

Artigo / Article

Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro

Reticulocyte subpopulations and immature reticulocyte fractions as indicators of increased erythropoiesis in patients with iron deficiency anaemia

Ana R. João^{1,2}Sandra Pinto²Elísio Costa¹

O objetivo deste trabalho é de estudar as subpopulações dos reticulócitos e a fração de reticulócitos imaturos (IFR) enquanto indicadores de atividade eritropoética em pacientes com anemia por deficiência de ferro e determinar o seu grau de correlação com os marcadores tradicionais de deficiência de ferro. Estudamos um total de 96 indivíduos, com idades compreendidas entre os 20 e os 86 anos, divididos em dois grupos: indivíduos controle (n=30) e indivíduos com anemia por deficiência de ferro (n=66). A todos eles foi efetuado hemograma completo, incluindo contagem de reticulócitos e os seus índices de maturação, ferro, transferrina, ferritina e capacidade total de fixação do ferro. Os indivíduos com anemia por deficiência de ferro mostraram um aumento da proporção de IFR quando comparados com o grupo controle ($15.02 \pm 9.70\%$ vs $6.43 \pm 3.98\%$, $p < 0.01$, respectivamente). Em relação às subpopulações dos reticulócitos, no grupo de pacientes encontramos um aumento na proporção de reticulócitos com valores médios de fluorescência ($12.69 \pm 6.69\%$ vs $5.88 \pm 3.59\%$, $p < 0.01$) e na proporção de reticulócitos com alta fluorescência ($1.45 [0.38-3.10]$ vs $0.40 [0.00-0.90]$, $p < 0.05$) e diminuição na proporção de reticulócitos com baixa fluorescência ($84.83 \pm 9.65\%$ vs $93.57 \pm 3.98\%$, $p < 0.01$). Foi encontrada correlação, positiva ou negativa, entre os parâmetros de maturação dos reticulócitos entre si, e destes com o RDW (red cell distribution width). Não foi encontrada correlação com os outros indicadores laboratoriais de deficiência de ferro. Em conclusão, a anemia por deficiência de ferro está associada com aumento da proporção de IFR, refletindo aumento da atividade eritropoética destes pacientes. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008;30(3):188-192.

Palavras-chave: Subpopulações de reticulócitos; fração de reticulócitos imaturos; atividade eritropoética; anemia; deficiência de ferro.

Introdução

A deficiência de ferro continua a ser atualmente a causa mais freqüente de anemia em todo o mundo. No entanto, nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento, as melhorias das condições socioeconômicas e dos cuidados primários de saúde, a promoção do aleitamento materno e o

recurso a produtos lácteos enriquecidos em ferro têm vindo a contribuir para uma melhoria deste problema. No entanto, novas questões se têm levantado. Estudos bem controlados demonstram que crianças com anemias por deficiência de ferro ligeiras e mesmo crianças com deficiências de ferro prévias à instalação de anemia podem, de forma irreversível, ver afetado o seu desenvolvimento geral, nomeadamente o de-

¹Departamento de Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

²Unidade Hospitalar de Bragança do Centro Hospitalar do Nordeste E.P.E., Portugal.

Correspondência: Elísio Costa

Escola Superior de Saúde – Instituto Politécnico de Bragança

Avenida D. Afonso V

5300-121 – Bragança – Portugal

E-mail: elisio.costa@hotmail.com

envolvimento intelectual. Este fato conduz a que, nos dias de hoje, seja feito um esforço no sentido da detecção precoce de estádios de deficiência de ferro, assim como da identificação de grupos populacionais de risco em que, do ponto de vista de saúde pública, seja importante dirigir uma intervenção.^{1,2,3} Também têm sido desenvolvidos esforços no sentido de serem disponibilizados novos parâmetros laboratoriais que permitam detectar e avaliar estas situações o mais precocemente possível.

A eritropoese é tradicionalmente monitorizada com a contagem do número de reticulócitos. Os métodos para a contagem de reticulócitos sofreram uma grande revolução nos últimos anos, principalmente quando se tornou possível a sua contagem automática por citometria de fluxo.⁴⁻⁷ Este método permitiu não só a contagem do número dos reticulócitos como disponibilizou novos índices relacionados com o seu grau de maturação, quantificando a fração de reticulócitos com baixa, média e alta intensidade de fluorescência. Sendo o mais usado o IFR (fração de reticulócitos imaturos), que se define como a soma da fração dos reticulócitos com valor médio de fluorescência mais a fração dos reticulócitos com valor alto de fluorescência. Esta intensidade de fluorescência está diretamente relacionada com os níveis intracelulares de RNA e, conseqüentemente, com o grau de maturação dos reticulócitos. Esta graduação dos reticulócitos tem vindo a revelar-se útil na monitorização da atividade eritropoética da medula óssea.⁷

O objetivo deste trabalho é o de estudar as subpopulações dos reticulócitos e IFR enquanto indicadores de atividade eritropoética em doentes com anemia por deficiência de ferro e determinar o seu grau de correlação com os marcadores tradicionais de deficiência de ferro.

Material e Método

Neste estudo foram incluídas todas as amostras que deram entrada no serviço de Patologia Clínica da Unidade Hospitalar de Bragança do Centro Hospitalar do Nordeste E.P.E., durante um período de seis meses, que apresentassem anemia microcítica (MCV<80 fL) e hipocrômica (MCH<28 pg), com indicadores bioquímicos de deficiência de ferro (ferritina < 32 ng/mL, ferro<70 µg/mL, capacidade

Tabela 1. Valores hematológicos e bioquímicos encontrados no grupo de indivíduos controle e no grupo de indivíduos com anemia por deficiência de ferro

	Grupo controle (n=30)	Grupo de doentes (n=66)	Valor de p
Idade (anos)	60.67±14.37	67.30±16.11	>0.05
Ferro(µg/dL)	93.55 [77.55-115.45]	21.65 [14.58-33.85]	<0.001
CTFF (µg/dL)	189.35±36.97	247.72±72.42	<0.001
Ferritina(ng/ml)	124.73 [39.44-266.41]	23.41 [8.50-31.08]	<0.001
Tranferrina (mg/dl)	244.30±40.28	264.56±110.9	>0.05
IFR (%)	6.43±3.98	15.02±9.70	<0.001
LFR(%)	93.57±3.98	84.83±9.65	<0.001
MFR(%)	5.88±3.59	12.69±6.69	<0.001
HFR(%)	0.40 [0.00-0.90]	1.45 [0.38-3.10]	<0.05
Reticulócitos (%)	1.12±0.25	1.36±0.66	>0.05
Reticulócitos (x10 ⁹ /L)	22.33±5.13	30.78±16.84	<0.05
Eritrócitos (x 10 ¹² /L)	5.02±0.33	4.63±0.62	<0.05
Hemoglobina (g/dL)	15.31±1.00	10.60±1.63	<0.001
Hematócrito (%)	44.71±2.41	34.41±4.94	<0.001
VCM (fL)	89.09±3.35	74.28±4.51	<0.001
HCM (pg)	30.48±1.06	22.87±1.98	<0.001
CHCM (g/dL)	34.23±0.75	30.76±1.45	<0.001
RDW (%)	13.37±1.00	19.00±3.89	<0.001
Plaquetas (x10 ⁹ /µL)	227.97±61.87	281.47±113.64	<0.05
VPM (fL)	10.40 [9.88-10.93]	9.85 [9.00-11.00]	>0.05
PDW (%)	12.85 [12.00-14.00]	7.00 [5.85-8.00]	>0.05
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	7.01±1.75	7.17±2.38	>0.05
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	55.63±8.77	66.47±11.61	<0.001
Linfócitos (x10 ⁹ /L)	32.23±7.37	20.92±9.40	<0.001
Monócitos (x10 ⁹ /L)	8.94±2.06	10.20±3.40	>0.05
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	2.93±2.37	2.09±1.85	>0.05
Basófilos (x10 ⁹ /L)	0.30 [0.20-0.40]	0.30 [0.20-0.43]	>0.05

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão, caso a amostra tenha uma distribuição normal ou, como mediana (intervalo interquartil) caso a amostra não apresente uma distribuição normal

total de fixação do ferro <300 µg/mL e transferrina<200 mg/L) e que não estivessem a efetuar terapêutica com ferro. Foram excluídos todos os indivíduos que apresentassem patologias hematológicas e malignas, assim como indivíduos que apresentassem patologias auto-imunes e processos infecciosos agudos ou crônicos.

Este estudo foi aprovado pelo conselho de ética da Unidade Hospitalar de Bragança do Centro Hospitalar do Nordeste E.P.E.

Em todos os indivíduos, além de se registarem a idade e o sexo, foi efetuado hemograma completo, incluindo contagem de reticulócitos e os seus índices de maturação, utilizando-se o contador automático da Sysmex® (Sysmex-XT 2000i, Kobe, Japan). Adicionalmente foram efetuados os parâmetros bioquímicos tradicionais de avaliação do *status* do ferro, nomeadamente o doseamento do ferro sérico por método colorimétrico (Iron, Olympus Diagnóstica, Lismeehan, Ireland), o doseamento de transferrina por método imunoturbidimétrico (Transferrin, Olympus Diagnóstica, Lismeehan, Ireland), o doseamento de ferritina por MEIA - ensaio imunoenzimático de micropartículas (Ferritina, Abbott

Diagnostics Division, IL, USA) e a determinação da capacidade total de fixação do ferro (CTFF) por método colorimétrico (UIBC, Olympus Diagnóstica, Lismeehan, Ireland).

O grupo controle foi constituído por indivíduos emparelhados por idade e sexo, com os indivíduos com anemia por deficiência de ferro, selecionados na avaliação laboratorial pré-operatória de cirurgias ortopédicas, que não apresentassem alterações nos parâmetros hematológicos, nem indicadores laboratoriais de inflamação. A todos eles foram determinados os mesmos parâmetros hematológicos e bioquímicos que ao grupo de doentes.

Anemia por deficiência de ferro foi definida pela presença de diminuição do valor de hemoglobina e pela presença de alterações em, pelo menos, dois dos seguintes parâmetros: ferro, transferrina, ferritina e/ou CTFF.^{2,8}

No tratamento estatístico dos resultados foi utilizado o teste t-Student e o teste de Mann-Whitney, para comparação de médias. A correlação entre variáveis foi efetuada utilizando-se os testes de Pearson ou de Spearman.

Resultados

Foram incluídos neste trabalho

66 indivíduos que preenchem os critérios de anemia por deficiência de ferro. Apresentavam uma média de idade de 65,2 anos (variando entre os 20 e os 86 anos) e uma percentagem de 51% de indivíduos do sexo feminino. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), na idade e distribuição por sexos entre este grupo de indivíduos com anemia por deficiência de ferro e o grupo controle ($n=30$).

O resumo dos achados laboratoriais dos indivíduos envolvidos neste estudo estão sumarizados na Tabela I. O grupo de doentes com anemia por deficiência de ferro apresenta uma diminuição estatisticamente significativa no valor de hemoglobina, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), ferro e ferritina e aumento no RDW (*red cell distribution width*) e CTFF. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na contagem do número de reticulócitos, nem na contagem de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos. Em relação aos índices dos reticu-

lócitos, o grupo de indivíduos com anemia por deficiência de ferro mostrou um aumento da IFR quando comparados com o grupo controle ($15.02 \pm 9.70\%$ vs $6.43 \pm 3.98\%$, $p < 0.01$). Em relação às subpopulações dos reticulócitos, no grupo de doentes encontramos um aumento na proporção de reticulócitos com valor médio de fluorescência ($12.69 \pm 6.69\%$ vs $5.88 \pm 3.59\%$, $p < 0.01$) e na proporção de reticulócitos com valor alto de fluorescência ($1.45 [0.38-3.10]$ vs $0.40 [0.00-0.90]$, $p < 0.05$) e uma diminuição na proporção de reticulócitos com valor baixo de fluorescência ($84.83 \pm 9.65\%$ vs $93.57 \pm 3.98\%$, $p < 0.01$) (Figura 1). Foi encontrada correlação, positiva ou negativa, entre as subpopulações de reticulócitos entre si e, destes, com o RDW (Figura 2).

Discussão

A contagem de reticulócitos é um teste hematológico básico, que permite avaliar a capacidade eritropoética da

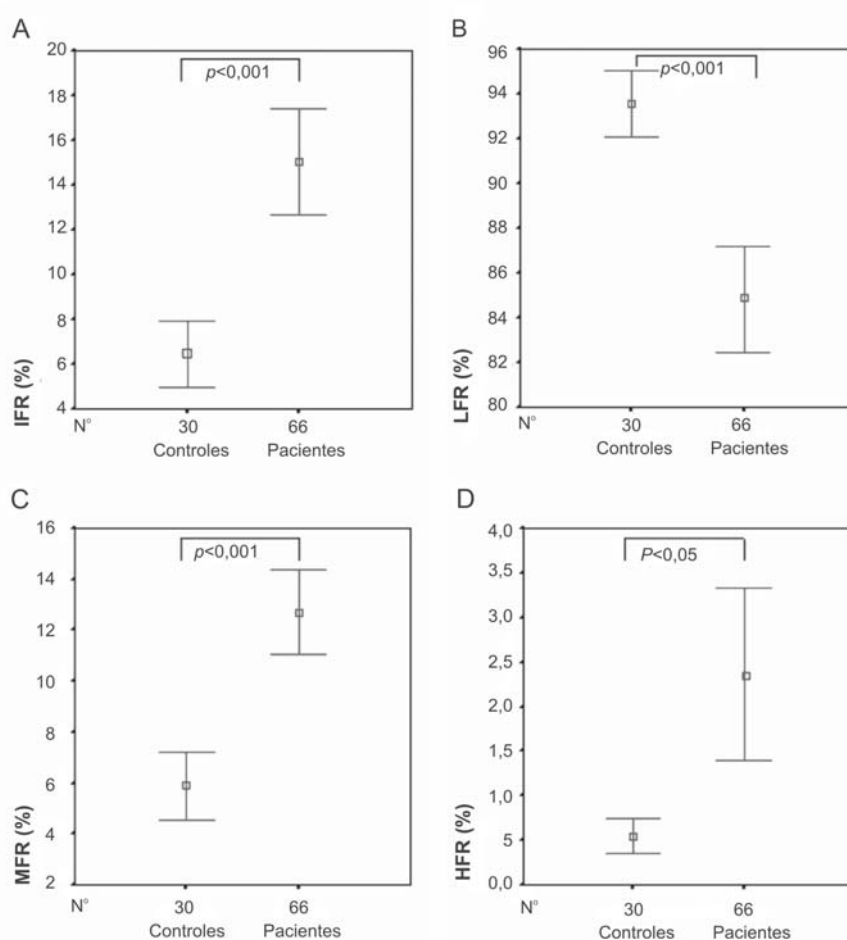


Figura 1. Valores das subpopulações de reticulócitos e IFR encontrados no grupo de indivíduos controle e nos indivíduos com anemia por déficit de ferro. A- IFR, B- reticulócitos com valor baixo de fluorescência (LFR), C- Reticulócitos com valor médio de fluorescência (MFR), D- Reticulócitos com valor alto de fluorescência (HFR)

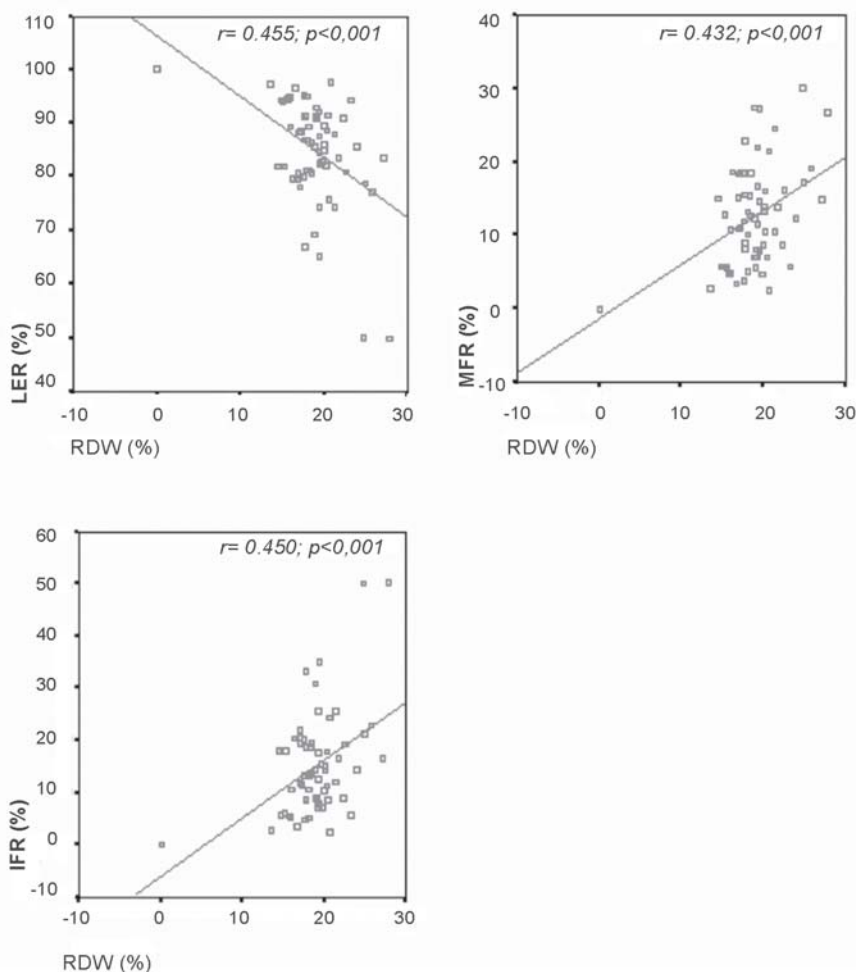


Figura 2. Valores das correlações das subpopulações de reticulócitos e IFR com o RDW encontrados no grupo de indivíduos com anemia por deficiência de ferro

medula óssea. Como tal, é importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, na confirmação da regeneração da medula óssea após quimioterapia ou transplante, e na monitorização da terapêutica com eritropoetina humana recombinante.

A contagem tradicional dos reticulócitos por coloração supravital ao microscópio é considerada ainda o método de referência. No entanto, este método é moroso em termos de execução laboratorial e apresenta um coeficiente de variação elevado.^{9,10} Portanto, quando as empresas comerciais disponibilizaram equipamento automático, por citometria de fluxo, para contagem dos reticulócitos, os diferentes laboratórios começaram a validar e a usar esta metodologia na sua rotina. Adicionalmente à contagem do número de reticulócitos, estes equipamentos automáticos fornecem novos parâmetros que são atualmente pouco utilizados na prática clínica. Esses parâmetros estão relacionados com a quantidade de RNA dos reticulócitos, que está diretamente relacionada com o grau de maturidade desses reticulócitos.³⁻⁹

Neste trabalho foram avaliadas alterações nas populações de reticulócitos e na IFR em indivíduos com indicadores laboratoriais de anemia por deficiência de ferro. O aparecimento de anemia é a última e a mais grave fase, relacionada com eritropoese deficitária em ferro, em que a produção de hemoglobina está comprometida e consequentemente a sobrevivência eritrocitária. Como mostram os nossos resultados, a anemia por deficiência de ferro está associada com um aumento de aproximadamente duas vezes da IFR e da fração de reticulócitos com níveis de fluorescência média, e a um aumento de quatro vezes da fração de reticulócitos com níveis de fluorescência alta. Estes resultados estão de acordo com os descritos anteriormente por Wells *et al*¹¹ e por Choi JW *et al*,¹² mas estão em contradição com o publicado por Domer *et al*,¹³ que refere uma diminuição na produção de eritroblastos nos doentes com anemia por deficiência de ferro.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que a anemia por deficiência de ferro está associada com aumento da proporção de IFR, relacionada com aumento da atividade eritropoética da medula óssea nestes doentes.

Abstract

The aim of this work is to investigate reticulocyte subpopulations and immature reticulocyte fractions as indicators of bone marrow erythropoietic activity in patients with iron-deficiency anemia and their correlations with traditional hematological and biochemical markers of iron deficiency. A total of 96 individuals, aged 20 to 86 years old, were included in this study. These individuals were divided into two groups: healthy controls (n=30) and iron-deficiency anemia (n=66). Complete blood counts including reticulocytes and their subpopulations, iron, ferritin and transferrin and total binding capacity were determined in all individuals. Patients with iron-deficiency anemia had an increased proportion of immature reticulocyte fractions when compared with controls ($15.02 \pm 9.70\%$ vs. $6.43 \pm 3.98\%$, $p < 0.01$, respectively). Comparing patients with healthy controls, the investigation of the subpopulations revealed higher medium-fluorescent reticulocyte ($12.69 \pm 6.69\%$ vs. $5.88 \pm 3.59\%$, respectively $p < 0.01$) and high-fluorescent reticulocyte ($1.45 [0.38-3.10]$ vs. $0.40 [0.00-0.90]$, $p < 0.05$) regions and a smaller low-fluorescent reticulocyte region ($84.83 \pm 9.65\%$ vs. $93.57 \pm$

3.98%, $p < 0.01$). Positive or negative correlations were found between reticulocyte subpopulations and red cell distribution width. No correlation was found with the other iron deficiency markers. In conclusion, iron deficiency anemia is associated with an increased proportion of immature reticulocyte fractions, reflecting an increase in erythropoietic activity in these patients. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008;30(3):188-192.

Key words: Reticulocyte subpopulations; iron deficiency; erythropoietic activity, immature reticulocyte fraction.

Referências Bibliográficas

1. Harry Smith. *Diagnosis in Pediatric Haematology*. Churchill Livingstone. New York 1996.
2. Nathan DG, Orkin SH. *Nathan and Orkin's haematology of infancy and childhood* 5th ed. WB Saunders Company. Philadelphia 1998.
3. Lewis SM, Bain JB, Bates I, Levene M. *Dacie & Lewis Practical Haematology*. Churchill Livingstone. New York 2001.
4. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, *et al.* Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol* 1994;47(8):736-9.
5. Schimenti KJ, Lacerna K, Wamble A. Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. *Cytometry* 1992;13(8):853-62.
6. Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Cornwell GG 3rd. Utility of flow cytometry reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. *Am J Haematol.* 1989;32(2):81-7.
7. van Houte AJ, Bartels PC, Schoorl M, Mulder C. Methodology-dependent variations in reticulocyte counts using manual and two different flow cytometric procedures. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994;32(11):859-63.
8. Tietz NW, Rinker AD, Morrison SR. When is a serum iron really a serum iron? A follow-up study on the status of iron measurements in serum. *Clin Chem.* 1996;42(1):109-11.
9. Peebles D, Hochberg A, Clarke TD. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol* 1981;76(5):713-7.
10. Savage R, Skoog D, Rabinovitch A. Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report from the College of American Pathologists Reticulocyte Project. *Blood Cells.* 1985;11(1):97-112.
11. Wells DA, Daigneault-Creech CA, Simrell CR. Effect of iron status on reticulocyte mean channel fluorescence. *Am J Clin Pathol.* 1992;97(1):130-4.
12. Choi JW, Pai SH. Reticulocyte subpopulations and reticulocyte maturity index (RMI) rise as body iron status falls. *Am J Hematol.* 2001;67(2):130-135.
13. Dormer P, Lau B. Erythropoiesis in iron deficiency. *Blut.* 1977;34(6):453-464.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 17/04/2007
Aceito após modificações: 22/11/2007