer, doença renal, invasão tumoral da medula óssea, hemorragia aguda, inflamação, anemia hemolítica adquirida, anemia falciforme e fase inicial da deficiência de ferro. Já as anemias por deficiência crônica de ferro, por hemorragia crônica, as talassemias e a anemia sideroblástica são geralmente relacionadas com valores de VCM, HCM e CHCM abaixo da faixa de normalidade (anemias microcíticas/hipocrômicas). As anemias que apresentam o VCM aumentado (anemias macrocíticas) têm como causas mais comuns as deficiências de vitamina B₁₂ e de folatos, a mielofibrose e as doenças hepáticas (BAIN; DACIE; LEWIS, 2012).

Um ponto crítico para a avaliação do eritograma é o entendimento de que o sangue é um tecido líquido que esta em constante renovação, fazendo com que os parâmetros

sanguíneos sofram variações ao longo de um dia. Essas variações biológicas são inerentes às células sanguíneas e nem sempre possuem significado clínico relevante. Exemplos de alterações normais que ocorre de forma permanente no sangue periférico são a redução gradativa do tamanho e da quantidade de hemoglobina dos eritrócitos ao longo da sua vida útil; ao final dos 110 - 120 dias de vida de um eritrócito, ocorre uma redução de até 20 % do seu volume total e uma redução em até 15 % da sua quantidade de hemoglobina (HIGGINS, 2015). O conhecimento das causas das oscilações dos parâmetros sanguíneos é uma ferramenta que tem aplicações diversas e uma das suas utilidades é auxiliar a reconhecer e classificar uma população, gerando valores de referência específicos para aquela população e reduzindo, assim, a chance de classificar os indivíduos de forma errônea.

Além das variações populacionais, também se deve levar em conta as variações que podem ocorrer devido à utilização de diferentes metodologias na realização do eritrograma e devido às variações entre analistas. Para que essas alterações não influenciem de forma negativa o resultado dos exames dos pacientes, é necessário que sejam obedecidos os critérios técnicos estabelecidos e que sejam realizados de forma permanente os controles de qualidade propostos tanto para os métodos que são automatizados quanto para os métodos manuais (LEONART, 2009 LANE; VIETH, 2014).

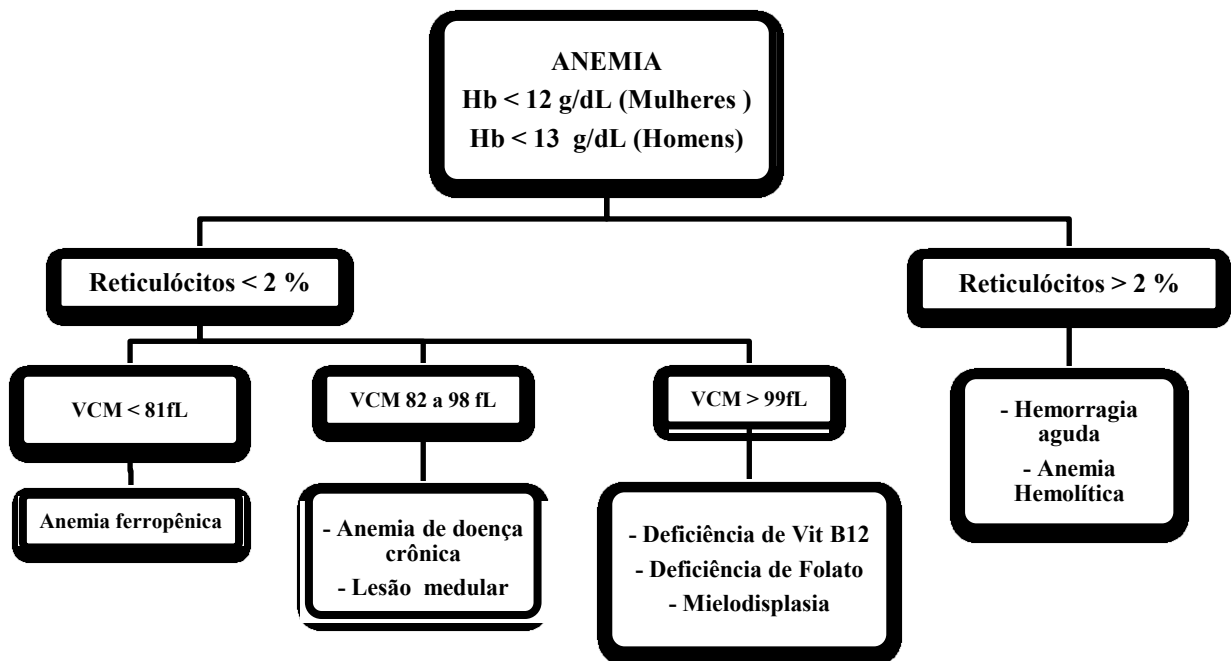
1.3.2 Reticulocitograma

Como já mencionado, os reticulócitos são os precursores dos eritrócitos que são encontrados no sangue periférico, desta forma, a análise dos reticulócitos é utilizada para esclarecer a situação proliferativa da medula óssea, servindo de informação relevante no diagnóstico de quadros de anemia, no acompanhamento de tratamentos, incluindo de transplantes, podendo ser utilizado também no acompanhamento das mais diversas doenças e/ou traumas físicos que possam afetar a produção de células da linhagem eritroide na medula óssea (NASCIMENTO, 2005).

Estudos utilizando ferro radioativo como marcador celular demonstraram que o tempo total de maturação dos reticulócitos é entre quatro e quatro dias e meio, sendo que durante três ou três dias e meio eles permanecem na medula óssea (HOUWEN, 1995). Após esse tempo, os reticulócitos são liberados para a corrente sanguínea, onde permanecem por um dia, até se diferenciarem em eritrócitos maduros. Em condições fisiológicas, os reticulócitos são encontrados no sangue periférico em quantidades que variam entre 0,8 % e 2,5 % (WINTROBE, 1998; GIGLIO; KALIKS, 2007; BAIN; DACIE; LEWIS, 2012; NAOUM,

2013). Nas anemias, os estímulos à proliferação que ocorrem podem induzir a liberação acelerada de reticulócitos para a corrente sanguínea (PIERRE, 2002). Dessa forma, contagens elevadas de reticulócitos no sangue periférico de portadores de anemia indicam que a medula óssea está sendo estimulada e, portanto, que ela se encontra em um estado hiperproliferativo. São exemplos de anemias hiperproliferativas as anemias hemolíticas e as causadas por hemorragias agudas. Inversamente, contagens de reticulócitos normais ou diminuídas em indivíduos anêmicos evidenciam um estado de hipoproliferação medular (Figura 2). Dentre as anemias hipoproliferativas, pode-se citar a anemia ferropênica, a anemia aplásica e a anemia de doença crônica (GIGLIO; KALIKS, 2007).

Figura 2. Fluxograma de classificação de anemias com base na produção percentual de reticulócitos e no volume corpuscular médio (VCM).



Hb – hemoglobina; Vit. B₁₂ – vitamina B₁₂. Adaptado de GIGLIO; KALIKS, 2007.

O conjunto dos exames reticulocitários compreende o reticulocitograma. Esses exames podem ser realizados por métodos manuais e/ou automatizados (Tabela 2). Os métodos automatizados podem fornecer um ou mais parâmetros reticulocitários.

Tabela 2. Principais métodos automatizados e os parâmetros reticulocitários avaliados.

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 I	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	Detecção de fluorescência	Cyanine (Sybr II) I	IRF
Horiba	ABX Pentra DX 120	Tecnologia de impedância e detecção de fluorescência	Thiazole orange	IRF, MRV, RETH%, RETM%, RETL%, IMM%, MFI%, CRC%
Siemens	ADVIA 2120	Absorbância e dispersão luminosa	Oxazine 750	IRF, MCVr, CHR, CHCMr, RDWr, HDWr, CHDWr, H-RET%, MRET%, L-RET%
Sysmex	XE 5000, XT 4000i	Fluorescência e dispersão luminosa	Polymethine	IRF, Ret-He, RBC-He, Micro-R, Macro-R, LScRBC, HScRBC, DELTA-He, RPI
	XE 2100, XT 2000i	Fluorescência e dispersão luminosa	Polymethine	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 esféricas; LHD: baixa densidade de hemoglobina; RSF: fator de tamanho das células vermelhas; MAF: fator de anemia microcítica; RETH, RETM, RETL: reticulócitos de alta, média e baixa fluorescência; IMM: reticulócitos imaturos; MFI: índice de fluorescência média; CRC: CCR; H-RET, M-RET, L-RET: reticulócitos de alta, média e baixa absorvância; 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. Tabela de PIVA, 2010; MIYAKE, 2013.

Os parâmetros que podem ser determinados pela automação costumam ser bastante específicos, proporcionando uma maior riqueza de detalhes quanto à situação proliferativa dos precursores eritroides. Além disso, se pode mencionar a rapidez e praticidade que são inerentes aos métodos automatizados. Embora a automação tenha inúmeras vantagens frente à contagem manual, algumas fontes de erros podem influenciar e prejudicar a contagem automatizada de reticulócitos (Quadro 1) (NASCIMENTO, 2005; PIVA et al., 2010; MYIAKE, 2013; WOLLMANN et al., 2013).

Quadro 1. Principais interferentes das contagens automatizadas de reticulócitos.

Elementos celulares	Inclusões celulares	Fatores diversos
Aglomerado de plaquetas Macroplaquetas Leucócitos Fragmento de leucócitos Eritroblastos	Howell Jolly Corpúsculo de Heinz Pappenheimer Parasitas (malária e babesia) Ponteados basófilos Corpos de inclusões de hemoglobina H	Autofluorescência (porfirinas, medicamentos) Paraproteínas Aglutininas Plaquetas/eritrócitos Hemólise

Adaptado de RILEY et al., 2001.

Apesar de a automação fornecer um maior número de informações quanto à situação proliferativa medular, o padrão ouro para a contagem de reticulócitos continua sendo, desde a década de 40, a contagem manual de reticulócitos (NASCIMENTO, 2005; PIVA et al., 2010; MYIAKE, 2011; WOLLMANN et al., 2013).

Para quantificação manual dos reticulócitos, se utiliza a coloração supravital, que pigmenta os vestígios de RNA presentes nos reticulócitos, possibilitando distingui-los dos eritrócitos maduros (Figura 3). Ao avaliar a quantidade de retículos de RNA que foram corados, também se pode determinar o grau de maturidade desses, quanto mais grânulos são corados, mais imaturo é o reticulócito, por outro lado, reticulócitos com poucos grânulos são considerados maduros (WINTROBE, 1998). Como qualquer método manual, a contagem relativa de reticulócitos (CRR) é mais susceptível a erros e variações. Segundo Riley et al. (2001), muitos fatores estão relacionados com a maior chance de erro nas contagens de reticulócitos, entre os fatores pode-se mencionar: erro no material coletado, transporte e estocagem inadequados do material biológico, subjetividade inter-indivíduos sobre as formas morfológicas dos reticulócitos, quantidade insuficiente de células avaliadas, variações dos reagentes utilizados para a coloração das lâminas, uso de objetiva de aumento inadequado, e má qualidade da extensão sanguínea utilizada para a contagem, neste último caso, extensões inadequadas podem favorecer a aglomeração ou espalhamento excessivo de reticulócitos, o que irá resultar em contagens incorretas. Para evitar ou minimizar alguns desses erros, as contagens de reticulócitos devem ser realizadas em amostras que tenham sido coletadas em tubos com EDTA e que não tenham hemólise visível (RILEY et al., 2001). Além disso, é imprescindível que sejam seguidos os critérios morfológicos de identificação de reticulócitos,

evitando assim que alterações morfológicas como, por exemplo, eritrócitos com a presença de corpúsculo de Pappenheimer, Heinz ou Howell-Jolly não sejam confundidos com reticulócitos (NCCLS, 2004 apud SIMIONATTO et al, 2009; PIVA et al., 2010 MYIAKE, 2013). Com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade dos resultados, em 2004, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (atual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) e o *International Council for Standardization in Hematology* (NCCLS-ICSH) estipularam no documento H44-A2 que, para realizar a contagem manual de reticulócitos, deve-se utilizar a ocular de Miller, que padroniza a região de contagem dos reticulócitos (SIMIONATTO et al., 2009).

Figura 3. Reticulócitos corados por corante supravital azul de cresil brilhante.

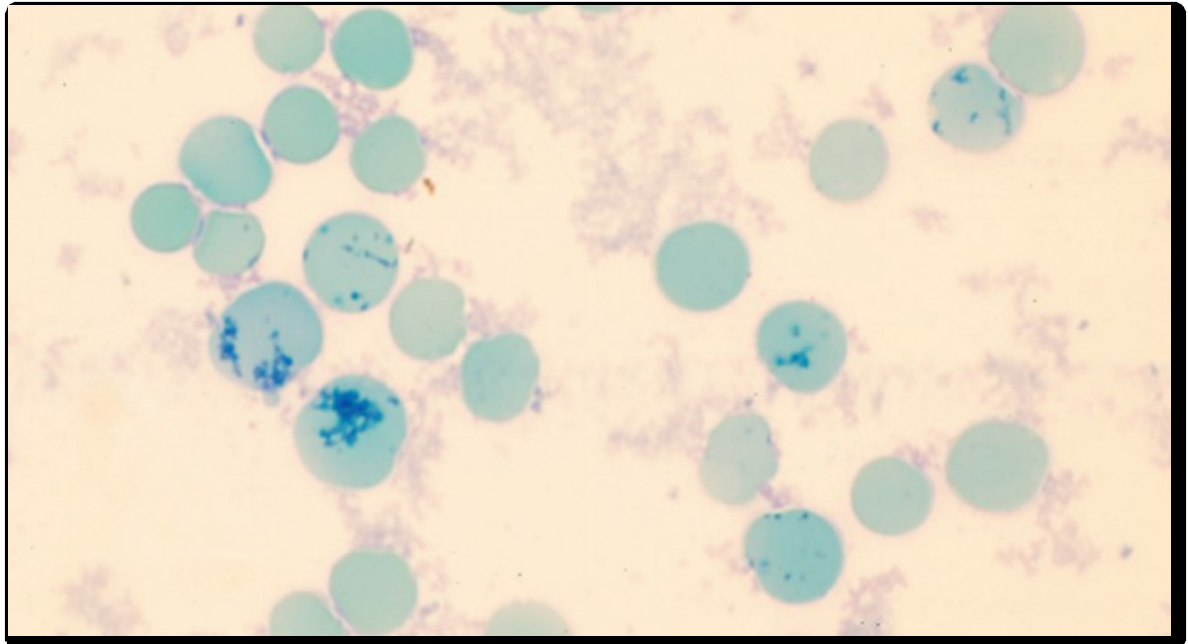


Imagem em aumento de 1000x por Dr. Binder, Wuppertal. Retirada de Sysmex – *Reticulocyte and Their Significance*. August 2010. Disponível em: http://sysmex.me/files/articles/Xtra_online_reticulocytes.pdf. Acesso em 16 de nov. 2015.

Apesar de avaliar a situação proliferativa da medula óssea, a CRR não é capaz de avaliar de forma criteriosa essa capacidade proliferativa, pois é uma expressão direta do número de reticulócitos observados, não levando em conta o grau de anemia da pessoa e nem o maior tempo de permanência dos reticulócitos em sangue periférico. Para melhorar a percepção da capacidade proliferativa da medula óssea, pode-se aplicar métodos e cálculos de correção da CRR. A contagem absoluta de reticulócitos (CAR) corrige a contagem de reticulócitos pelo grau de anemia, desta forma, ela fornece uma avaliação mais aprimorada do

que a CRR. A contagem de reticulócitos também pode ser corrigida com base no volume corpuscular dos eritrócitos (contagem corrigida de reticulócitos - CCR), para tanto, utiliza-se o HCT (MYIAKE, 2013).

Em indivíduos gravemente anêmicos, os reticulócitos podem ser liberados da medula óssea não só de forma acelerada, mas também precoce. Esses reticulócitos liberados prematuramente permanecem na corrente sanguínea por um período superior a 24 horas, e podem circular por até três dias. Esse aumento do tempo de permanência na corrente sanguínea pode levar a contagens de reticulócitos superestimadas, mesmo quando se aplicam os cálculos de correção, e, conseqüentemente, produzir uma falsa impressão de que a medula óssea aumentou a eritropoiese para repor a concentração de hemoglobina circulante (PIERRE, 2002). Com a finalidade de corrigir a problemática provocada pela liberação precoce e acelerada de reticulócitos e o elevado período de maturação no sangue periférico desses reticulócitos, foi desenvolvido o índice de produção de reticulócitos (IPR) que para ser calculado leva em conta o grau de anemia do indivíduo e o tempo de circulação do reticulócito na corrente sanguínea (NAOUM, 2013; BAIN; DACIE; LEWIS, 2012; PIERRE, 2002; BUTTHEP et al., 2015). Para pacientes anêmicos, um valor de IPR igual ou inferior a um indica que a resposta medular desse paciente é insuficiente para o grau de anemia em que ele se encontra. Valores entre um e dois sugerem uma medula óssea mais ativa e uma melhor resposta ao grau de anemia do paciente, valores maiores que dois sugerem uma eritropoiese acelerada, e valores iguais ou maiores que três traduzem uma resposta medular significativa ao grau de anemia, sendo esse tipo de resposta é mais frequentemente vista em quadros de anemia hemolítica (LONGO, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A anemia é um problema de saúde mundial, que atinge as mais diversas camadas sociais, e está presente em países de população majoritariamente rica, assim como em países com população predominantemente pobre. A anemia também é uma doença que pode afetar pessoas de todas as idades e surgir em associação com as mais diversas doenças ou condições fisiológicas, e são as mulheres grávidas e crianças jovens os grupos mais afetados (OMS, 2008).

A etiologia das anemias é bastante diversificada. Ela pode ser causada por carências nutricionais de elementos como ferro, vitamina B₁₂, vitamina A e folatos, assim como pode ser desencadeada por outras doenças, como neoplasias, hemorragias crônicas ou agudas, defeitos genéticos hereditários, etc. (OMS, 2008; FAILACE, 2009).

Da mesma forma que a sua etiologia, o tratamento das anemias é bastante variável e dependente da causa do desenvolvimento do processo anêmico (GIGLIO; KALIKS, 2007). Pacientes portadores de carências nutricionais geralmente necessitam apenas fazer a reposição dos nutrientes deficientes. Já, anemias com etiologias mais complexas, como as hereditárias, podem necessitar de tratamentos mais complicados e dispendiosos, como transfusões sanguíneas e até mesmo transplantes de medula óssea (BROADWAY-DUREN; KLAASSEN, 2013). Dessa forma, é evidente que a realização de um correto diagnóstico diferencial da anemia é essencial para a escolha do melhor tratamento (GIGLIO; KALIKS, 2007; PARKER-WILLIAMS, 2013).

Como já mencionado, uma das abordagens mais frequentemente utilizadas para iniciar o processo de diagnóstico diferencial das anemias é avaliar a resposta medular ao quadro anêmico pela contagem de reticulócitos (GIGLIO; KALIKS, 2007). Atualmente, a maioria dos laboratórios realiza a CRR e CAR ou a CCR. Essas duas metodologias de contagem não levam em conta o maior tempo de permanência dos reticulócitos na corrente sanguínea de indivíduos gravemente anêmicos, o que pode gerar enganos na determinação da capacidade eritropoiética da medula óssea e, conseqüentemente, a dificuldades no estabelecimento do diagnóstico e tratamento do indivíduo. Considerando-se que muitos pacientes costumam procurar atendimento quando já possuem sintomas graves de anemia, com HCT próximo a 20 % (LONGO, 2013), esse tipo de problema pode ocorrer com relativa frequência. Dessa forma, se faz necessário verificar se as diferentes metodologias de contagem de reticulócitos

verdadeiramente geram resultados divergentes, de forma a prejudicar o processo de diagnóstico dos portadores de anemia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o IPR, CAR, CRR e CCR proporcionam resultados e interpretações laboratoriais divergentes em amostras com dosagem de hemoglobina abaixo dos valores de referência.

2.1.1 Objetivos específicos

- Calcular o IPR e a CCR a partir da CRR;
- Verificar se existe concordância entre os resultados do IPR, da CRR, da CAR e da CCR;
- Avaliar a sensibilidade, a especificidade e a acurácia do IPR, da CRR e da CCR.

3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 47836415.5.0000.0121).

3.2 Coleta dos dados

3.2.1 Dados provenientes de doadores de sangue clinicamente saudáveis

Com o intuito de avaliar se as contagens de reticulócitos em indivíduos saudáveis eram condizentes com os valores de referência adotados no presente trabalho, também foram incluídos no estudo resultados provenientes de amostras de 23 doadores voluntários de sangue clinicamente saudáveis e com dosagens de hemoglobina dentro dos valores de referência. Os dados incluídos no trabalho foram: dosagem de hemoglobina, HCT, contagem de eritrócitos, CRR, CAR, CCR e IPR.

3.2.2 Dados provenientes de portadores de anemia

O presente trabalho é um estudo transversal, com dados secundários que foram obtidos em consulta a fichas de registros internos do setor de hematologia da divisão de análises clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Para a realização do trabalho, foi feito um levantamento, por gênero, dos resultados de CRR e CAR, realizadas no período de janeiro de 2014 a março de 2015, e de suas respectivas dosagens de hemoglobina, contagens de hemácias e HCT. Os dados compilados foram tabelados utilizando-se o programa Excel do sistema operacional Windows.

Após a coleta dos dados, foram excluídos do estudo os resultados de contagem de reticulócitos que não tinham dosagem de hemoglobina, contagem de hemácia ou HCT. Também foram excluídas as contagens de reticulócito provenientes de amostras de mulheres e homens cujas dosagens de hemoglobina estavam abaixo de 12 g/dL e 13 g/dL, respectivamente.

Os valores de referência adotados para a CRR foram de 0,8 a 2,5 % (WINTROBE, 1998). Os valores de referência adotados para CAR foram de 18.000 a 158.00/ mm³. A partir das CRR e dos seus respectivos HCT, foram calculadas as CCR e o IPR, conforme descrito abaixo.

3.3 Contagem corrigida de reticulócitos (CCR)

A CCR foi realizada de acordo com a fórmula abaixo. Para a aplicação da fórmula, foi considerado um HCT de 40 % normal para mulheres e de 45 % normal para homens. Os valores de referência adotados para a CCR foram de 0,8 a 2,5 % (WINTROBE, 1998; GIGLIO e KALIKS, 2007).

$$\text{Contagem corrigida} = \frac{\text{contagem relativa do paciente} \times \text{HCT do paciente}}{\text{HCT normal}}$$

3.4 Cálculo do índice de produção de reticulócitos (IPR)

O cálculo do IPR foi realizado de acordo com a fórmula abaixo. Para a aplicação da fórmula, o tempo de maturação em dias foi determinado a partir do HCT, conforme pode ser observado na Tabela 3 (LONGO, 2013).

$$\text{IPR} = \frac{\text{contagem corrigida de reticulócitos}}{\text{tempo de maturação em dias}}$$

Tabela 3. Tempo (em dias) de maturação dos reticulócitos de acordo com o hematócrito.

Hematócrito (%)	MO	SP
45	3,5	1,0
35	3,0	1,5
25	2,5	2,0
15	1,5	2,5

MO – medula óssea; SP – sangue periférico. Adaptado de Longo, 2013.

Os valores de referência do IPR adotados foram adaptados de Longo (2013) e podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de corte adotados para o IPR.

Classificação	IPR
Normo/Hipoproliferativo	< 2
Hiperproliferativo	> 2

IPR – índice de produção de reticulócitos. Adaptado de Longo, 2013.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas SPSS versão 17.0 e o MedCalc versão 12.7.7. As variáveis numéricas foram expressas em média e desvio padrão.

Para determinar a concordância entre os resultados dos exames, foi utilizado o teste Kappa. A concordância foi definida segundo os seguintes valores de Kappa: i) 0 – 0,2: pobre; ii) 0,21 – 0,4: razoável; iii) 0,41 – 0,6: moderada; iv) 0,61 – 0,8: boa; v) 0,81 – 1,0: excelente (ALTMAN, 1991). As sensibilidades e especificidades foram calculadas pela Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) adotando-se como padrão áureo a CAR. As acurácias das determinações de reticulócitos foram medidas sobre a área da curva ROC. Desta forma, a acurácia do teste diagnóstico foi interpretada segundo a área sob a curva ROC (AUC) como: i) 0,5 – 0,6: fraco; ii) 0,6 – 0,7: pobre; iii) 0,7 – 0,8: iv) razoável; 0,8 – 0,9: v) bom; e 0,9 – 1,0: excelente (TAPE, 2015). As curvas ROC foram comparadas pelo método de Hanley e McNeil. Foi considerado um nível de significância de 5 % ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O reticulocitograma fornece evidências quanto à situação da produção eritrocitária na medula óssea. Dessa forma, os parâmetros reticulocitários costumam ser aplicados apenas a pacientes anêmicos, tendo pouca utilidade em indivíduos saudáveis que não recebem estímulos eritropoiéticos. Portanto, a observação desses parâmetros apenas seria capaz de classificar esses indivíduos como normoproliferativos (PEKELHARING et al., 2010).

Sabe-se que, devido às diferenças étnicas e socioeconômicas, populações de um mesmo país ou região podem possuir distintos valores de referência. Com o intuito de verificar se os valores de referência adotados no presente estudo estavam de acordo com as características da população estudada, foram avaliados os parâmetros reticulocitários de 23 indivíduos adultos, clinicamente saudáveis e com dosagens de hemoglobina dentro dos valores de referência. Em uma população saudável, espera-se que 95 % ou mais da população apresentem resultados dentro dos valores de referência. Como se pode observar na Tabela 5, os indivíduos saudáveis apresentaram resultados dentro dos valores de referência adotados, sendo que apenas um indivíduo (4,4 %) apresentou CRR e CCR abaixo do esperado (0,7 % para ambos os parâmetros) confirmando que estes valores são adequados para a população estuda.

Tabela 5. Resultados das contagens de reticulócitos de 23 doadores voluntários de sangue clinicamente saudáveis.

Parâmetro	Média ± DP	Valor mínimo e máximo	Valor de referência
CRR (%)	1,2 ± 0,3	0,7 – 1,7	0,8 a 2,5
CCR (%)	1,1 ± 0,3	0,7 – 1,7	0,8 a 2,5
CAR (x10³/mm³)	54,5 ± 14,3	31,6 – 83,2	18,0 a 158,0
IPR	1,1 ± 0,3	0,5 – 1,7	< 2

DP – desvio padrão; IPR - índice de produção de reticulócitos, CRR – contagem relativa de reticulócitos; CCR – contagem corrigida de reticulócitos; CAR – contagem absoluta de reticulócitos; IPR – índice de produção de reticulócitos. Fonte : Elaborado pelo autor.

Para verificar qual das formas de contagem de reticulócitos avalia melhor a resposta medular à anemia, foram incluídas no estudo 121 contagens de reticulócitos oriundas de 30 indivíduos com dosagens de hemoglobina compatíveis com quadro anêmico. Do total de indivíduos, 18 (60 %) eram do gênero feminino e 12 (40 %) do gênero masculino.

Como já mencionado, a partir dos resultados de CRR e HCT, foram calculados os valores de CCR e IPR. Os parâmetros reticulocitários das 121 amostras provenientes dos portadores de anemia estão descritos na Tabela 6.

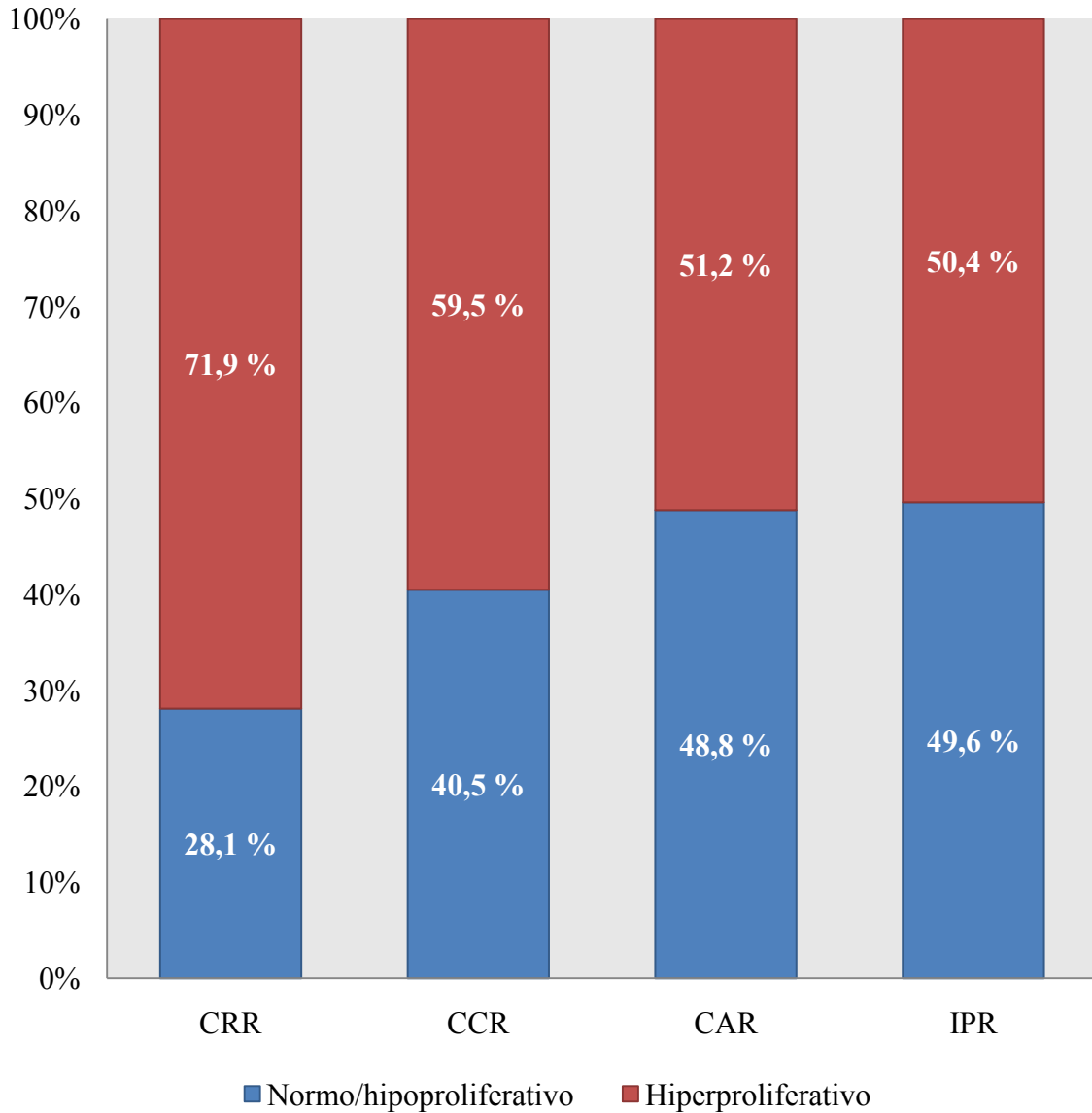
Tabela 6. Parâmetros reticulocitários de 121 amostras provenientes de portadores de anemia.

Parâmetro	Média ± DP	Mediana	Valor mínimo e máximo	Valor de referência
CRR (%)	17,1 ± 28,5	7,0	0,0 – 98,5	0,8 a 2,5
CCR (%)	12,3 ± 23,0	3,8	0,0 – 83,9	0,8 a 2,5
CAR (x10³/mm³)	450,3 ± 732,7	166,4	0,0 – 2.783,900	18,0 a 158,0
IPR	7,8 ± 15,1	2,0	0 - 55,9	< 2

DP – desvio padrão; IPR - índice de produção de reticulócitos, CRR – contagem relativa de reticulócitos; CCR – contagem corrigida de reticulócitos; CAR – contagem absoluta de reticulócitos; IPR – índice de produção de reticulócitos. Fonte : Elaborado pelo autor.

A partir dos parâmetros reticulocitários, os resultados foram classificados em normo/hipoproliferativos (resultados dentro ou abaixo dos valores de referência) e hiperproliferativos (resultados acima dos valores de referência). Utilizando-se a CRR como parâmetro de avaliação da proliferação da medula óssea, 28,1 % dos resultados foram de amostras provenientes de portadores de anemia normo/hipoproliferativos e 71,9 % de hiperproliferativo. Segundo CAR, 48,8 % dos resultados foram classificados como normo/hipoproliferativos e 51,2 % como hiperproliferativos. Pela CCR, 40,5 % foram classificados como normo/hipoproliferativos e 59,5 % como hiperproliferativo. Por fim, ao utilizar o IPR para classificar, 49,6 % dos resultados foram considerados normo/hipoproliferativo e 50,4 % hiperproliferativos (Figura 4).

Figura 4. Classificação em normo/hipoproliferativo e hiperproliferativo segundo os resultados da CCR, CCR, CAR e IPR.



CRR – contagem relativa de reticulócitos; CCR – contagem corrigida de reticulócitos; CAR – contagem absoluta de reticulócitos; IPR – índice de produção de reticulócitos. Fonte : Elaborado pelo autor.

Nota-se que a CRR apresentou a maior proporção de resultados considerados hiperproliferativos. Enquanto que a CAR apresentou as proporções mais equilibradas, resultado que foi semelhante ao encontrado pelo IPR. Na tabela 7, estão demonstrados os coeficientes de concordância entre as classificações segundo as diferentes formas de contagem de reticulócitos.

Tabela 7. Concordância entre as classificações em normo/hipoproliferativo e hiperproliferativo segundo as diferentes formas de expressar a contagem de reticulócitos.

Parâmetros comparados	Coefficiente de Kappa	Valor de P*
CRR versus		
Absoluta	0,582	< 0,0001
CCR	0,730	< 0,0001
IPR	0,569	< 0,0001
CAR versus		
CCR	0,834	< 0,0001
IPR	0,851	< 0,0001
CCR versus		
IPR	0,818	< 0,0001

CRR – contagem relativa de reticulócitos; CCR – contagem corrigida de reticulócitos; CAR – contagem absoluta de reticulócitos; IPR – índice de produção de reticulócitos. *Foi considerado significativo um valor de $P \leq 0,05$.
Fonte : Elaborado pelo autor.

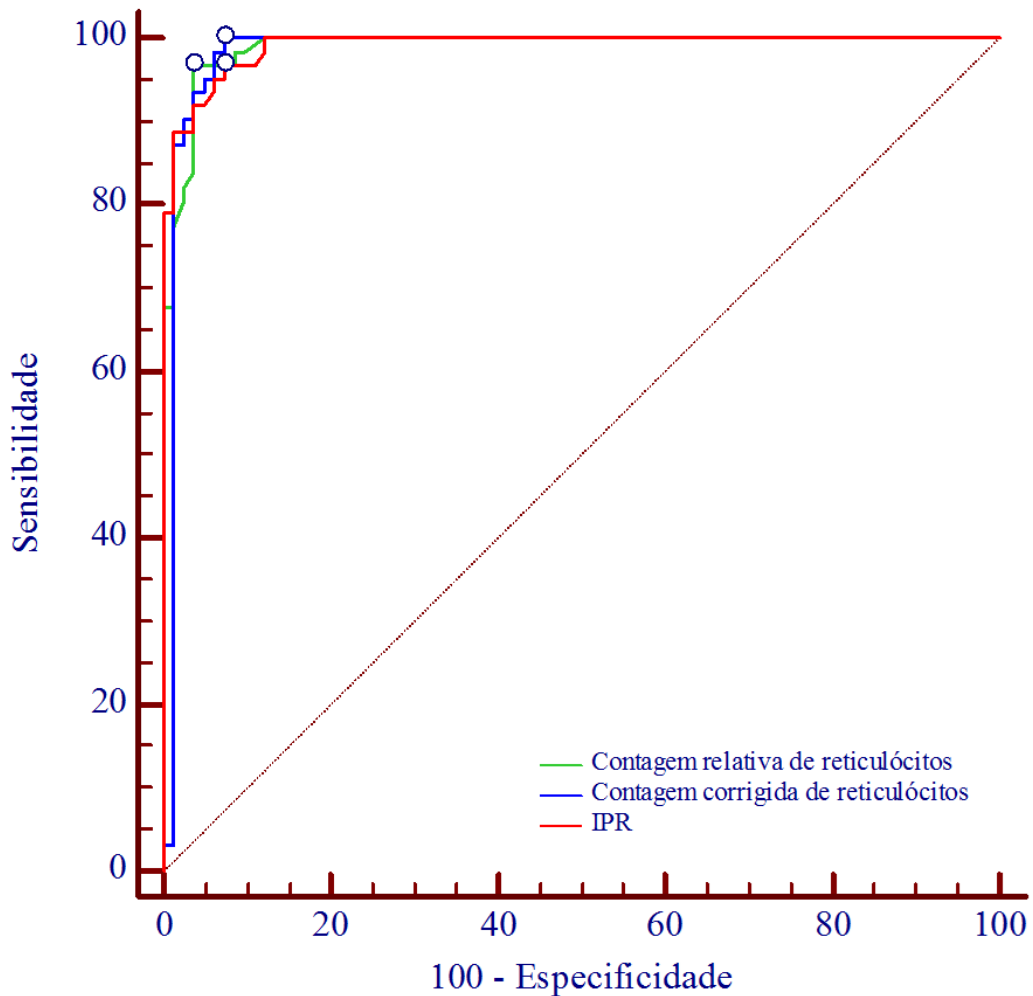
Rowan et al. (1996) e Cortelazzi et al. (2003) sugerem que a CAR e a CRR representam de forma clara diferentes aspectos do controle eritropoiético. A CAR seria adequada para refletir a taxa de produção de eritrócitos, balanceada pela maturação, enquanto que a CRR representaria, de forma mais nítida, o equilíbrio entre a produção de eritrócitos e a taxa de destruição dos mesmos (ROWAN et al., 1996 apud CORTELAZZI et al., 2003).

Como se pode observar, todos os métodos tiveram uma concordância entre moderada e excelente, sendo que a melhor concordância foi entre a CAR e o IPR (Coeficiente de Kappa = 0,851). Com esses resultados, pode-se verificar que os resultados fornecidos por cada metodologia são comparáveis e não é esperado que a metodologia escolhida para realizar a contagem de reticulócitos influencie na avaliação da situação da produção eritrocitária na medula óssea.

Após ser verificado que as metodologias apresentavam resultados concordantes, foi testado se estas também apresentavam acurácias semelhantes. Atualmente, a CRR ainda é considerada por muitos o padrão ouro dentre as metodologias de contagem de reticulócitos. No entanto, sabe-se que os resultados fornecidos por esta metodologia apresentam grandes variações interlaboratoriais e interanalistas, o que é um fator limitante para a sua utilização (SIMIONATTO et al., 2009). Diante disso, no presente estudo, optou-se por utilizar a CAR como padrão ouro, uma vez que esse é, dentre os métodos utilizados pela Divisão de análises clínicas do HU-UFSC, o de melhor acurácia com relação à avaliação do estado proliferativo da medula óssea (CAPPELETTI et al., 2002 apud PIVA et al., 2015).

A Figura 5 mostra as curvas ROC geradas pelas diferentes metodologias de contagem de reticulócitos. Todas as curvas tiveram valor diagnóstico ($AUC > 0,5$) e não foram estatisticamente diferentes entre si ($P > 0,05$).

Figura 5. Comparação das curvas ROC.



IPR – índice de produção de reticulócitos. Fonte : Elaborado pelo autor.

Na Tabela 8 podem ser observadas as sensibilidades, as especificidades e as AUC de todas as metodologias. Ao considerar-se a CAR como padrão ouro, constatou-se que a CCR apresentou a melhor sensibilidade e a CRR a melhor especificidade entre os métodos. No entanto, o IPR foi a metodologia com maior acurácia ($AUC = 0,991$).

Tabela 8. Sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC das diferentes metodologias de contagem de reticulócitos, utilizando-se a CAR de reticulócitos como padrão ouro.

Métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC
CRR	96,8	96,3	0,989
CCR	100,0	92,7	0,984
IPR	96,8	92,7	0,991

AUC – área sob a curva ROC; CRR – contagem relativa de reticulócitos; CCR – contagem corrigida de reticulócitos; CAR – contagem absoluta de reticulócitos; IPR – índice de produção de reticulócitos. Fonte : Elaborado pelo autor.

A CCR e o IPR contêm em suas respectivas fórmulas de cálculo o valor de HCT. Diversos fatores podem promover a variação anormal do HCT, como: temperaturas elevadas, prolongado tempo de armazenamento da amostra (mais do que 24 horas em geladeira ou mais do que 8 horas em temperatura ambiente), e hiperglicemia. Esses três fatores podem promover a expansão dos eritrócitos e, desta forma, afetar o VCM, que é utilizado para calcular o HCT em diversos aparelhos automatizados. Assim, as variáveis que podem alterar o VCM também irão alterar o HCT, o que influencia diretamente o resultado do IPR e da CCR. Dessa forma, observa-se que esses dois parâmetros reticulocitários apresentam variação dependente dos fatores que os compõem, e que, nos casos onde existe a necessidade de avaliar a capacidade medular pelo IPR ou pela CCR, deve-se acompanhar os resultados de HCT com cautela, pois variações provenientes de erros pré-analíticos terão grande influência no resultado final da análise, o que pode levar a uma classificação errada do quadro de resposta medular do paciente (LEVIN; ROCCO, 2006). Outro fato que torna pouco útil a realização de contagens de reticulócitos em amostras armazenadas por períodos maiores do que 24 horas em temperatura ambiente é que os reticulócitos continuam a sua maturação *in vitro*, o que leva a uma redução na contagem total dos mesmos. Diante disso, o consenso geral é de que as amostras para contagem de reticulócitos sejam processadas o mais rápido possível, a fim de apresentarem maior confiabilidade nos resultados, independente de a amostra ser analisada exclusivamente por automação ou por métodos manuais (PIVA et al., 2015).

Outro tipo de limitação que se deve levar em consideração quando se opta por avaliar a atividade medular através do IPR é que a afirmação de que o tempo de maturação dos reticulócitos possui relação linear com o HCT é apenas verdadeira nos indivíduos em que o sistema hematopoiético apresenta funcionamento normal, ou seja, em pacientes que possuem problemas na produção de EPO ou inadequação da resposta da medula óssea pelo estímulo da EPO, a quantidade de reticulócitos encontrada poderá estar anormalmente baixa em relação ao

HCT, o que resultará em um resultado de IPR incorreto (RILEY et al., 2001; MIYAKE, 2013). Nesse contexto, Pekelharing et al. (2010) enfatizam que o IPR deve ser aplicado apenas em pacientes anêmicos e alertam que valores de IPR baixos nem sempre devem ser supervalorizados, uma vez que resultados oriundos de indivíduos do gênero feminino são naturalmente mais baixos, quando comparados aos valores de IPR do gênero masculino, mas isso não significa que as mulheres apresentam com maior frequência anemias hipoproliferativas.

Como já mencionado, a avaliação da atividade medular pela contagem de reticulócitos é uma prática comum, sendo frequentemente utilizada nas etapas de triagem de anemias e no acompanhamento dos tratamentos.

A anemia em pacientes idosos é um problema bastante frequente e diversas doenças e situações podem ser listadas como causadoras do processo anêmico. Price et al. (2010) realizaram um estudo a fim de esclarecer quais aspectos estão relacionados à anemia em pacientes idosos. Os autores relataram que a maioria dos indivíduos avaliados apresentavam valores de IPR abaixo de dois, sendo o valor mínimo encontrado de 0,1 e o máximo de 2,0 (média = $0,7 \pm 0,3$). Baseando-se no IPR, poder-se-ia dizer que toda a população idosa era portadora de anemia hipoproliferativa, independentemente da sua etiologia (PRICE et al. 2010). Em relação à CAR, Price et al. (2010) encontraram uma contagem média de $50.200 \pm 25.100 /\text{mm}^3$, e valores mínimo e máximo de 7.200 e $157.000 /\text{mm}^3$, respectivamente. Ao observar esses valores, percebe-se que, ao contrário do IPR, esse parâmetro não classificou homogeneamente a população estudada. Esses dados mostram que em idosos, a CAR e o IPR não possuem o mesmo valor diagnóstico e a escolha de qual deve ser utilizado deve ser feita de forma ponderada (PRICE et al., 2010).

A contagem de reticulócitos também pode ter aplicação na prática clínica de pacientes que foram submetidos a implante de prótese cardíaca. Pacientes cuja prótese cardíaca não funciona corretamente podem desenvolver anemia devido à hemólise contínua desencadeada pelo fluxo sanguíneo muito forte proporcionado pelo implante, ou por supressão da eritropoiese devido à presença persistente de substâncias inflamatórias em resposta ao “corpo estranho” do implante. Ambas as condições desencadeiam diferentes alterações nas contagens de reticulócitos, nos casos de anemia gerada pela elevada e contínua hemólise, espera-se que ocorra uma reticulocitose, enquanto que, nos casos de mielossupressão, espera-se que ocorra a reticulocitopenia (MANKAD et al., 2012). Mankad et al. (2012) avaliaram a resposta medular dos pacientes anêmicos que receberam próteses cardíacas por meio do IPR, da CAR e da CRR. Os autores observaram que todos os pacientes incluídos no estudo apresentaram resultados

de CAR e CRR dentro da faixa da normalidade. No entanto, ao utilizar o IPR para avaliar os pacientes, eles detectaram que 82 % dos pacientes com prótese cardíaca possuíam resposta inadequada à anemia ($IPR < 2$), isso mesmo em indivíduos que possuíam concentrações adequadas de EPO. Desta forma, foi constatado que, nessa população, o IPR possuiu valor diagnóstico diferente da CAR e da CRR e que o IPR foi o parâmetro que classificou de forma mais adequada a real situação eritropoiética desses indivíduos (MANKAD et al., 2012).

Ainda na área de acompanhamento pós-transplantes, pode-se mencionar o estudo realizado por Noronha (2001), onde foram acompanhados 20 indivíduos que realizaram transplante de medula óssea autólogo e 22 que realizaram o transplante alogênico. Os participantes do estudo possuíam doenças diferentes, entre elas, leucemia mieloide aguda e crônica, leucemia linfoblástica aguda, anemia aplásica, linfoma de Hodgkin e neoplasias linfóides de células maduras. Os resultados desse estudo demonstram que a resposta reticulocitária foi mais precoce em transplantes autólogos em comparação aos transplantes alogênicos, e que o monitoramento da recuperação da linhagem eritroide pós-transplante é mais bem avaliado por meio da fração imatura de reticulócitos (NORONHA, 2001).

Ainda sobre a aplicação e interpretação da contagem de reticulócitos na prática clínica, pode-se mencionar a estimativa de sobrevivência de pacientes com problemas hepáticos (ex. cirrose) por meio de contagem de reticulócitos e concentração de hemoglobina. No estudo realizado por Parker et al. (2014), constatou-se que 31 % dos pacientes com problemas hepáticos possuíam CRR anormalmente elevadas, e que, quando comparados com pacientes com contagens de reticulócitos na faixa da normalidade, esses indivíduos apresentavam maior taxa de mortalidade. Parker et al. (2014) relataram que a CRR possuía forte relação com a razão normalizada internacional (TP-RNI), a contagem de plaquetas e as concentrações de albumina, de bilirrubina total, e de vitamina B₁₂. Por outro lado, a concentração de hemoglobina correlacionou-se com as concentrações de albumina, de sódio, de ureia, e com a atividade da aspartato aminotransferase. Nesse trabalho, a concentração de hemoglobina e a CRR foram considerados fatores preditivos independentes de mortalidade em pacientes com problemas hepáticos. Parker et al. (2014) apontaram a CRR como um importante parâmetro, e sugeriram que ele fosse levado em conta no cálculo do MELD (Model For End-Stage Liver Disease), para melhorar a acurácia na previsão da mortalidade dos pacientes portadores de problemas hepáticos, e, desta forma, aprimorar a seleção dos indivíduos prioritários nas listas de transplante. Essa conclusão é diferente da encontrada para os pacientes com prótese cardíaca, em que foi verificado que o IPR era o melhor parâmetro de acompanhamento. No entanto, é importante ressaltar que Parker et al. (2014) utilizaram apenas a CRR para avaliar

os seus pacientes, o que impossibilita verificar se os demais parâmetros reticulocitários não apresentariam valor preditivo semelhante.

Sheng-Lei et al. (2014) demonstraram que o IPR também possui aplicação em protocolos de acompanhamento dos pacientes com hepatite C que fazem uso de interferon peguulado. Sabe-se que, a fim de reduzir a chance de desenvolver problemas hepáticos graves (ex. cirrose), ou de reduzir o risco de evoluir para um quadro clínico onde existe a necessidade de transplante hepático, pacientes portadores de hepatite C necessitam de tratamento antiviral para controlar a replicação ou até mesmo para eliminar completamente o vírus do seu organismo. Porém, os tratamentos antivirais que envolvem interferon peguulado e ribavirina possuem como um dos efeitos adversos mais graves a anemia severa desencadeada pela mielossupressão induzida por esses fármacos. Em seu estudo, Sheng-Lei et al. (2014) demonstraram que indivíduos com 60 anos ou mais que fizeram uso de interfon peguilhado e que apresentavam concentrações de hemoglobina inferior a 14 g/dL antes do início do tratamento, apresentavam chances maiores de desenvolver anemia severa caso tivessem um valor de IPR inferior a 0,9 na quarta semana de tratamento. Desta forma, observa-se que os valores de IPR encontram-se intimamente relacionados com anemia severa desencadeada pelo interferon peguulado (SHENG-LEI et al., 2014).

As contagens de reticulócitos também possuem grande relevância no acompanhamento de pacientes com pancitopenia e, inclusive, sua utilização reduz a necessidade de realizar procedimentos invasivos, como a aspiração de medula óssea. Poorana e Subhashree (2014) acompanharam durante dois anos 429 indivíduos com pancitopenia relacionadas a diferentes causas: anemia aplásica (N = 72), anemia megaloblástica (N = 156), anemia de causas variadas (N = 93), síndrome mielodisplásica (N = 2), leucemias (N = 13), linfomas (N = 12), metástase de diferentes tipos de câncer (N = 10), malária (N = 20), e sepse (N = 51). Nenhum indivíduo incluído no trabalho apresentou CRR e CAR na faixa da normalidade. Todos os indivíduos portadores de anemia aplásica tiveram contagens compatíveis com uma medula óssea hipoproliferativa e, nesses casos, sugeriu-se que fossem realizadas as dosagens de vitamina B₁₂, folato e ferritina e, caso essas fossem baixas, foi indicado a realização da aspiração da medula óssea. A aspiração da medula óssea também foi indicada para os pacientes com pancitopênia que apresentaram contagens associadas a um quadro de hiperproliferação medular, exceto em indivíduos com histórico de malária e sepse. Ao fim do estudo, Poorana e Subhashree (2014) concluíram que a CAR possui importante valor clínico no esclarecimento de quadros de anemia hipoproliferativas, como é o caso das anemias aplásicas. Além disso, os autores sugerem que, devido a sua utilidade, a CAR deve

ser incorporada aos protocolos de rotina de acompanhamento de pacientes portadores de pancitopenia (POORANA; SUBHASHREE, 2014).

Em indivíduos portadores de insuficiência renal crônica (IRC), a deficiência de EPO é bastante comum, o que leva a necessidade do uso rotineiro de injeções de EPO para minimizar os danos provocados pela falta dessa glicoproteína. No acompanhamento do tratamento desses indivíduos, é necessário realizar a contagem de reticulócitos, a fim de avaliar se a dose de EPO utilizada é suficiente para induzir a eritropoiese de forma satisfatória. Scherer et al. (2015) realizaram um estudo com o intuito de propor valores de referência dos parâmetros reticulocitários na população dos indivíduos portadores de IRC e avaliar quais parâmetros possuem maior utilidade no acompanhamento terapêutico dessa população. Para tanto, foram analisados a CAR, a CRR, a fração de reticulócitos imaturos, a fração de reticulócitos de baixa fluorescência, a de reticulócitos de média fluorescência e a de reticulócitos de alta fluorescência, além de outros parâmetros hematológicos, como a dosagem de hemoglobina, contagem de hemácias e HCT. Os autores enfatizam que há necessidade de propor valores de referência diferentes para homens e mulheres, não sendo possível encaixá-los em apenas um patamar (SCHERER et al., 2015). Segundo os critérios da OMS (2008), todos os indivíduos portadores de IRC que participaram do estudo de Scherer et al. (2015) eram anêmicos. Em relação à CRR, a média encontrada para os indivíduos não portadores de IRC (NIRC) foi de $1,31 \pm 0,61$ %, enquanto que para os portadores de IRC foi de $1,86 \pm 1,40$ %. A CAR foi de 71.000 ± 33.000 /mm³ para homens portadores de IRC, e de 80.000 ± 43.000 /mm³ para mulheres portadoras de IRC. Ambos os parâmetros reticulocitários apresentaram médias significativamente diferentes das encontradas para os NIRC ($P < 0,001$) (SCHERER et al., 2015). Desta forma, e com base no estudo de Scherer et al. (2015), sugere-se acompanhar os portadores de IRC em tratamento através dos parâmetros que avaliam as frações imaturas de reticulócitos (SCHERER et al., 2015).

Ainda sobre a avaliação de doenças crônicas, pode-se mencionar a anemia desencadeada pela inflamação crônica do intestino, sendo a doença de Crohn e a colite ulcerativa os principais exemplos (OUSTAMANOLAKIS et al., 2011). De forma geral, esse tipo de inflamação cursa com quadros de destruição dos componentes do trato gastrointestinal, o que costuma evoluir para uma anemia desenvolvida por deficiência de ferro e outros nutrientes, como vitamina B₁₂, folatos, ou para uma anemia de doença crônica, provocada pela constante presença de substâncias inflamatórias que estão relacionadas com mecanismos que promovem diferentes níveis de mielossupressão. Compreender qual tipo de anemia melhor relaciona-se com o quadro clínico do indivíduo em tratamento possui notável

impacto na qualidade de vida dessa pessoa (OUSTAMANOLAKIS et al., 2011). Para que seja possível avaliar o impacto da doença na capacidade eritropoiética do indivíduo, é necessário levar em conta os diferentes parâmetros reticulocitários. Em seu estudo, Oustamanolakis et al. (2011) avaliaram parâmetros obtidos por métodos automatizados e considerados de “nova geração”: fator de tamanho das células vermelhas (RSF), fração imatura de reticulócitos, e o RDW reticulocitário. A proposta de avaliar esses parâmetros foi de que eles proporcionariam resultados que se relacionariam com diferentes aspectos da eritropoiese. O RSF estaria relacionado com a capacidade eritropoiética da medula óssea e com o grau de hemoglobinação dos eritrócitos, uma vez que esse parâmetro é calculado a partir do VCM dos eritrócitos maduros e o volume dos reticulócitos (URRECHAGA et al., 2009; OUSTAMANOLAKIS et al., 2011). Enquanto que a fração imatura de reticulócitos é o parâmetro que detecta de forma precoce a produção de reticulócitos em resposta ao estímulo da eritropoiese. E o RDW reticulocitário indica a variação no tamanho dos reticulócitos. Os resultados de Oustamanolakis et al (2011) mostram que a prevalência de anemia na população estudada foi de 41,2 % nos indivíduos portadores de colite ulcerativa, 42,9 % nos indivíduos portadores de doença de Crohn, e que 30 % dos indivíduos portadores de doenças intestinais inflamatórias possuem anemia desencadeada por deficiência de ferro. Os indivíduos com anemia ferropênica, quando comparados com os indivíduos não anêmicos, apresentaram como características um RDW reticulocitário significativamente elevado e um resultado de RSF expressivamente baixo (sensibilidade 83 % e especificidade 81 %). Para Oustamanolakis et al. (2011), o RSF foi considerado um parâmetro de excelência para diagnosticar a anemia ferropênica, e o RDW reticulocitário possui forte relação com o grau de atividade da doença.

A contagem de reticulócitos também pode auxiliar no acompanhamento dos pacientes portadores de malária. O estudo realizado por Fendel et al. (2010) verificou que é possível relacionar a necessidade de transfusão sanguínea em pacientes portadores de anemia severa secundária a infecção por *Plasmodium falciparum* com o IPR. A anemia severa desencadeada pela malária (ASM) é definida por uma dosagem de hemoglobina inferior a 5 g/dL, associada a uma carga parasitária superior a 10.000 parasitos/ μ L e a uma manifestação clínica condizente com um quadro grave de hemólise (OMS 2000 apud FENDEL et al., 2010). O tratamento desse quadro anêmico é realizado por meio da transfusão sanguínea e uso de medicamentos antimaláricos. Em locais cujo acesso à rede de atenção à saúde é problemático, é difícil a realização de testes sorológicos e demais exames complementares que garantam a segurança da transfusão sanguínea; além disso, na maioria desses locais, as condições de armazenamento de materiais biológicos como bolsas de sangue são também bastante

precárias, o que aumenta ainda mais o risco de reações pós-transfusionais (COLEBUNDERS et al., 1991 e MOORE et al., 2001 apud FENDEL et al., 2010). Em seu trabalho, Fendel et al. (2010) realizaram a CRR e o cálculo do IPR nos pacientes portadores de ASM. Os resultados de CRR encontrados no estudo estavam entre 2,3 % e 10,6 %, enquanto os valores de IPR calculados variaram entre zero e quatro. Com esses dados, verifica-se que se apenas a contagem CRR fosse utilizada, praticamente todos os participantes seriam classificados como normo/hiperproliferativos. Por outro lado, o IPR classificou de forma maciça os indivíduos como normo/hipoproliferativos, sendo que apenas quatro pacientes foram classificados como hiperproliferativos ($IPR > 2$) (FENDEL et al., 2010). Fendel et al. (2010) ainda averiguou que os indivíduos que apresentavam quadros graves de hemólise e baixos resultados de IPR tinham maiores chances de receber transfusões sanguíneas. Analisando essas informações, pode-se considerar que os valores fornecidos pelo IPR, quando associados ao quadro clínico do paciente, podem ser úteis na avaliação da necessidade de transfusões sanguíneas (FENDEL et al., 2010).

Como se pode observar, todas as formas de contagem de reticulócitos fornecem informações de grande importância na prática clínica. No entanto, há a necessidade de realizarem-se estudos que visem verificar qual método de contagem de reticulócitos melhor avalia o estado proliferativo da medula óssea em cada tipo de doença de base causadora da anemia.

No presente estudo, não foi possível classificar os pacientes quanto à origem da anemia, pois não se teve acesso ao diagnóstico final de cada participante. Dessa forma, não se pôde avaliar qual a metodologia de contagem de reticulócitos era mais apropriada para cada tipo de doença de base causadora da anemia. Contudo, sabe-se que os resultados utilizados no presente trabalho eram provenientes de um grupo heterogêneo de pacientes, foram incluídos resultados provenientes de portadores de anemias carenciais, anemias autoimunes, hemoglobinopatias, anemias aplásicas, entre outras. Essa heterogeneidade permitiu que as metodologias de contagem de reticulócitos fossem comparadas com maior segurança, pois as contagens não foram influenciadas por um único tipo de doença de base. Os resultados aqui apresentados mostram que as metodologias de contagem de reticulócitos são comparáveis, com bons coeficientes de concordância, e excelentes valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. Dessa forma, fica evidente que a escolha de qual metodologia de contagem de reticulócitos deve ser usada na prática clínica deve ser principalmente influenciada pela doença de base que causou a anemia e pelo motivo que levou o clínico a solicitar a realização do exame.

5 CONCLUSÕES

Com a realização do presente estudo, foi possível verificar que:

- Os valores de referência adotados no presente trabalho eram adequados para a população estudada;
- Todos os métodos analisados apresentaram coeficiente de concordância Kappa entre moderado e excelente, sendo que a melhor concordância observada foi entre a CAR e o IPR;
- Os diferentes parâmetros de contagem de reticulócitos apresentaram excelentes valores de sensibilidade, especificidade e acurácia;
- Ao considerar-se a CAR como padrão ouro, constatou-se que a CCR apresentou a melhor sensibilidade, o CRR a melhor especificidade e o IPR foi a metodologia com melhor acurácia entre os métodos.

Por fim, foi possível concluir que os parâmetros reticulocitários analisados apresentam similaridade na interpretação laboratorial dos resultados. Diante disso, recomenda-se que os laboratórios coloquem em seus laudos a CRR, a CAR, a CCR e o IPR. Dessa forma, o clínico poderá selecionar o parâmetro reticulocitário que melhor se aplica ao quadro clínico do seu paciente.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, Douglas G. **Practical Statistics for Medical Research**. London: Library Of Congress Cataloging In Publication Data, 1991. 610 p.

BAIN, Barbara J.; DACIE, John V.; LEWIS, S. Mitchell. **Dacie and Lewis: practical haematology**. 11th. ed. [London]: Elsevier, 2012 xi, 653 p.

BRASIL. **Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e ácido Fólico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. **Portaria nº 730, de 13 de maio de 2005**. Institui o Programa Nacional de Suplementação de Ferro, destinado a prevenir anemia ferropriva e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 maio 2005.

BIRGEGÅRD, Gunnar; WIDE, Leif; SIMONSSON, Bengt. Marked erythropoietin increase before fall in Hb after treatment with cytostatic drugs suggests mechanism other than anaemia for stimulation. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.462-466, jul. 1989.

BUTTHEP, Punnee et al. Elevated erythropoietin and cytokines levels are related to impaired reticulocyte maturation in thalassemic patients. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.170-176, fev. 2015..

CAPPELLETTI, P. et al. Linee guida per il referto ematologico. **Riv Med Lab JLM**, v. 3, n. S1, p. 87-93, 2002.

CAVILL, I.;KENDALL, R. G NORFOLK, D. R. SERUM ERYTHROPOIETIN LEVELS DURING HAEMATINIC THERAPY. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.630-631, ago. 1992.

CAZZOLA, Mario; BEGUIN, Yves. New tools for clinical evaluation of erythron function in man. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 3, n. 80, p.278-284, mar. 1992.

COLEBUNDERS, R. et al. Seroconversion Rate, Mortality, and Clinical Manifestations Associated with the Receipt of a Human Immunodeficiency Virus-Infected Blood Transfusion in Kinshasa, Zaire. **Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 164, n. 3, p.450-456, 1 set. 1991.

CORTELLAZZI, Laura C. et al. Reticulocyte parameters in hemoglobinopathies and iron deficiency anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.97-102, jun. 2003.

COSTA, Elísio.; JOÃO, Ana R.; PINTO, Sandra. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.188-192, 2008

DAS, R. E. Gaines et al. Serum immunoreactive erythropoietin in patients with idiopathic aplastic and Fanconi's anaemias. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.601-607, nov. 1992.

DESPOPOULOS, Agamemnon; SILBERNAGL, Stefan. **Color atlas of physiology**. Thieme, 2003.

- DEL GIGLIO, Auro; KALIKS, Rafael Aliosha. **Princípios de hematologia clínica**. Barueri, SP: Manole, c2007. xii, 274, [7] p.
- DUGDALE, Marion. Anemia. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 363-382, jan. 2001.
- FAILACE, Renato Rego. **Hemograma : Manual de Interpretação**. 2. ed. corr. Porto Alegre: Artes Medicas, 2009. 194p.
- FENDEL, Rolf et al. Hemolysis Is Associated with Low Reticulocyte Production Index and Predicts Blood Transfusion in Severe Malarial Anemia. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.e10038-e10038, 6 abr. 2010.
- GARCÍA, Laura Yolanda C. **Hematologia: Principais temas para residência médica**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: MEDCEL, 2006. 383p.
- GUINOVART, C. et al. Malaria: burden of disease. **Current molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 137-140, 2006.
- HIGGINS, John M.. Red Blood Cell Population Dynamics. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.43-57, mar. 2015.
- HOFFBRAND, Victor A. **Fundamentos em Hematologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 462p.
- HOUWEN, B. Reticulocyte maturation. **Blood cells**, v. 18, n. 2, p. 167-186, 1991.
- JONKER, Femke A.m.; VAN HENSBRÖEK, Michaël Boele. Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infections. **Journal Of Infection**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.23-27, nov. 2014.
- KOURY, Mark J.; RHODES, Melissa. How to approach chronic anemia. **American Society Of Hematology**, [s.l.], v. 2012, n. 1, p.183-190, 8 dez. 2012.
- LANE, David R.; VIETH, Julie T. Anemia. **Emergency medicine clinics of North America**, [s.l.] v. 32, n. 3, p. 613-628, aug. 2014.
- LEONART, Maria Suely Soares. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por métodos visual e automatizado. **Rev. bras. hematol. hemoter**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 303-304, 2009.
- LONGO, Dan L. **Hematologia e Oncologia de Harrison 2ª Ed.** Artmed, 2013. Porto Alegre. ISBN 0071814906/978007184904
- KOEPKE J.A. et al. Methods for reticulocyte counting (flow cytometry and supravital dyes): approved guideline. NCCLS document H44-A. Wayne, PA: NCCLS, 1997.
- LEVIN, A.; ROCCO, M. KDOQI. Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease-foreword. **American Journal Of Kidney Diseases**, [s.l.], v. 47, n. 5, p. S9-S145, maio 2006.
- MANKAD, Anit K. et al. Persistent Anemia After Implantation of the Total Artificial Heart. **Journal Of Cardiac Failure**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.433-438, jun. 2012.
- MASSUCHETI, L. **Prevalência de Anemia em Gestantes Atendidas na Rede Pública de Saúde do Município de Florianópolis – SC**. Florianópolis, 2007. 149p. Dissertação de

Mestrado – Departamento de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina.

MARTINS, Daniela Soares. **Anemia em Crianças e Adolescentes: Prevalência dos Últimos Onze Anos no Brasil**. 2011. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MIRZADEH, Kh. et al. Comparative Study of Hematological Parameters According Strain, Age, Sex, Physiological Status and Season in Iranian Cattle. **J. Of Animal And Veterinary Advances**, [s.l.], v. 9, n. 16, p.2123-2127, 1 dez. 2010.

MIYAKE, Cecília Emica Tanaka. **Reticulócitos: da contagem manual à citometria de fluxo**. 2013. 19 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Análises Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013

MOORE, Anne et al. Estimated risk of HIV transmission by blood transfusion in Kenya. **The Lancet**, [s.l.], v. 358, n. 9282, p.657-660, ago. 2001

NAOUM, Paulo Cesar. **Doenças dos Eritrócitos**. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2013. Disponível em: <[http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca_dos_eritrocitos/14Doença dos Eritrócitos - geral.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca_dos_eritrocitos/14Doença%20dos%20Eritrocitos%20-%20geral.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2015.

NASCIMENTO, M. L. Reticulocitoses. **Rev NewsLab**, [s.l.] v. 68, p. 114-30, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (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, José Fernando de Almeida. Reticulócitos Imaturos Como Preditores do Sucesso do Enxertamento no Transplante de Medula Óssea Alogênico e Autólogo. José Fernando de Almeida Noronha. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

OPAS - Organización Panamericana de la Salud. **Situación de Hierro, Folato y Vitamina B12 en las Américas**. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Iron deficiency anaemia. Assessment, preventing, and control. A guide for programme managers**. Geneva: WHO/NHD/01.3, 2001. 132p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) (Ed.). **Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO Global Database on Anaemia**. Espanha: Who Press, 2008.

OUSTAMANOLAKIS, Pantelis et al. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. **Journal Of Crohn's And Colitis**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.295-300, ago. 2011.

PARKER, Richard et al. Reticulocyte Count and Hemoglobin Concentration Predict Survival in Candidates for Liver Transplantation. **Transplantation Journal**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.463-469, fev. 2014.

PEKELHARING, J. M. et al. Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. **Sysmex Journal International**, v. 20, n. 1, 2010.

PIERRE, Robert V. Reticulocytes: Their usefulness and measurement in peripheral blood. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.63-79, mar. 2002.

PLATT, Allan; ECKMAN, James R. Diagnosing Anemia. **Clinician Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 12, p.43-51, dez. 2006.

PIVA, Elisa et al. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 48, n. 10, p.1369-1380, 1 jan. 2010.

PIVA, Elisa et al. Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.133-163, mar. 2015.

POORANA PRIYA, P.; SUBHASHREE, A. R. Role of Absolute Reticulocyte Count in Evaluation of Pancytopenia-A Hospital Based Study. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 8, p. 1-3, aug. 2014.

PRICE, Elizabeth A. et al. Anemia in older persons: Etiology and evaluation. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.159-165, 15 fev. 2011.

ROCHA, Susana et al. Erythropoiesis versus inflammation in Hereditary Spherocytosis clinical outcome. **Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 44, n. 13, p.1137-1143, set. 2011.

ROWAN, R. M.; CAVILL, I.; CORBERAND, J. X. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. **Clinical and laboratory haematology** [s.l.], v. 18, n.1 p. 3-8,dez. 1996.

SCHAPIRA, Lidia et al. Serum erythropoietin levels in patients receiving intensive chemotherapy and radiotherapy. **Blood**, [s.l.] v. 76, n. 11, p. 2354-2359, dez. 1990.

SCHERER, Patrícia S. et al. New red blood cell and reticulocyte parameters and reference values for healthy individuals and in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.77-84, abr. 2015.

SCHREZENMEIER, Hubert et al. Serum erythropoietin and serum transferrin receptor levels in aplastic anaemia. **British journal of haematology**, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 286-294, out. 1994.

SHENG-LEI, Yan, et al. Reticulocyte production index as a predictor of clinically significant anemia in chronic hepatitis C patients receiving pegylated interferon combination therapy. **Advances in Digestive Medicine**, 2015. *In Press*

SIMIONATTO, Mackelly et al. Analysis of manual reticulocyte counts in the clinical laboratories of Ponta-Grossa and Campos Gerais, PR, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.315-320, set. 2009.

SKIKNE, B. The Women's Health II Medical Education Network Part 3. Anemia: diagnosis and treatment options for women. **J Fam Pract**, [s.l.], v. 56, n. 12 Suppl Women, p. S33-8; quiz S39-40, Dec 2007.

SYSMEX EUROPE ,GmbH. **Reticulocytes and their significance**. 2010. Disponível em: <http://ru.sysmex-europe.com/files/articles/Xtra_online_reticulocytes.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2015.

RILEY, Roger S. et al. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. **Journal of clinical laboratory analysis**,[s.l.], v. 15, n. 5, p. 267-294, 2001.

TAPE, T. G. **Interpreting Diagnostic Tests: ROC Curves** .University of Nebraska Medical Center. Disponível em: <<http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC1.htm>>. Acesso em 20 de outubro de 2015.

UNICEF. [UNICEF/WHO] United Nations Children's Fund /World Health Organization. **Preventing and controlling iron deficiency anaemia in women and children**. Geneva: Report of the UNICEF/WHO Regional Consultation, 110 p.1999.

WINTROBE, Maxwell M; LEE, G. Richard. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 2v. ISBN 0683182420 : (enc.).

WOLLMANN, Muriel et al. Reticulocyte maturity indices in iron deficiency anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.25-28, jan. 2014.

URRECHAGA, E. Clinical utility of the new beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of erithropoiesis. **International journal of laboratory hematology**,[s.l.], v. 31, n. 6, p. 623-629, dez. 2009.

ANEXOS

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análises das Diferentes Metodologias de Contagem de Reticulócitos e seu Impacto na Interpretação Laboratorial dos Resultados

Pesquisador: Ana Carolina Rabello de Moraes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47836415.5.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.286.679

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Rabello de Moraes. Partido da hipótese de que pacientes anêmicos apresentam reticulócitos que permanecem no sangue periférico mais tempo do que o normal, propõe-se um estudo transversal, com dados secundários que serão fornecidos pela farmacêutica responsável pelo setor de hematologia. A partir de fichas de registros internos do setor, a farmacêutica compilará os resultados de contagens de reticulócitos (absoluta e percentual), realizadas no período de janeiro de 2014 a março de 2015, e suas respectivas dosagens de hemoglobina, contagens de hemácias e hematócritos. Os dados serão encaminhados aos pesquisadores em uma tabela onde não constará qualquer tipo de identificação dos pacientes. A partir dos dados coletados, serão calculados a contagem de reticulócitos corrigida e o índice de produção de reticulócitos (IPR). Os dados obtidos serão tabelados no programa Excel e a análise comparativa do IPR e dos valores percentuais e absolutos de reticulócitos será feita utilizando-se o programa SPSS versão 17.0 e o MedCalc versão 12.7.7. As variáveis numéricas serão expressas em média e desvio padrão. Para determinar a concordância entre os resultados dos exames, será utilizado o teste Kappa. O estudo incluirá 100 pontuários de portadores de anemia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se o índice de produção de reticulócitos (IPR), a contagem relativa de reticulócitos,

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.286.679

corrigida ou não, e a contagem absoluta de reticulócitos proporcionam resultados e interpretações laboratoriais divergentes em pacientes anêmicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os dados obtidos para esse estudo serão triados por período de realização dos exames e gênero. Os resultados laboratoriais serão coletados pela responsável pelo setor de hematologia, que é o setor responsável por realizar a contagem de reticulócitos, a dosagem de hemoglobina, a contagem de hemácia e o hematócrito. Aos pesquisadores, será repassada uma tabela constando apenas os resultados dos exames laboratoriais, sem que haja qualquer tipo de identificação que permita vincular os resultados laboratoriais aos seus donos. Desta forma, não existe a possibilidade de identificar os indivíduos que geraram os resultados, garantindo o anonimato dos participantes.

Benefícios:

Os participantes não terão benefícios diretos com o estudo. Entretanto, os resultados obtidos ao final da execução desse projeto contribuirão na identificação de qual parâmetro reticulocitário melhor avalia a resposta medular à anemia, o que trará melhoras ao processo de diagnóstico diferencial de portadores de anemia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não tenho comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados, exceto o TCLE, do qual a pesquisadora pede dispensa.

Recomendações:

Não tenho recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	29/09/2015		Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.286.679

Básicas do Projeto	ETO_551693.pdf	17:36:37		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu_camila_2015.pdf	29/09/2015 16:30:55	Camila do Nascimento Bodack	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	modificado_camila_TCC_projeto_perfil_I PR_pacientes_atendidos_HU_24092015.pdf	29/09/2015 15:32:46	Camila do Nascimento Bodack	Aceito
Outros	carta_de_respostas_as_pendencias_22 092015.pdf	29/09/2015 15:31:00	Camila do Nascimento Bodack	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_plataforma_camila.pdf	04/08/2015 10:21:14		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 19 de Outubro de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br