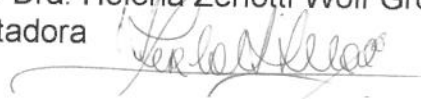


JOSÉ FERNANDO DE ALMEIDA NORONHA

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Ciências Biomédicas.

Campinas, 30 de novembro de 2001.

Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Orientadora



***RETICULÓCITOS IMATUROS COMO PREDITORES
PRECOCES DO SUCESSO DO ENXERTAMENTO
NO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
ALOGÊNICO E AUTÓLOGO.***

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

JOSÉ FERNANDO DE ALMEIDA NORONHA

***RETICULÓCITOS IMATUROS COMO PREDITORES
PRECOCES DO SUCESSO DO ENXERTAMENTO
NO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
ALOGÊNICO E AUTÓLOGO.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas,
área de Ciências Biomédicas.*

Orientadora: *Profa Dra HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTTO*

CAMPINAS

2001

UNIDADE	DE
Nº CHAMADA	TUNCAAMP
	N789
V	
TOMBO	48769
PROC.	16-837/02
C	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/05/02
Nº CPD	

CM00167139-1

BIB ID 239204

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

N781f
N789n

Noronha, José Fernando de Almeida

Reticulócitos imaturos como preditores precoces do sucesso do enxerto no transplante de medula óssea alogênico e autólogo / José Fernando de Almeida Noronha. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Medula óssea. 2. Transplante. 3. Eritrócitos. I. Helena Zerlotti Wolf Grotto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Helena Zerlotti W. Grotto

Membros:

1. Profa. Dra. Leila Anterozelo
2. Prof. Dr. Carmine Antonia de Souza
3. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/11/2001

812618008

DEDICATÓRIA

À minha mãe Irenice e filha Isabella, pelo estímulo e confiança, à minha irmã Juliana, à meu amigo Ronaldo pelo auxílio, à Dra Helena e Dr Carmino, pela paciência e palavras amigas nos momentos que precisei.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Helena Zerlotti Wolf Grotto, pela constante dedicação, paciência, apoio e sabedoria.

Ao Prof Dr Carmino Antonio de Souza e Dr Afonso Celso Vigorito, que em todos os momentos de dúvida estiveram presentes, auxiliando na parte técnica e escrita do presente trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, Gisélia, Ronaldo e Marina, pelo auxílio técnico e didático.

À todos os colegas da Divisão de Patologia Clínica e do Serviço de TMO HEMOCENTRO- UNICAMP, que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia, pelo constante apoio e compreensão, principalmente às minhas amigas Gisélia, Márcia e Dra Maria de Fátima Pereira Gilberti pelo incentivo e o Edvilson e Dulcinéia pelo auxílio na realização técnica.

Aos meus amigos da ABX-Diagnostics, principalmente a meu amigo Alfredo e amiga Rosimeire pelas concessões quando foram necessárias.

Aos professores do Departamento de Patologia Clínica que, direta ou indiretamente , contribuíram para minha formação.

Ao Departamento de Bioestatística do HEMOCENTRO-UNICAMP, principalmente aos funcionários Eliana e Roberto, pela realização da parte estatística do trabalho.

À ABX-HORIBA, França, pelo suporte técnico, científico e a concessão do equipamento PENTRA 120 RETIC e reagentes.

	<i>Pág</i>
RESUMO	xxv
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Doenças Hematológicas Neoplásicas.....	31
1.2. Anemia Aplástica.....	39
1.3. Tratamento.....	40
1.4. Transplante de Células Hematopoiéticas.....	41
1.5. Tipos de Transplante.....	44
1.6. Reticulócitos.....	46
2. OBJETIVOS	51
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	55
3.1. Casuística.....	57
3.2. Métodos.....	58
4. RESULTADOS	61
5. CAPÍTULO 1: Immature reticulocytes are the early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation.....	73
6. CAPÍTULO 2: Evaluation of reticulocyte counting using the Pentra 120 Retic automated haematology analyzer: clinical application of mean fluorescence index (MFI) in bone marrow transplantation.....	93

7. CAPÍTULO 3: O reticulócito: Um novo enfoque para um clássico parâmetro hematológico. Aplicação clínica do Índice Médio de Fluorescência (MFI) nos Transplantes de Medula Óssea e no estudo das Anemias usando Pentra 120 RETIC.....	103
8. CAPÍTULO 4: Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method.....	113
9. DISCUSSÃO	119
10. CONCLUSÕES	125
11. SUMMARY	129
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
13. APÊNDICE	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Anemia Aplástica
ANC	Contagem Absoluta de Neutrófilos (do inglês “absolute neutrophils count”)
BFU-E	Unidades Formadoras de Expansão Eritróide (do inglês “burst forming unit-erythroid”)
Cels	Células
CHCMr	Concentração da Hemoglobina Corpúscular Média dos Reticulócitos
CPP	Células Progenitoras Periféricas
CRC	Contagem Corrigida de Reticulócitos (do inglês “corrected reticulocyte count”)
CSF-G	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (do inglês “colony-stimulating factor-granulocyte”)
CSF-GM	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos (do inglês “colony stimulating factor-granulocyte/monocyte”)
DH	Doença de Hodgkin
EPO	Eritropoietina
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
GVHD	Doença do enxerto versus hospedeiro (do inglês “graft versus host disease”)

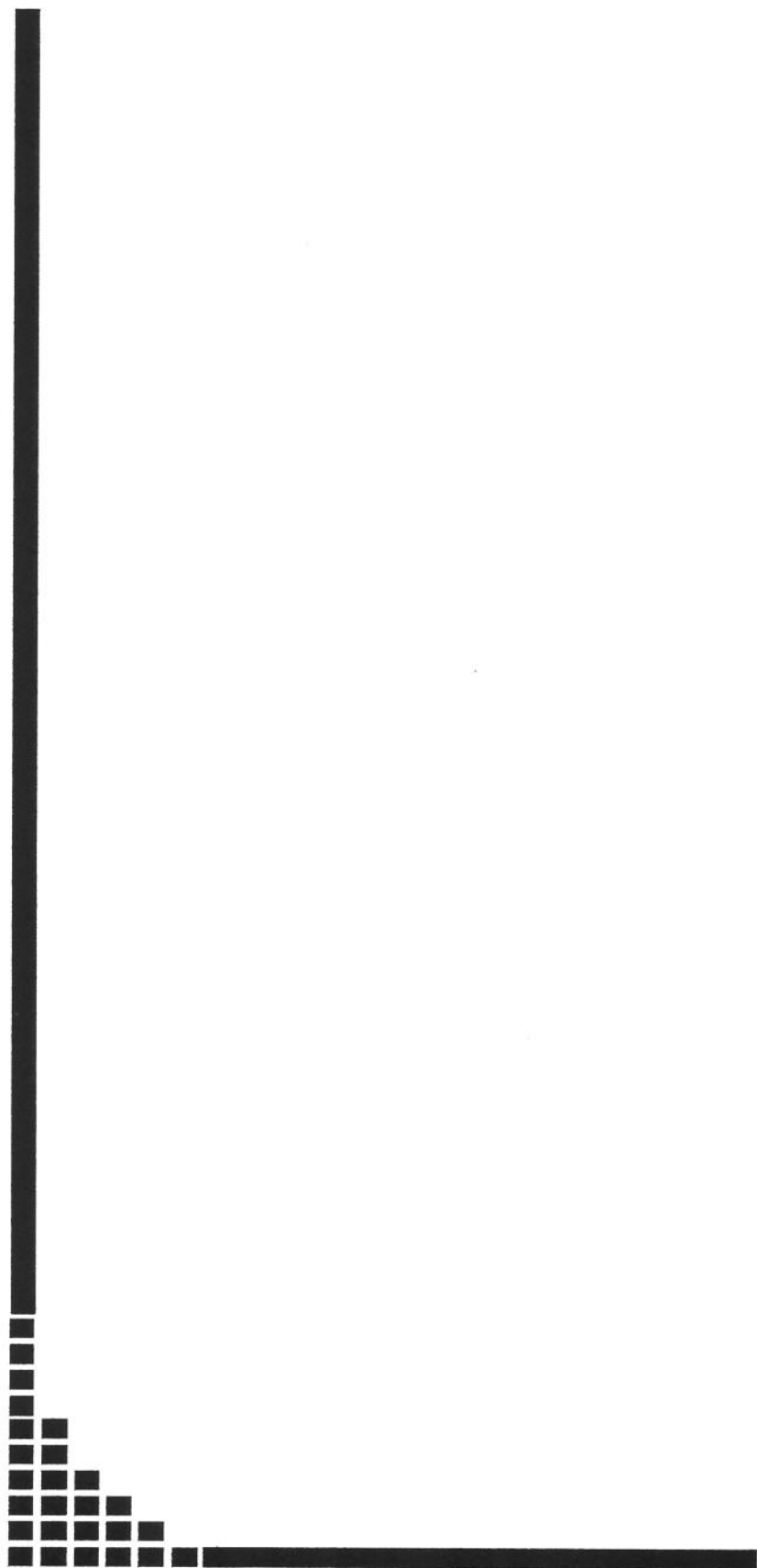
GVL	Enxerto versus leucemia (do inglês “graft versus leukemia”)
HCMr	Hemoglobina Corpuscular Média do Reticulócito
HFR ou RETH	Reticulócito de Alta Fluorescência (do inglês “high fluorescence reticulocyte”)
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade
IRF	Fração de Imaturidade do Reticulócito (do inglês “immature reticulocyte fraction”)
LFR ou RETL	Reticulócitos de Baixa Fluorescência (do inglês “low fluorescence reticulocyte”)
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MFI	Índice Médio de Fluorescência (do inglês “mean fluorescence index”)
MFR ou RETM	Reticulócitos de Média Fluorescência (do inglês “medium fluorescence reticulocyte”)

MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
NEU#	Neutrófilos em Números Absolutos
PBPC	Células Progenitoras do Sangue Periférico (do inglês “peripheral blood progenitor cells”)
PLT	Contagem de Plaquetas
RDWr	Variação do diâmetro dos reticulócitos (do inglês “Red Cell Distribution Width”)
RET#	Reticulócitos em Número Absoluto
RetAbs	Contagem Absoluta de Reticulócitos
RNA	Ácido Ribonucléico (do inglês “ribonucleic acid”)
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
TMO	Transplante de Medula Óssea
VCM	Volume Corpuscular Médio
VCMr	Volume Corpuscular Médio do Reticulócito
VCMr/VCM	Razão entre o Volume Corpuscular Médio do Reticulócito e o Volume Corpuscular Médio do Eritrócito Maduro.

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Características dos pacientes e dados do enxerto.....	57
TABELA 2 : Dados da recuperação hematológica.....	64
TABELA 3 : Análise univariada.....	70
TABELA 4 : Análise multivariada.....	71
TABELA 5 : Dados dos pacientes submetidos à TMO autólogo.....	149
TABELA 6: Dados dos pacientes submetidos à TMO alogênico.....	150

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : “Boxplots” mostrando: dia de recuperação da contagem de neutrófilos absolutos (ANC), dia de recuperação de plaquetas (PLT), dia de recuperação do MFI% e dia de recuperação da relação VCMr/VCM. As áreas em azul estão relacionadas ao intervalo de confiança de 95% com relação a mediana (linhas vermelhas).....	64
FIGURA 2A : Evolução hematológica dos parâmetros hematológicos e reticulocitários em paciente submetidos à transplante alogênico.....	65
FIGURA 2B : Evolução hematológica dos parâmetros hematológicos e reticulocitários em paciente submetidos à transplante autólogo.....	66
FIGURA 3 : Curvas de probabilidades da recuperação dos parâmetros reticulocitários em relação às recuperações de granulócitos e plaquetas nos transplantes autólogos.(MRV= VCMr/VCM).....	67
FIGURA 4 : Curvas de probabilidades da recuperação dos parâmetros reticulocitários em relação às recuperações de granulócitos e plaquetas nos transplantes alogênicos. (MRV= VCMr/VCM).....	68



RESUMO

Introdução: A contagem de reticulócitos e a determinação de sua fração de imaturidade têm mostrado ser satisfatórios na avaliação da eritropoiese após o transplante de medula óssea (TMO). O propósito deste estudo foi avaliar os parâmetros reticulocitários através da contagem de reticulócitos pela citometria de fluxo, em um grupo de pacientes que foram submetidos à TMO autólogo e alogênico. Foram estudados, o modelo de resposta do reticulócito e o valor preditivo da contagem absoluta de neutrófilos (ANC), contagem de plaquetas, número de células CD34⁺ infundidas e a fonte de enxerto em relação à resposta do reticulócito.

Material e Métodos: Foram comparadas a contagem absoluta do reticulócito (RetAbs), o índice médio de fluorescência (MFI) e a razão entre o volume corpuscular médio do reticulócito/ volume corpuscular médio do eritrócito maduro (VCMr/VCM) com os critérios convencionais (ANC e contagem de plaquetas) em 22 pacientes submetidos à TMO alogênico e 20 pacientes submetidos à TMO autólogo.

Resultados: Um aumento abrupto da razão VCMr/VCM ou uma elevação no valor do MFI foram os primeiros sinais da recuperação eritropoiética no transplante alogênico (63,8% e 22,8% dos casos, respectivamente). Em 13,6% dos casos, ambos parâmetros reticulocitários apareceram simultaneamente. Dos 20 pacientes submetidos à transplante autólogo, dezessete mostraram a recuperação da eritropoiese, representada pelos parâmetros reticulocitários, mais precoce do que quando indicada pela elevação da ANC. A recuperação de granulócitos e o enxerto de células progenitoras periféricas (CPP) foram variáveis preditivas para resposta de RetAbs no transplante alogênico. No grupo de autólogos, o alto número de células CD34⁺ infundidas, e a recuperação de plaquetas foram variáveis preditivas da resposta de RetAbs.

Conclusão: Uma elevação na população de reticulócitos imaturos é o primeiro sinal da recuperação hematopoiética pós -TMO e pode ser útil como um preditor adicional do enxerto medular.



1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS HEMATOLÓGICAS NEOPLÁSICAS

•Leucemias:

As leucemias são um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação neoplásica de leucócitos na medula óssea (MO), com ou sem envolvimento do sangue periférico. A leucocitose, a presença de células anormais circulantes e a infiltração do tecido hematopoético são frequentes, mas não invariavelmente presentes. A população leucêmica é resultante da transformação maligna de um ou mais progenitores hematopoiéticos normais. Uma mutação do DNA e a expressão alterada de genes específicos causam essa transformação, dando origem a um clone dominante de células, com grande poder de proliferação e auto renovação, levando, geralmente, à infiltração da MO e supressão da hematopoiese normal (TURGEON, 1999). As leucemias podem ser classificadas em agudas e crônicas. Nas leucemias agudas ocorre uma excessiva proliferação de progenitores primitivos, incapazes de sofrer todo o processo de maturação. Células blásticas estão presentes na MO e sangue periférico. Nas leucemias crônicas a maturação das células progenitoras é praticamente normal e predominam no sangue periférico células maduras ou parcialmente maduras (LICHTMAN, 2001).

— **Leucemia Mielóide Aguda (LMA)** – é um grupo heterogêneo de doenças clonais de células hematopoiéticas, no qual supõe-se que a transformação maligna ocorra a nível de células progenitoras com diferenciação mielóide e, em alguns casos, possivelmente células troncos pluripotentes (YAMAMOTO, 2000). Cerca de 50% dos pacientes com LMA possuem idade acima de 60 anos (HAROUSSEAU, 1998). O diagnóstico pode ser realizado morfollogicamente através da análise do sangue periférico e da MO, em esfregaços preparados pelas colorações de Romanowsky. Além disso, a imunofenotipagem tem papel fundamental na definição diagnóstica das leucemias minimamente diferenciadas (M_0) e nas megacariocíticas (M_7), onde a morfologia não permite um diagnóstico preciso (YAMAMOTO, 2000).

O grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), classificou a LMA de acordo com a morfologia, a quantificação das células em esfregaços de sangue periférico e MO e aspectos observados em diversas reações citoquímicas suplementares. Em comum, os diferentes subtipos de LMA apresentam, no mínimo, 30% das células nucleadas da MO com morfologia de célula blástica.

Os subtipos são:

- 1) Leucemia Mieloblástica Aguda (M_1) - mais de 90% das células mielóides da MO são células blásticas e o componente granulocítico/monocítico não excede 10%.
- 2) Leucemia Mieloblástica Aguda com Maturação (M_2) - de 30 a 89% das células mielóides da MO são blastos e o componente granulocítico com maturação é maior que 10%.
- 3) Leucemia Promielocítica Aguda (M_3) - a célula predominante é o promielócito, que compreende de 30 a 90% das células da medula.
- 4) Leucemia Mielomonocítica Aguda (M_4)- o componente granulocítico com maturação é maior que 20% das células mielóides da MO e, o componente monocítico, desde monoblasto até monócitos, corresponde a mais de 20% das células da medula.
- 5) Leucemia Monocítica Aguda (M_5) - o componente monocítico da MO corresponde a pelo menos 80% das células não eritróides.
- 6) Eritroleucemia (M_6) - com diferenciação predominantemente eritróide, na qual as células eritróides anormais representam mais de 50% das células nucleadas da MO; pelo menos 30% das células não eritróides são células blásticas.
- 7) Leucemia Megacariocítica Aguda (M_7) – o diagnóstico preciso é feito através de microscopia eletrônica e imunofenotipagem. Em alguns casos a morfologia é bastante sugestiva, onde blastos pequenos mostram brotamentos citoplasmáticos de plaquetas ou quando há uma população de células mais maduras, com diferenciação megacariocítica.

8) Leucemia Mieloblástica com diferenciação mínima (M_0) - não pode ser diagnosticada apenas pelas características morfológicas, porque apresenta blastos grandes e sem grânulos citoplasmáticos ou bastonetes de Auer, sugestivos de LLA L_2 e raramente de L_1 . As reações citoquímicas de mieloperoxidase e Sudan Black B são sempre negativas ou positivas em menos de 3% dos blastos (LUSIS, 2000, McKENNA, 2000). Os blastos são classificados através de reação com anticorpos monoclonais específicos (CD34, CD13 e CD33) (LICHTMAN, 2001).

— **Leucemia Mielóide Crônica (LMC)** - é uma doença que resulta da transformação maligna da célula tronco pluripotente, caracterizada pela presença de anemia, granulocitose e granulócitos imaturos no sangue periférico, basofilia, frequentemente trombocitose e esplenomegalia. Embora possa ocorrer em crianças e adolescentes, somente cerca de 10% de todos os casos desta doença ocorre em indivíduos entre 5 e 20 anos de idade. Cerca de 90% dos pacientes com LMC apresentam uma anormalidade cromossômica chamada de cromossomo Philadelphia (Ph^1), resultante de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 (LICHTMAN, 2001).

A MO é hipercelular e o tecido hematopoiético atinge de 70 a 90% do volume medular (KNOX et al., 1984, LORAND-METZE et al., 1987). Na MO a granulopoiese é dominante, onde a razão granulócitos/eritrócitos é de 10 a 30:1. A eritropoiese está geralmente diminuída e os megacariócitos estão em números normais ou aumentados. Os eosinófilos e basófilos podem estar aumentados, geralmente com aumento proporcional no sangue periférico (KELSEY & GEARY, 1988).

O diagnóstico da LMC pode ser realizado pela contagem de células e exame do esfregaço do sangue periférico. As células vermelhas estão normalmente pouco alteradas, com presença de anisocitose e poiquilocitose. Os eritroblastos são raros e a contagem de reticulócitos está normal ou pouco aumentada. Um quadro hemolítico significativo é raro (CORTES et al., 1996, ARBAJE & BETRAN, 1990).

A contagem de leucócitos no sangue periférico está geralmente elevada, em geral acima de $25 \times 10^9/L$ e metade dos pacientes ao diagnóstico possuem contagem de leucócitos acima de $100 \times 10^9/L$ (CORTES et al., 1996, ARBAJE & BETRAN, 1990). Todos estágios do desenvolvimento dos granulócitos estão presentes no sangue periférico. A média de células blásticas é de 3%, mas pode variar de 0 a 10%. Os promielócitos correspondem a cerca de 4%, enquanto mielócitos, metamielócitos e bastonetes representam cerca de 40%. Os neutrófilos segmentados correspondem a cerca de 35% do total de leucócitos (PEDERSEN, 1982).

— **Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)** - uma doença neoplásica que tem sua origem em um único progenitor linfocitário B ou T (PUI, 2001). A LLA é a mais comum das leucemias em crianças menores de 15 anos, correspondendo a 75% a 80% dos casos de leucemias na infância (BORIM et al., 2000). É uma doença heterogênea que pode variar de acordo com a linhagem celular dos blastos leucêmicos, os diferentes graus de diferenciação e das lesões genéticas moleculares que podem ocorrer. Mais de 90% das LLAs apresentam anormalidades cromossômicas (LOPES, 2000).

A proliferação e o acúmulo de células blásticas na MO resultam em supressão da hematopoiese. Anemia, neutropenia e trombocitopenia são comuns nos pacientes e a gravidade deste quadro é um reflexo do grau de substituição da medula pela leucemia linfoblástica. Contagem de leucócitos de 10 a $12 \times 10^9/L$ é observada no sangue periférico da maioria dos pacientes, com uma hiperleucocitose ($> 100 \times 10^9/L$) ocorrendo em 10 a 16% dos pacientes (PUI, 2001).

A análise citoquímica é utilizada para discriminar os blastos da LLA de LMA. A coloração, com ácido periódico de Schiff é positiva em mais de 70% dos casos de LLA, enquanto a positividade com a fosfatase ácida é observada em cerca de 70% dos casos com imunofenotipagem de células-T. Entretanto, nenhuma dessas reações são exclusivas das células leucêmicas linfóides.

As LLAs podem ser subdivididas de acordo com a classificação imunológica obtida através de anticorpos que reconhecem “clusters” de diferenciação (CD) das células. Assim, as células são classificadas, como sendo de linhagem B, em diferentes estágios de maturação: pré B jovem, pré B, pré B intermediária e B madura; e jovem, intermediária e tímócito maduro para linhagem T (PUI, 2001).

- **Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)** - ocorre devido à proliferação e acúmulo de linfócitos e caracteriza-se por uma linfocitose persistente no sangue e na MO. Os indivíduos do sexo masculino são um pouco mais afetados que os do sexo feminino (1,5/1) e maioria dos pacientes tem mais de 50 anos de idades (HAMBLIN & OSCIER, 1997).

No sangue periférico são observados linfócitos leucêmicos pequenos, redondos e monomórficos. Uma pequena porcentagem das células presentes na LLC são grandes com nucléolos proeminentes (prolinfócitos). Em alguns pacientes, é observado, uma pequena porcentagem de células com núcleos clivados e um pequeno número de células linfoplasmocitóides (HAMBLIN & OSCIER, 1997).

A MO está invariavelmente infiltrada pelos pequenos linfócitos, idênticos à aqueles encontrados no sangue. Há 4 padrões de envolvimento medular: nodular, intersticial, misto e difuso. Em linfonodos, a arquitetura nodal normal é afetada pela infiltração difusa dos mesmos linfócitos pequenos (HAMBLIN & OSCIER, 1997, MONTSERRAT & ROZMAN, 1993). A análise por citometria de fluxo é importante para distinguir a LLC-B das leucemias de origem T e de outras leucemias B diferentes da LLC (HAMBLIN & OSCIER, 1997, MONTSERRAT & ROZMAN, 1993).

Na imunofenotipagem as células B expressam CD5 e marcadores pan-B (CD19, CD20, CD22, CD23). Em casos com CD5 negativo (apenas 10%), sempre aumenta a possibilidade de outra doença, particularmente linfoma não-Hodgkin em fase leucêmica (MONTSERRAT & ROZMAN, 1993).

- **Síndromes Mielodisplásicas (SMD)** - inclui um grupo de distúrbios hematopoiéticos neoplásicos clonais, caracterizados por uma hematopoiese ineficiente, representada por defeitos qualitativos e quantitativos em todas as linhagens celulares, causando citopenias e displasias. É mais frequente

após os 50 anos de idade. As características clínicas e laboratoriais variam desde uma anemia idiopática adquirida até leucemia mielóide oligoblástica, com possibilidade de progredir para LMA franca (LICHTMAN & BRENNAN, 2001).

O grupo cooperativo FAB, classifica a SMD em subtipos considerando a proporção de blastos no sangue periférico e MO, a presença ou não de sideroblastos e a proporção de monócitos no sangue periférico.

- 1) Anemia refratária – apresenta blastos < 1% no sangue peiférico e < 5% na MO, ao lado de alterações displásicas (TUZUNER et al., 1995).
- 2) Anemia sideroblástica – apresenta-se sob duas formas discretas; a “anemia sideroblástica pura”, com displasia limitada à linhagem eritróide; e a forma “mielodislásica” com displasia nas três linhagens (GATTERMAN et al., 1990). As células blásticas são inferiores a 1% no sangue e 5% na MO. Sideroblastos compreendem mais de 15% do total dos eritroblastos na MO (HOFFBRAND & PETTIT, 1995).
- 3) Anemia refratária com excesso de blastos - definida pela presença de 5 a 20% de blastos na MO e/ou de blastos no sangue periférico < 5%. A presença de mais de 20% de blastos na MO está associado a um elevado risco de leucemia (GREENBERG et al., 1997)
- 4) Anemia refratária com excesso de blastos em transformação - A presença de bastonete de Auer, independente do número de blastos na MO (em geral entre 20 e 30%), classifica esse subtipo de SMD (SEYMOUR & ESTEY, 1995).
- 5) Leucemia mielomonocítica crônica – apresenta elevada contagem de monócitos ($> 1 \times 10^9/L$) no sangue periférico, aumento de blastos e presença de promonócitos na MO. Leucocitose é comum em 46% dos casos, e a leucopenia é rara (12%) (ZITTOUN, 1992).

A distribuição das frequências dos subtipos de SMD é: aproximadamente 23-30% dos pacientes tem anemia refratária, 15-31% anemia refratária com sideroblastos em anel, 23-32% tem anemia refratária com excesso de blastos em transformação e 11-19% tem leucemia mielomonocítica crônica (ANDERSON, 2000).

— **Mieloma Múltiplo (MM)** – resulta da proliferação de células plasmáticas neoplásicas que sintetizam quantidades anormais de imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas. O MM representa aproximadamente 1% de todas as doenças malignas e 10% dos tumores hematológicos. A idade média dos indivíduos que apresentam esta doença é de 65 anos, podendo ocasionalmente ocorrer na segunda década de vida (BARLOGIE et al., 2001).

As manifestações clínicas são heterogêneas e resultam principalmente da produção anormal de imunoglobulinas, sua deposição em diferentes órgãos, lesões líticas e hematopoiese prejudicada.

As células neoplásicas do mieloma podem substituir o tecido hematopoiético normal na MO, e apresentarem-se em diferentes graus de maturação. Anemia, hiperviscosidade sanguínea, alterações na coagulação, hiperproteinemia ou proteinúria e insuficiência renal são achados freqüentes.

Os níveis de eritropoietina sérica são relativamente baixos para o grau de anemia presente, o que é explicado pela produção abundante de citocinas, como IL-1 e TNF- β (BARLOGIE et al., 2001).

— **Doença de Hodgkin (DH)** – faz parte de um grupo de doenças malignas caracterizadas pela substituição da estrutura linfóide normal por células anormais. A DH é histologicamente separada dos outros linfomas pela presença simultânea de células benignas reativas com células neoplásicas. O grande esforço para isolar e caracterizar as células tumorais é dificultado pela associação destas células com células presentes na reação inflamatória.

Na DH, células tumorais gigantes estão presentes (células de Reed-Sternberg). São células muito grandes com dois ou mais núcleos (ou núcleos lobulados), cada um contendo uma grande inclusão como nucléolo. A presença da célula de Reed-Sternberg não determina o diagnóstico de DH, devido à similaridade morfológica com células presentes em outros processos benignos ou malignos (BANKS, 2001, PAES, 2000).

Não há um padrão laboratorial característico da DH, mas a observação das células no sangue periférico pode revelar uma granulocitose, eosinofilia, linfopenia, trombocitose ou anemia (HORNING, 2001).

Através dos padrões histológicos e da imunofenotipagem, a DH subdivide-se em 2 tipos principais, de acordo com a “Revised European-American Lymphoma Classification” (REAL): 1) a predominância linfocítica nodular, onde as células diagnósticas (“pop corn” ou LH) são CD20⁺, CD45⁺; 2) e a forma clássica, onde as células diagnósticas (Reed-Sternberg) são negativas para marcadores de células B e T e positivas para CD15⁺ e CD30⁺.

A forma clássica é subdividida em: tipo rico em linfócitos;- celularidade mista;- depleção linfocítica e;- esclerose nodular. (HARRIS et al.,1999).

— **Linfoma não Hodgkin (LNH)** - é um grupo heterogêneo de doenças malignas que surgem em componentes linfocíticos do baço, timo e linfonodos. A maioria dos LNHs são derivados de células-B e uma minoria ($\cong 15\%$) surgem das células-T (VOSE, 1999).

A patogênese do LNH é representada por uma sequência de processos envolvendo um acúmulo clonal de lesões genéticas afetando proto-oncogenes e genes supressores. A lesão genética mais comum é representada por translocações cromossômicas que alteram expressão de vários proto-oncogenes pela justaposição de sequências reguladoras heterólogas (CHIATTONE, 2000).

A abordagem inicial de um linfoma depende de sua caracterização citológica e histológica. Entretanto, a maturação de uma célula linfóide é um fenômeno complexo, com muitas etapas e o desenvolvimento de neoplasias em qualquer uma destas etapas pode resultar em doenças com evoluções clínicas e respostas terapêuticas distintas. Esse conceito

reforça a necessidade de um diagnóstico seguro do linfoma, através do uso de métodos capazes de detalhar o compartimento de origem da célula maligna, além da caracterização de aberrações genéticas específicas, intimamente associadas ao comportamento biológico da doença (GARICOBEO, 2000).

O conceito de linfomas agressivos foi consagrado pela Working Formulation (WF), que classificou os linfomas em três categorias prognósticas: 1) linfoma de baixo grau de malignidade (indolentes); 2) linfoma de grau intermediário (agressivos); 3) linfomas de alto grau (muitos agressivos). Nos linfomas agressivos estão incluídos: o linfoma folicular de grandes células, e o linfoma folicular difuso de pequenas células, o misto e o de grandes células. Entretanto, a classificação da WF vem sendo substituída pela REAL, que acrescenta aos critérios morfológicos da WF, elementos clínicos, imunofenotípicos e genéticos. Pela REAL os linfomas agressivos incluem o linfoma B de grandes células difuso, o linfoma mediastinal de grandes células, o linfoma T periférico e o linfoma anaplástico; ambos com características clínicas e curvas de sobrevida diferentes (SPECTOR, 2000).

1.2. ANEMIA APLÁSTICA (AA)

É uma síndrome clínica resultante da falência da produção de células sanguíneas pela MO. Caracteriza-se por pancitopenia, ausência de precursores hematopoiéticos na MO, cujo tecido é substituído por gordura (SHADDUCK, 2001). Pode ser classificada como adquirida ou hereditária.

A adquirida é resultante de falha da hematopoiese normal, devido à exposição à agentes químicos, tóxicos ou virais.

O tipo mais comum de AA hereditária é a anemia de Falconi, caracterizada pelo retardo no crescimento, aumento do risco de leucemia e tumores sólidos, e fragilidade cromossomal. Alguns casos de LLA na infância apresentam-se, inicialmente, como AA. Cerca de 2/3 dos casos de AA são considerados de causa idiopática.

Os critérios laboratoriais do sangue para definição da AA, são a presença no sangue periférico de no mínimo duas das seguintes alterações: hemoglobina < 10g/dl, plaquetas < $50 \times 10^9/L$, neutrófilos < $1,5 \times 10^9/L$ (KILLICK & MARSH, 2000).

Na AA, o TMO é indicado à pacientes com: 1) a forma grave da AA; 2) menos e 45-50 anos de idade (ou em pacientes com 60 anos que tiveram falha na terapia imunossupressiva e estão em boas condições clínicas); 3) HLA compatível ao do irmão. O “European Group for Blood and Marrow Transplant” (EBMT) recentemente criou modelo indicativo do TMO contra a terapia imunossupressiva, baseado na idade do paciente e contagem de neutrófilos (BACIGALUPO et al., 2000).

1.3. TRATAMENTO

O tratamento das doenças neoplásicas hematopoiéticas tem como objetivo principal alterar a capacidade de reprodução das células. Para tanto, protocolos de tratamento, com combinação de diferentes drogas em diferentes tempos têm sido estabelecidos pelos centros de investigação e tratamento desses pacientes. Drogas com diversos mecanismos de ação, como: inibição da síntese ou incorporação de bases purínicas e pirimidínicas ao DNA, interferência na formação do RNA, inibição da expressão de genes, inibição da mitose, ativação de RNAase e das células “natural killer”, entre outras.

A ação da terapia citotóxica, entretanto, não se restringe às células malignas, e diversos efeitos adversos podem ocorrer durante o tratamento, como toxicidade medular, hepática, renal e neurológica, alterações de pele, hemorragias, infecções, etc (HOFFBRAND, 1995, CHABNER, 2001).

A radioterapia é indicada principalmente nos casos de linfoma em estágios iniciais, onde a radiação é capaz de destruir os tecidos linfáticos acometidos ou massas tumorais volumosas (HOFFBRAND, 1995). Como a quimioterapia, a radioterapia atinge também células normais, causando efeitos secundários adversos.

A imunoterapia tem sido estudada como uma possibilidade a mais de tratamento da LMA e do linfoma não – Hodgkin. Anticorpos específicos são produzidos e infundidos no paciente com o objetivo de induzirem uma citotoxicidade específica (APPELBAUM, 1999, VOSE, 1999).

A terapia imunossupressiva (antilinfócitos e antitimócitos) pode ser utilizada no tratamento da Anemia Aplástica, e é indicada nos em que reação imune contra as células tronco ou progenitoras hematopoiéticas está envolvida no desenvolvimento da doença (SHADDUCK, 2001).

O transplante de células hematopoiéticas representa um enorme avanço em termos de tratamento das neoplasias hematológicas e anemia aplástica, e tem reduzido drasticamente a morbidade e mortalidade dos pacientes.

1.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS

O transplante de células hematopoiéticas tem sido usado como terapia efetiva em vários distúrbios hematológicos. Constantes implementações deste procedimento têm reduzido a morbidade e mortalidade dos pacientes. A introdução do uso de células progenitoras do sangue periférico como fonte de células tronco hematopoiéticas representa um desses avanços, assim como o uso de anticorpos monoclonais e o emprego de regimes preparativos não-mielobláticos (NEGRIN & BLUME, 2001).

Através da radiação corporal e da administração de quimioterápicos em altas doses, consegue-se erradicar a hemopoese do paciente e, por consequência, a doença, para posterior reinfusão de células tronco, provenientes da MO ou sangue periférico obtidas de doadores ou do próprio paciente, com a finalidade de restabelecer a função medular, possibilitando um aumento da sobrevida ou cura.

A falha do enxertamento (“pega medular”) é rara, mas sérios problemas podem ocorrer, como: lesão do microambiente hematopoiético pela quimioterapia, citotoxicidade por drogas, uso de medula de doadores com células T depletadas, doadores com antígenos

de histocompatibilidade (HLA) não idênticos, infecções, doença do “enxerto versus hospedeiro” (GVHD) ou a persistência da doença de base na medula óssea (PERRY & LINCH, 1996, BAYNES et al., 2000, HUNTLY et al., 1996).

Uma reconstituição hematológica completa é evidenciada pela proliferação e diferenciação das células tronco, que darão origem à células maduras de diferentes linhagens mielóides (BERENSON et al., 1991, YEAGER et al., 1986).

- **Fontes de células tronco hematopoiéticas:**

- **Medula Óssea** - É utilizada como uma fonte tradicional de células tronco hematopoiéticas para transplantes alogênico ou autólogo e a técnica de coleta da medula óssea (MO) tornou-se relativamente rotineira. A medula é aspirada na crista ilíaca posterior, após anestesia local ou geral e as células são coletadas. A dose de células coletadas para que haja um bom enxertamento não está bem definida, mas preconiza-se a coleta superior a 2×10^8 cels nucleadas/Kg de peso do receptor (700 a 1500 ml de medula em adultos) (NEGRIN & BLUME, 2001), $\geq 2 \times 10^6$ de células CD34⁺/Kg (sendo ideal número $> 5 \times 10^6$ /Kg) (VIGORITO et al., 1998).

As complicações da coleta de medula são raras e geralmente estão envolvidas com a anestesia. BUCKNER et al. (1984) em um estudo com 1270 doadores alogênicos, observaram um índice de 0,5% de casos que apresentaram complicações. JIN et al. (1985) obtiveram resultados similares em um estudo com indivíduos submetidos à coleta de medula autóloga. Normalmente, a recuperação completa da medula do doador ocorre após 16 dias da coleta (NEGRIN & BLUME, 2001).

- **Sangue Periférico** - O método de coleta de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico é feito através de leucaférese. O número destas células, extremamente reduzido em condições normais, aumenta na circulação durante a recuperação da medula óssea após tratamento quimioterápico e com o uso de fatores estimuladores de colônias (CSFs), tais como o fator estimulador de colônia de granulócitos

(CSF-G) ou o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (CSF-GM), processo conhecido como mobilização. A produção de células progenitoras durante a mobilização atinge o máximo da concentração em 4 à 7 dias após o início da estimulação com fator de crescimento e, geralmente, na primeira ou segunda coleta é obtida a concentração máxima de progenitores. O fracasso na mobilização ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos pacientes, devido ao intenso tratamento com quimioterápicos, à terapia de radiação ou a complicações da neoplasia, que causam uma mobilização pobre das células progenitoras. A identificação do fenótipo de uma célula progenitora precoce ($CD34^+$) tem permitido definir com maior segurança o número de células progenitoras necessárias à reconstituição hematopoiética. O $CD34$ é uma glicoproteína expressa na superfície das células linfo-hematopoiéticas auto-renováveis, progenitores comprometidos com as linhagens, algumas células endoteliais, fibroblastos embrionários e células do estroma medular (NEGRIN & BLUME, 2001). A produção acima de $2,5 \times 10^6$ de células $CD34^+$ /Kg de peso do paciente é necessária para uma adequada mobilização, sendo que o dobro deste valor de produção de células $CD34^+$ é ideal para uma recuperação rápida de plaquetas (BAYNES et al., 2000).

O sangue contém aproximadamente 1 a 10% das células $CD34^+$ da medula quando em estado estável. No processo de “mobilização” há uma expansão do compartimento circulante (BANDARENKO & BRECHER, 2001).

- **Sangue de Cordão Umbilical** - O sangue de cordão obtido de vaso sanguíneo umbilical e de placenta imediatamente após o parto, tem mostrado ser uma fonte rica em células tronco hematopoiéticas. A relativa imaturidade das células do cordão permite que o enxerto atravesse a barreira imunológica mais facilmente que quando outras fontes de células tronco são usadas (GLUCKMAN et al., 1997). Registros de coletas, técnicas de criopreservação, tipagem e controle de qualidade dos produtos de sangue de cordão estabelecidos, mas o uso deste tipo de fonte de células ainda é restrito (NEGRIN & BLUME, 2001).

1.5. TIPOS DE TRANSPLANTE

1) **Alogênico**- Esse tipo de transplante de medula óssea (TMO) é realizado através de doadores geneticamente diferentes. Em geral são irmãos com antígenos de histocompatibilidade compatíveis (HLA-A, -B, -DR e -DQ). Os Antígenos HLA são reconhecidos pelos linfócitos T que os identifica como células “próprias” ou “não próprias”. Como o haplótipo HLA é herdado dos progenitores, cada família pode apresentar 4 haplótipos diferentes e cada paciente tem uma chance de 25% de ter um irmão genotipicamente HLA idêntico. Atualmente têm sido realizados transplantes com medula de doadores HLA compatíveis, sem relação familiar com o paciente. Para tanto, há necessidade de bancos de medula internacionais onde doadores registrados possam fornecer a medula à pacientes desconhecidos (FERRARA & DEEG, 1991).

Na teoria, o TMO **singênico**, seria o ideal, já que medula do doador (irmão gêmeo) é completamente idêntica em todos os loci genéticos, o que diminui o risco da reação da GVHD. Por outro lado, a falta de qualquer efeito do “enxerto versus leucemia” (GVL), aumenta o risco de recaída da doença, quando comparado com o enxerto alogênico (WEIDEN et al., 1981).

O sucesso do TMO alogênico é dependente de três fatores, que são:- 1) falha do enxerto, cuja incidência é maior à medida que a incompatibilidade HLA é maior; a incompatibilidade é diminuída pelos regimes de condicionamento intensivos que, consequentemente, aumentam a toxicidade; - 2) incidência de GVHD, dependendo do grau de histocompatibilidade, número de células T do enxerto, da idade do paciente e do uso de medicamentos profiláticos; e- 3) a recorrência da malignidade, que é uma das maiores causas da falha do TMO, que demonstra a inabilidade do regime adotado para erradicar todo clone de células malignas (STORB, 1989).

2) **Autólogo**- Essa modalidade de transplante tem sido muito empregada porque, além de não ser necessário o doador, evita-se o GVHD e, consequentemente, diminui os graus de mortalidade e morbidade durante e após o TMO. Em contrapartida, as recaídas em diversas doenças é maior, já

que se perde o efeito “enxerto versus leucemia” (GVL) que propicia melhores resultados no TMO alogênico em diversas doenças. Após o conhecimento que as células tronco circulam pelo sangue periférico, do desenvolvimento de equipamentos e de filtros para separação das mesmas, de métodos quimioterápicos e do uso de fatores de crescimento que as mobilizam em maior quantidade para o sangue periférico, o método de obtenção de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico (CPP) para TMO alogênico e autólogo tem sido amplamente empregado (KORBLING et al., 1987).

As CPP são coletadas em múltiplas aféreses, após a indução da liberação de progenitores hematopoiéticos da medula óssea para o sangue periférico. Uma das vantagens da coleta de CPP sobre coleta de medula autóloga é a obtenção de um produto com menor contaminação pelas células tumorais. Além disso, a proporção de progenitores hematopoiéticos comprometidos é maior do que a obtida da MO. Essas células aumentam o número de colônias de células maduras “*in vitro*” e são os alvos principais dos fatores de crescimento CSF-G, CSF-GM, eritropoetina e interleucina 3 (REIFFERS et al., 1989, PRENTICE & BRENNER, 1988).

As CPP são úteis para a recuperação e restauração da hemopoiese após terapia mieloblástica. As técnicas de mobilização aumentam o “pool” de células progenitoras circulantes e, conseqüentemente, diminuem o número total de procedimentos de aféreses. O número de células progenitoras obtido pela leucoaférese é importante, porque a quantidade de células infundidas está correlacionada com o “ritmo” da reconstituição hematopoiética (WILLIAMS et al., 1990, KETTERER et al., 1998).

Estudos mostram que pacientes que receberam reinfusão de CPP $> 2,5 \times 10^6$ cels CD34⁺/Kg tiveram bons resultados no enxerto, enquanto aqueles que receberam o dobro deste valor mostraram uma rápida recuperação de plaquetas e um enxerto duradouro (BAYNES et al., 2000).

Atualmente são utilizados como indicadores do sucesso de transplante alogênico ou autólogo, a recuperação dos granulócitos definida pela contagem de neutrófilos acima de $0,5 \times 10^9/L$ por 2 dias consecutivos e a recuperação de plaquetas indicada pela contagem acima de $20 \times 10^9/L$ sem transfusão durante uma semana (DALAL et al., 1996).

1.6. RETICULÓCITOS

A produção de eritrócitos é um processo dinâmico em que mais de 2 milhões de novas células são produzidas por segundo. A MO, em resposta ao estímulo da eritropoetina ativa a produção de novos eritrócitos. Esse incremento na atividade eritropoiética não pode ser evidenciado precocemente na circulação periférica através da contagem total ou concentração de hemoglobina dos eritrócitos, o que acontece vários dias após o início da resposta. O primeiro indício de uma resposta medular observado na periferia é o aumento do número de reticulócitos. A primeira descrição do reticulócito data de 1865 e é atribuída à Erb, que usou ácido pícrico e ácido acético para precipitar o retículo intracelular (ROWAN et al., 1996).

O reticulócito corresponde ao estágio final da linhagem eritrocitária na medula óssea. Ele é formado quando o eritroblasto acidófilo (ortocromático) expulsa o núcleo. Embora anucleado, o reticulócito mantém o processo de síntese de hemoglobina, graças à presença de um extenso sistema ribossômico, mitocôndrias, centríolo e complexo de Golgi (CORBERAND, 1996). O RNA é gradualmente perdido num período de 4 dias, quando atravessa a parede sinusóide da medula e aparece no sangue circulante, onde acaba de sofrer o processo de maturação até hemácia madura. Quando a eritropoiese é estimulada, o tempo de maturação na medula torna-se progressivamente menor (chegando a menos de 1 dia), com a extensão da maturação no sangue periférico. Como resultado aparecem na circulação reticulócitos altamente imaturos, com grande conteúdo de RNA (ROWAN et al., 1996).

A formação característica em alguns eritrócitos que os identifica como reticulócitos, deve-se à precipitação e agregação de RNA e ribonucleoproteínas, evidenciadas quando as células são incubadas com corantes supravitais. Algumas células são fortemente positivas, enquanto outras são fracamente coradas, devido à heterogeneidade dos graus de maturação do reticulócito. Heilmeyer (1932) classificou os reticulócitos em diferentes grupos (de 0 a IV), de acordo com o padrão reticular apresentado pelas células: quanto mais imatura, maior a quantidade de conteúdo reticular (ROWAN et al., 1996). Em condições normais, 2/3 dos reticulócitos circulantes correspondem às formas mais maduras (Grupos III e IV de Heilmeyer), por vezes de difícil identificação à microscopia óptica (CORBERAND, 1996).

•**Quantificação dos Reticulócitos:** A quantificação dos reticulócitos por técnica manual (microscopia óptica), usando corantes supravitais, apresenta algumas desvantagens, como a subjetividade do observador na identificação das células, o pequeno número de elementos quantificados e a presença de interferentes que podem dificultar a identificação dos reticulócitos (CORBERAND, 1996).

A automação para contagem de reticulócitos tem proporcionado uma melhora na precisão e acurácia do método e tem possibilitado novas utilidades clínicas para seus parâmetros (BRUGNARA et al., 1997, CLARKSON & MOORE, 1976). As moléculas de RNA são marcadas com fluorocromos específicos e as células são analisadas por citometria de fluxo, que além de quantificá-las, classifica-as em diferentes graus de maturidade de acordo com a intensidade da fluorescência (CORBERAND, 1996). Este método permite que milhares de células sejam analisadas com rapidez e confiança. Assim, a variação inter e intra- observador, a imprecisão devido ao baixo número de células contadas ou devido à anomalias da coloração praticamente desaparecem. A possibilidade de subagrupar os reticulócitos em diferentes graus de maturação gerou novos parâmetros que estão sendo avaliados em diversas situações clínicas, como na diferenciação laboratorial das anemias, na resposta medular pós-quimioterapia ou TMO e como indicador do sucesso de terapia de reposição nas anemias (BRUGNARA, 1998, CORBERAND, 1996, DALAL et al., 1992, DAVIES et al., 1992, PATERAKIS et al., 1991, WATANABE et al., 1994).

Inicialmente, a contagem automática de reticulócitos podia ser obtida utilizando-se um citômetro de fluxo dedicado exclusivamente à contagem dos reticulócitos. Mais recentemente a contagem de reticulócitos tem sido integrada à sistemas automatizados de contagens de células utilizados na realização do hemograma. Este processo automático, avaliado em vários estudos (KANOLD et al., 1993, GREINIX et al., 1994, TORRES et al., 20001, CULLEN et al., 1999, GROTO et al., 1999, PATERAKIS et al., 1991, WATANABE et al., 1994), fornece a contagem de reticulócitos e dados relacionados à sua maturidade em tempo bastante curto e utilizando a mesma amostra de sangue do hemograma. Com isso, pode obter a contagem de reticulócitos em porcentagem e em número absoluto, graças à concomitante contagem de eritrócitos, além da porcentagem das três subclasses de reticulócitos, de acordo com a intensidade de fluorescência determinada pelo conteúdo de RNA. São reconhecidas 3 subpopulações de reticulócitos, em ordem decrescente de imaturidade: HFR ou RETH (alta fluorescência), MFR ou RETM (média fluorescência) e LFR ou RETL (baixa fluorescência) (BRUGNARA, 1998). O índice médio de fluorescência (RMI ou MFI) dos reticulócitos procura representar o grau de imaturidade da população reticulocitária, mas não há um consenso na literatura na maneira como defini-lo. Alguns autores consideram o valor de MFI como correspondendo à fração de alta fluorescência, enquanto outros o usam como correspondente à soma das frações de alta e média fluorescência (BRUGNARA, 1998, DAVIS et al., 1993). Tem sido igualmente proposto o índice denominado de fração dos reticulócitos imaturos (IRF) para definir a fração dos reticulócitos imaturos (DAVIS, 1996, KIM et al., 1997).

A maturação do reticulócito é acompanhada pela diminuição do tamanho celular. Como o estágio final da maturação do reticulócito acontece na circulação, os reticulócitos da MO são maiores do que no sangue periférico em cerca de 20%. O valor estimado do volume corpuscular médio dos reticulócitos (VCMr) é de 106fl em indivíduos normais. Considerando-se o volume corpuscular médio das hemácias maduras (VCM) como 88 fl, a relação VCMr/VCM normalmente é de 1,2. A presença de microreticulócitos ou macroreticulócitos tem sido apontada como uma alteração precoce durante o desenvolvimento da deficiência do ferro ou vitamina B12, respectivamente (BRUGNARA 1998). Em modelos experimentais foi demonstrado que o VCMr produzido durante uma extrema estimulação eritropoiética é cerca do dobro do observado nas hemácias maduras

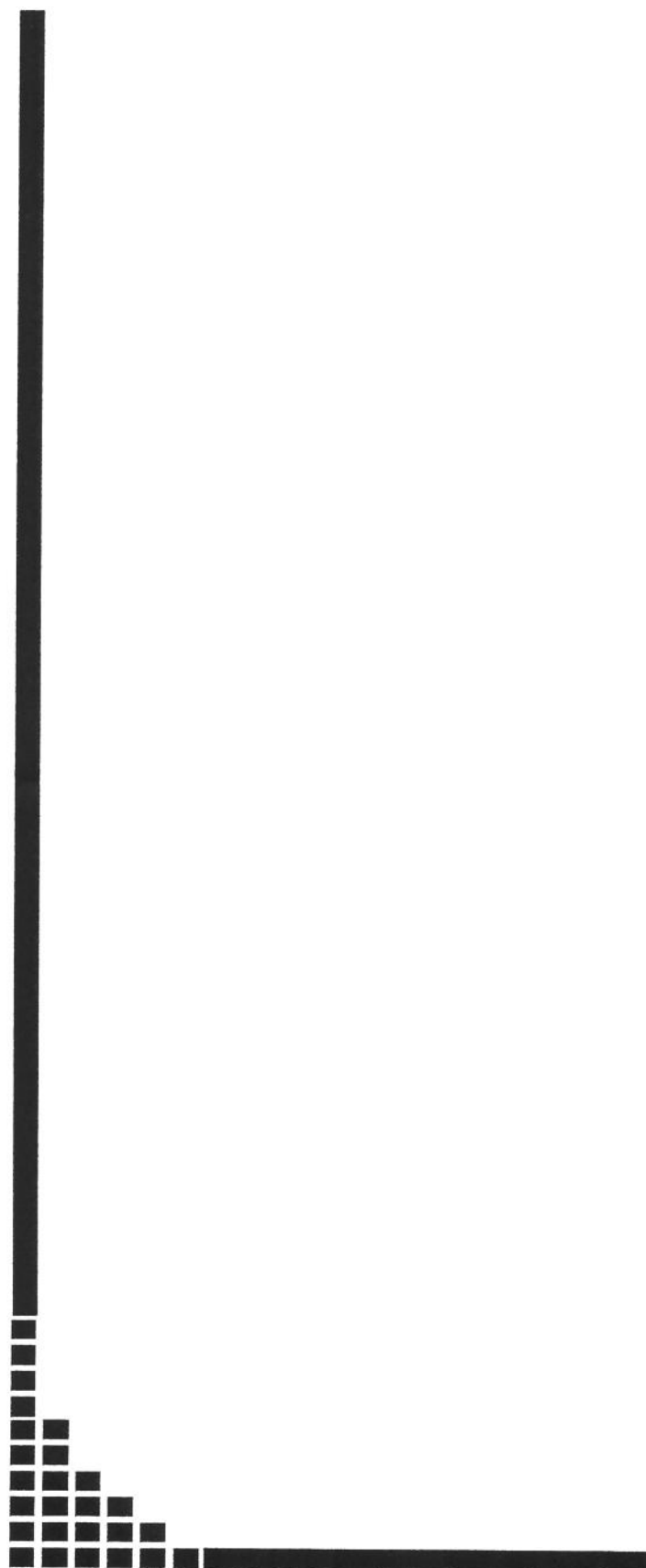
normais (BRECHER & STOHLMAN, 1961). Outros índices referentes aos reticulócitos, como a concentração de hemoglobina corpuscular média do reticulócito (CHCMr), hemoglobina corpuscular média (HCMr) e a curva de distribuição dos reticulócitos pelo tamanho das células (RDWr) são também fornecidas por alguns equipamentos hematológicos. Tem sido proposta a utilização desses novos parâmetros para estimar a sobrevivência das hemácias e o grau de hemólise em algumas situações clínicas (BRUGNARA et al., 1997) ou na detecção precoce de deficiência de ferro em pacientes submetidos à hemodiálise (CULLEN et al., 1999).

A utilização da contagem de reticulócitos como representante do restabelecimento da atividade eritropoiética da medula após o transplante tem sido bastante estudada. Os resultados sugerem que a elevação do número de reticulócitos pós-transplante pode ser um indicador precoce da recuperação medular (DAVIES et al., 1992, DAVIS et al., 1989, GREINIX et al., 1994, GROTTTO et al., 1999, GERRITSEN et al., 1996, d'ONOFRIO et al., 1995).



2. OBJETIVOS

Avaliar diversos parâmetros reticulocitários usando citometria de fluxo, em um grupo de pacientes submetidos à TMO autólogo e alogênico. Estudar o comportamento dos reticulócitos nesses dois tipos de transplante e o valor preditivo de diversas variáveis na resposta reticulocitária: número de células CD34⁺ infundidas, recuperação dos granulócitos e das plaquetas e fonte de células tronco.



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Foram estudados 26 pacientes submetidos à TMO alogênico e 21 à TMO autólogo, no período de março de 1999 a março de 2000, pelo serviço de TMO do HEMOCENTRO – UNICAMP. Destes, 4 pacientes submetidos à transplante alogênico (15,4 %) e 1 (4,8%) paciente à TMO autólogo, apresentaram morte precoce antes da recuperação de neutrófilos. Consequentemente, 22 pacientes (84,6%) com TMO alogênico e 20 (95,2%) com TMO autólogo, foram analisados (Tabela I).

Tabela 1: Características dos pacientes e dados do enxerto.

Características	Autólogo	Alogênico
Número de pacientes	20	22
Masculino	15 (75%)	16 (72,7%)
Feminino	5 (25%)	6 (27,3%)
Mediana de idade/anos (intervalo)	32,5 (12-56)	31,3 (12-59)
Diagnóstico:		
- Leucemia mielóide aguda	0	3
- Leucemia linfóide aguda	0	1
- Anemia aplástica	0	3
- Mieloma múltiplo	4	0
- Leucemia mielóide crônica	1	15
- Doença de Hodgkin	6	0
- Linfoma não-Hodgkin	9	0
Enxerto		
- MO	0	15
- CPP	19	7
- MO+CPP	1	0
Regime de Condicionamento		
- BU+Cy	0	19
- Cy	0	2
- BU+Cy+VP16	0	1
- BEAM	15	0
- MELPHALAN	5	0

Células Infundidas		
-CD 34 ⁺ cels/Kg – mediana (intervalo)	6,28 (2,03-16,45)	3,84 (1,21-9,34)
- < 2 x 10 ⁶ cels CD 34 ⁺ /Kg	0	2
- 2-5 x 10 ⁶ cels CD 34 ⁺ /Kg	3	17
- > 5 x 10 ⁶ cels CD 34 ⁺ /Kg	17	3

CPP: células progenitoras periféricas coletadas após estimulação com CSF-G; MO: medula óssea; BU: Bussulfan; Cy: Ciclofosfamida; VP16: Etoposide; BEAM: bicloronitrosourea, etoposide, Ara C e melphalan.

3.2. MÉTODOS

1. Os parâmetros hematológicos e a análise dos reticulócitos foram realizados diariamente, utilizando o aparelho hematológico PENTRA 120 RETIC (ABX- HORIBA, France). A análise de reticulócitos é realizada através das técnicas de impedância, fluoro -citometria de fluxo e utilização de argon-ion laser, que fornecem informações quanto ao número de reticulócitos, tamanho da célula e conteúdo de RNA. O RNA é marcado com o corante fluorescente *Thiazole orange*, um corante básico que atravessa a membrana e marca o RNA após 25 segundos de incubação.
2. Parâmetros reticulocitários fornecidos : contagem absoluta e em porcentagem, contagem corrigida de reticulócitos (CRC), volume corpuscular médio dos reticulócitos (VCMr), índice médio de fluorescência (MFI) e classes de maturação, dependendo do conteúdo de RNA e intensidade de fluorescência: baixo (LFR), médio (MFR) e alto (HFR) conteúdo de RNA.
3. Valores indicativos da recuperação medular: foram adotados os critérios empregados pelo Serviço de TMO, que os define como o dia em que os seguintes valores fornecidos pelo hemograma são alcançados:
 - a) recuperação ou “pega” da série granulocítica: contagem absoluta de neutrófilos (ANC) $\geq 0,5 \times 10^9/L$ durante 2 dias consecutivos.

- b) recuperação ou “pega” da série plaquetária: contagem de plaquetas acima de $20 \times 10^9/L$ sem requerimento de transfusão durante 1 semana.
- 4. Valores correspondentes à recuperação da série vermelha, através da análise dos reticulócitos:
 - a) MFI: correspondente ao primeiro valor de uma curva ascendente e este valor deve ser duas vezes maior ao do dia anterior.
 - b) Razão entre volume corpuscular médio de reticulócito / volume corpuscular médio (VCMr/VCM): um aumento abrupto do VCMr/VCM como indicador da recuperação da medula óssea.
 - c) Contagem absoluta de reticulócitos (RetAbs): $> 20 \times 10^9/L$.

5. Análise Estatística:

Foi realizada uma comparação prévia entre os grupos de transplante autólogo e de transplante alogênico através do teste de Wilcoxon, aplicado às variáveis de “pega medular”.

Para a análise das variáveis contínuas foi utilizado o teste de Regressão Linear, e teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico) para as variáveis categóricas.

A análise multivariada foi realizada através do teste de Regressão Linear e cada categoria do reticulócito foi modelada independentemente. A seleção das variáveis preditoras foi feita pelo método de “stepwise” ou por comparação de modelos usando-se o Cp de Mallows. Foi considerado para efeito de análise multivariada todas as variáveis que apresentaram $P \leq 0,25$. Finalmente, foram consideradas significantes todas as variáveis com $P \leq 0,05$ no modelo multivariado.

Foi feita a análise de resíduos para validação dos modelos: medidas de assimetria e curtose e análises gráficas (histograma, “boxplot”, densidade de probabilidade e comparação com a distribuição Normal).

Todos os cálculos foram feitos usando o “Statistical Software S-plus version 2000” da MathSoft Inc.



4. RESULTADOS

Após o início do tratamento ablativo da medula óssea, houve uma queda progressiva na contagem de neutrófilos e plaquetas, acompanhada pela queda da contagem de reticulócitos, MFI e HFR. Após este período, foi observada uma significativa elevação nos valores de MFI e VCMr/VCM em todos pacientes com recuperação medular pós-transplante. Em todos os pacientes que obtiveram sucesso no transplante alogênico, a resposta do MFI e da razão VCMr/VCM precederam a contagem de neutrófilos absolutos e contagem total de plaquetas (PLT), o mesmo acontecendo com a maioria dos pacientes do grupo autólogo (17/20). O grupo submetido a transplante autólogo mostrou resposta dos reticulócitos mais precoce que no grupo de alogênicos, acompanhando a cinética de recuperação de neutrófilos e plaquetas (Tabela II), (Figuras 1a, 1b e 2a, 2b).

As Figuras 3 e 4 mostram a comparação entre os dias de resposta dos parâmetros reticulocitários com as respostas dos neutrófilos e plaquetas, onde o MFI e a razão VCMr/VCM precedem a recuperação de neutrófilos, plaquetas e RetAbs. Como pode ser observado, as respostas dos neutrófilos e RetAbs foram semelhantes em ambos tipos de transplante.

As respostas referentes ao MFI e VCMr/VCM foram sobrepostas nos transplantes autólogos e bastante similar nos alogênicos.

Tabela 2: Dados da recuperação hematológica.

	ALOGÊNICO	AUTÓLOGO	P *
ANC - mediana dos dias (intervalo)	17.5 (9-30)	11 (9-15)	< 0,001
PLT – mediana dos dias (intervalo)	16.5 (12-53)	14 (8-56)	NS
MFI – mediana dos dias (intervalo)	11 (2-20)	8 (2-13)	0,00196
VCMr/VCM – mediana dos dias (intervalo)	9 (6-16)	7 (3-14)	NS
RetAbs – mediana dos dias (intervalo)	16,5 (11-30)	12 (6-16)	< 0,001

ANC: contagem absoluta de neutrófilos; MFI: índice médio de fluorescência; PLT: contagem de plaquetas; VCMr/VCM: razão entre volume corpuscular médio do reticulócito/volume corpuscular médio do eritrócito maduro; RetAbs: contagem absoluta de reticulócito.

* Teste de Wilcoxon.

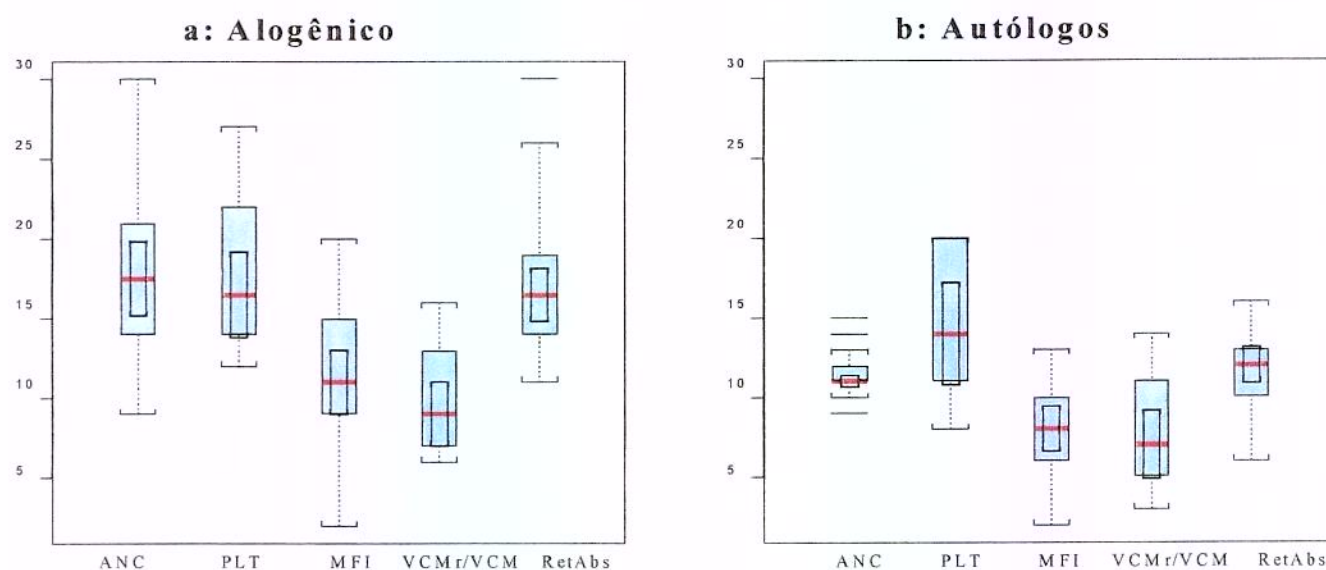
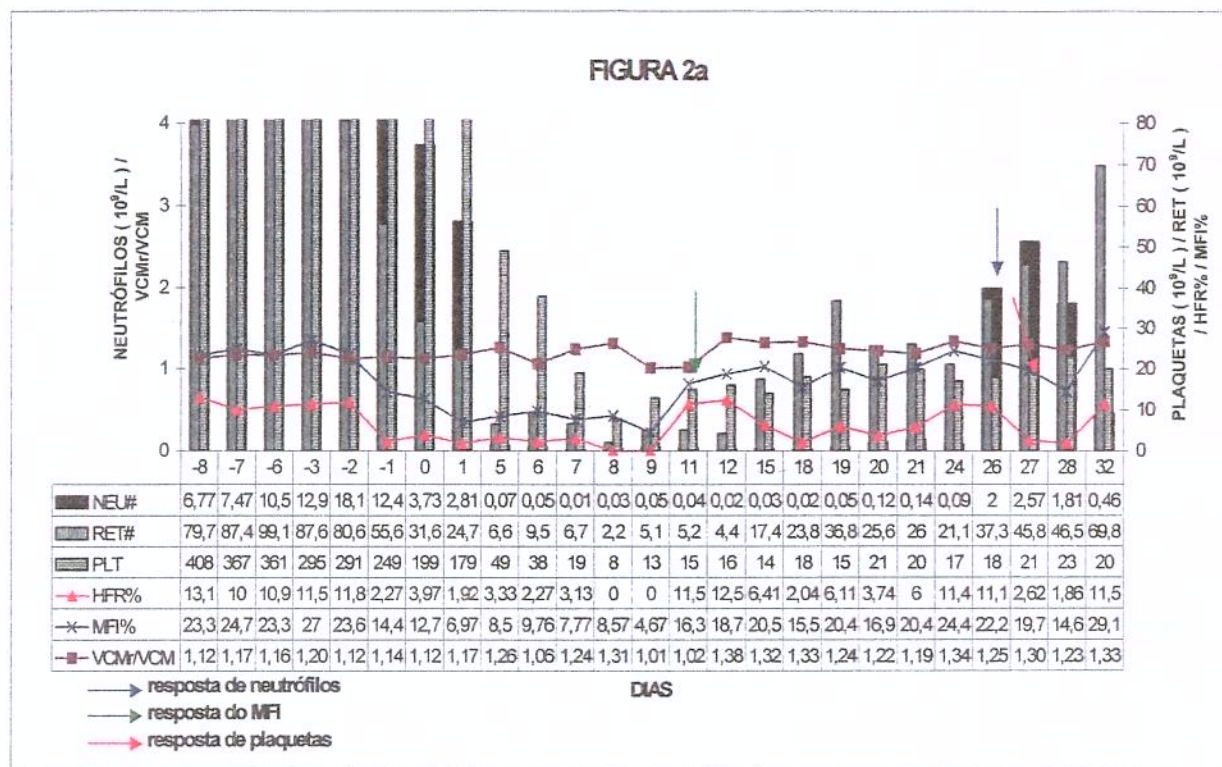
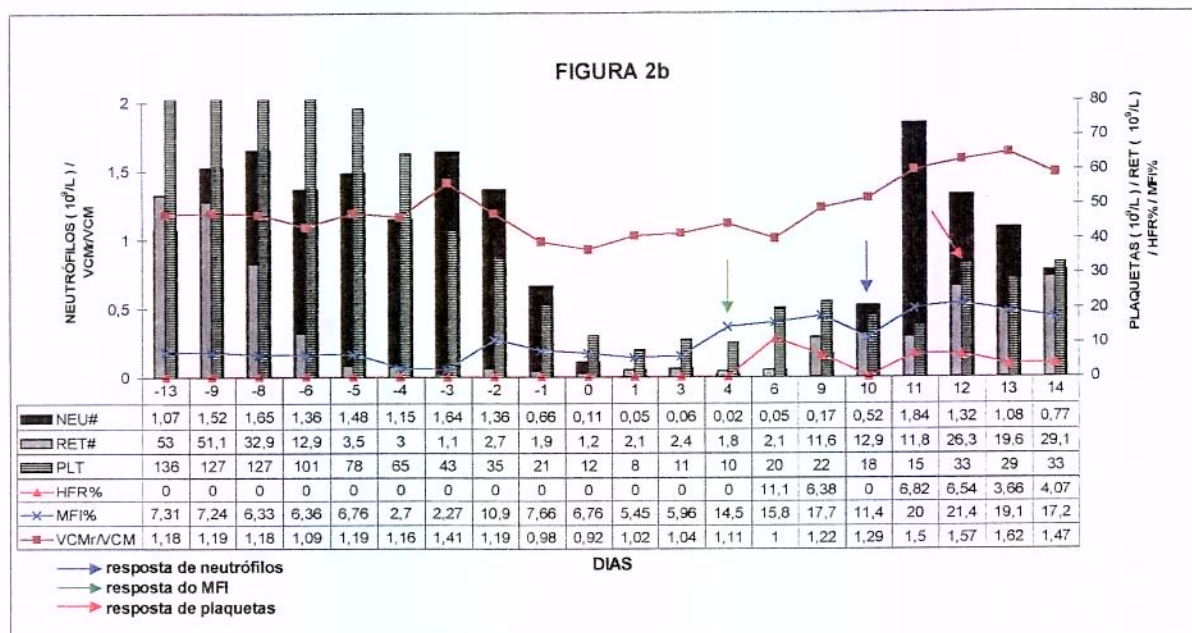


Figura 1: “Boxplots” mostrando: dia de recuperação da contagem de neutrófilos absolutos (ANC), dia de recuperação de plaquetas (PLT), dia de recuperação do MFI% e dia de recuperação da relação VCMr/VCM. As áreas em azul estão relacionadas ao intervalo de confiança de 95% com relação a mediana (linhas vermelhas).



NEU# : contagem neutrófilos absolutos; RET# : reticulócitos absolutos; PLT: contagem de plaquetas;HFR%: fração de alta fluorescência; MFI%: índice médio de fluorescência; VCMr/VCM: razão entre o volume corpuscular médio do reticulócito / volume corpuscular médio do eritrócito maduro.

Figura 2a: Evolução hematológica dos parâmetros hematológicos e reticulocitários em paciente submetidos à transplante alogênico.



NEU# : contagem neutrófilos absolutos; RET# : reticulócitos absolutos; PLT: contagem de plaquetas; HFR%: fração de alta fluorescência; MFI%: índice médio de fluorescência; VCMr/VCM: razão entre o volume corpuscular médio do reticulócito / volume corpuscular médio do eritrócito maduro.

Figura 2b: Evolução hematológica dos parâmetros hematológicos e reticulocitários em paciente submetidos à transplante autólogo.

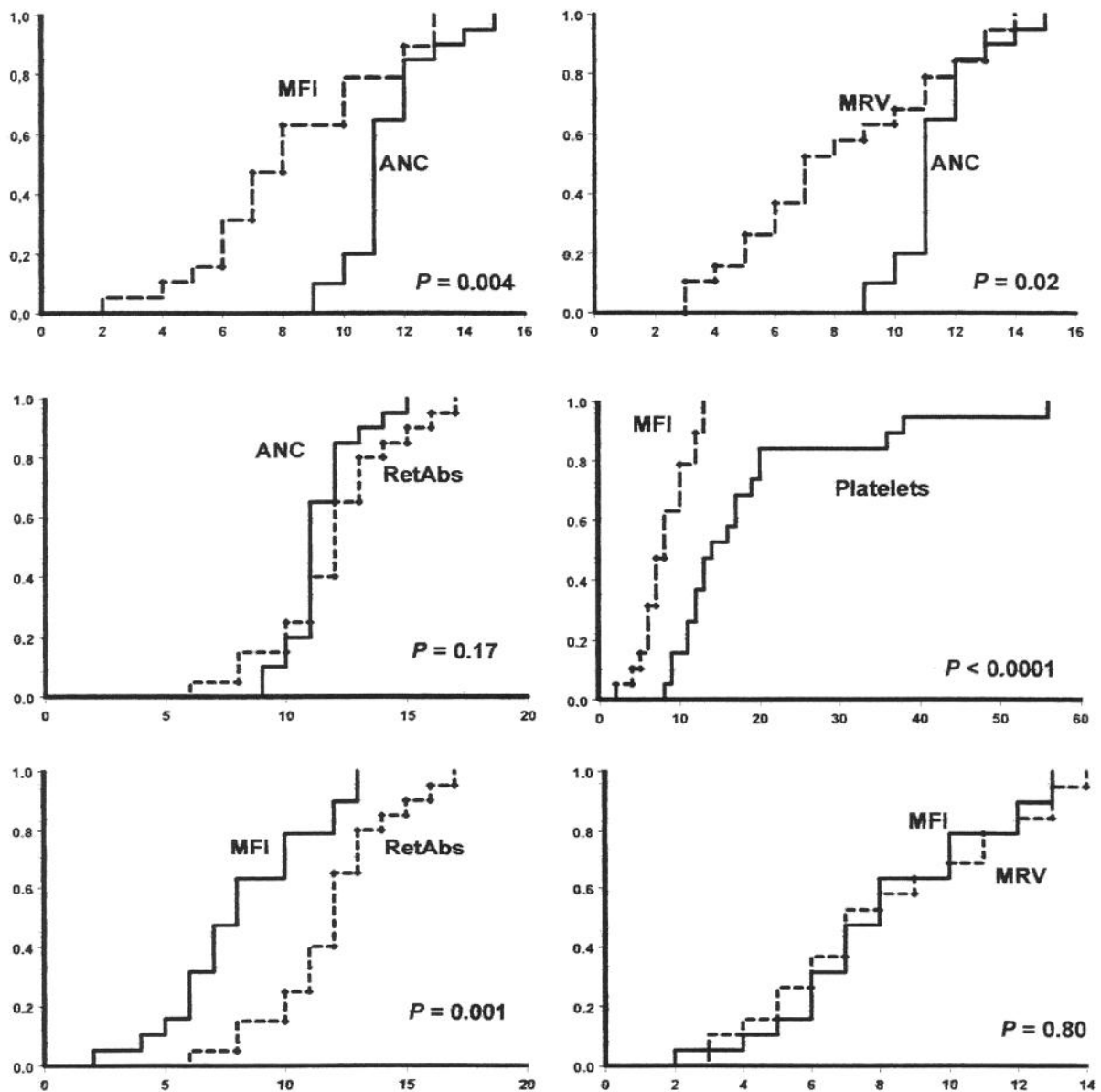


Figura 3: Curvas de probabilidades da recuperação dos parâmetros reticulocitários em relação às recuperações de granulócitos e plaquetas nos transplantes autólogos. (MRV= VCMr/VCM)

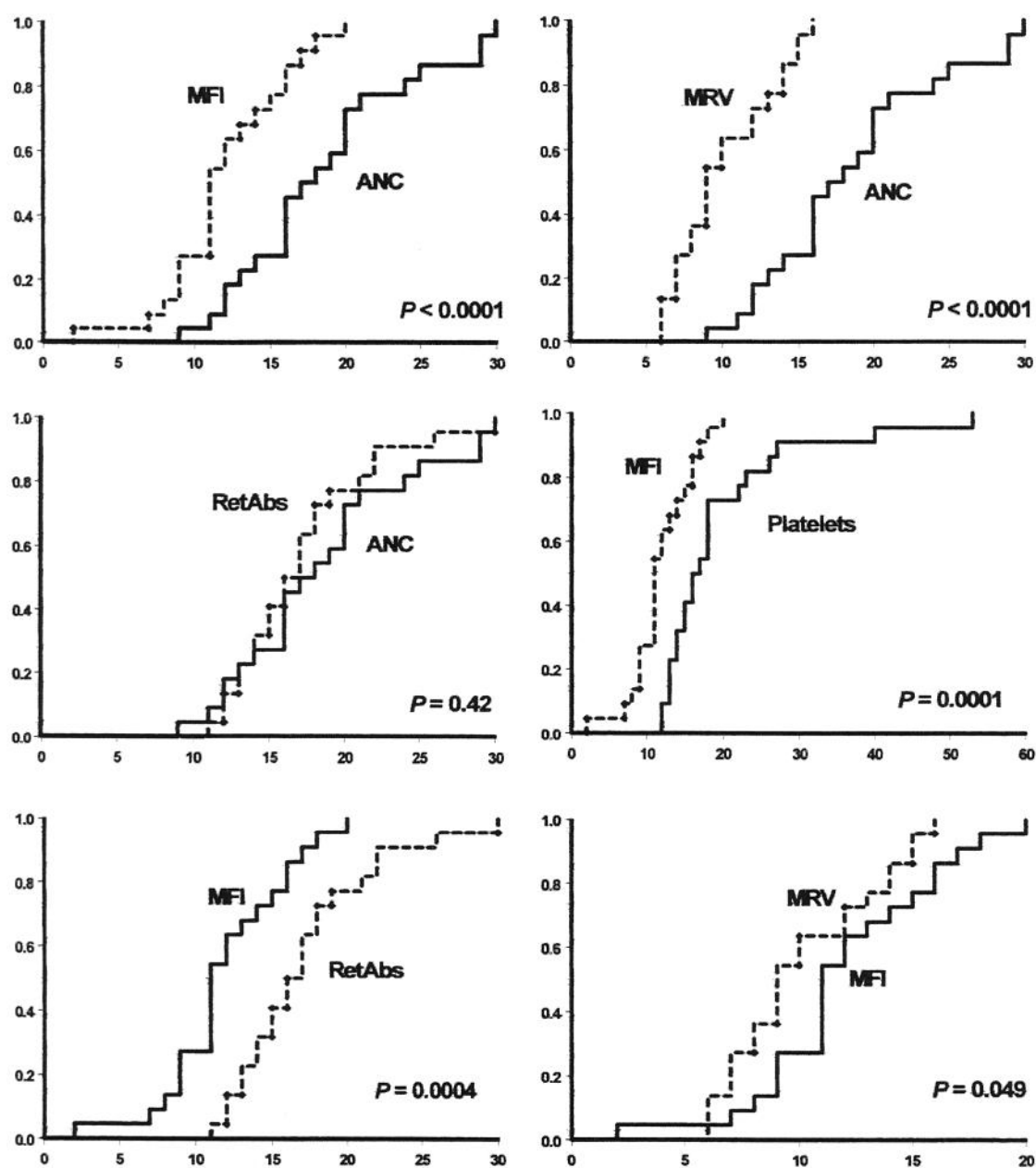


Figura 4: Curvas de probabilidades da recuperação dos parâmetros reticulocitários em relação às recuperações de granulócitos e plaquetas nos transplantes alogênicos. (MRV= VCMr/VCM)

A análise univariada não mostrou correlação entre as respostas de MFI x ANC, VCMr/VCM x ANC e VCMr/VCM x PLT, tanto nos transplantes alogênicos como autólogos; mas as respostas do MFI x PLT no transplante alogênico mostrou uma correlação. Nos transplantes autólogos foram variáveis preditivas da resposta do RetAbs, as respostas dos neutrófilos, das plaquetas e a quantidade de células CD34⁺ infundidas (Tabela III). Tendo como critério de inclusão na análise multivariada um valor de $P \leq 0,25$, foram testadas as variáveis PLT, ANC, quantidade de células CD34⁺ infundidas e fonte de células progenitoras.

A análise multivariada mostrou que a recuperação de granulócitos e o uso de CPP como fonte de células progenitoras foram variáveis preditivas dos Retabs no transplante alogênico ($P=0,000016$ e $r^2=0,687$). No grupo de transplante autólogo o número de células CD34⁺ infundidas e a recuperação de plaquetas foram variáveis preditivas para a resposta de RetAbs ($P=0,002$ e $r^2=0,844$) (Tabela IV).

Quatro pacientes com transplante alogênico não mostraram recuperação hematológica periférica de granulócitos e plaquetas. Entretanto, de acordo com nossos critérios de avaliação da resposta eritróide, em dois casos houve resposta do MFI e VCMr/VCM; em um, somente a resposta da razão VCMr/VCM e um, com aumento isolado do MFI. Um paciente com transplante autólogo mostrou recuperação granulocítica, e os parâmetros reticulocitários igualmente não mostraram sinais de resposta eritróide.

Tabela 3: Análise univariada.

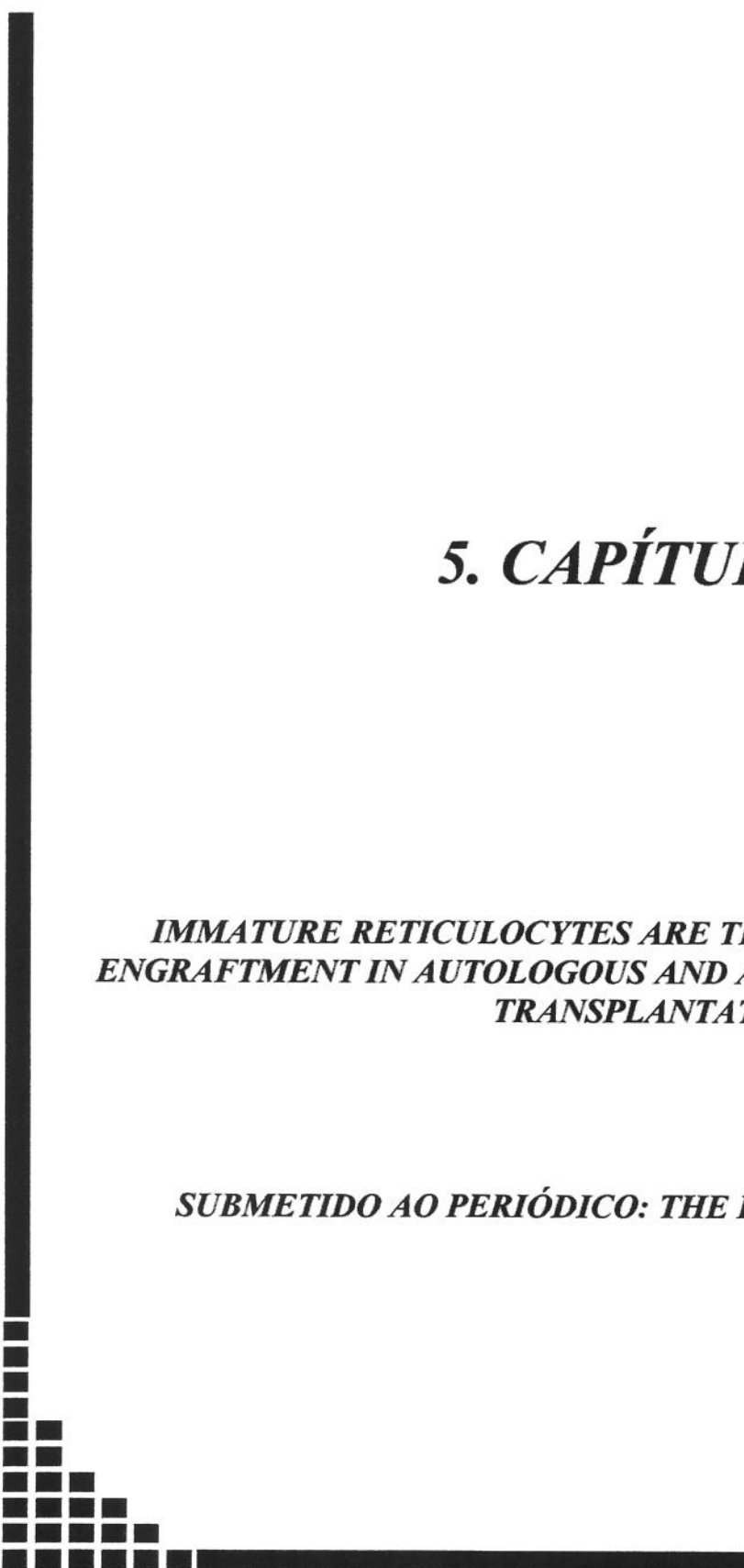
Resposta Reticulocitária	Variáveis Preditoras	Transplante Alogênico (valor de <i>P</i>)	Transplante Autólogo (valor de <i>P</i>)
<i>MFI</i>	ANC	0,0752	NS
	PLT	0,0116	NS
	CD34 ⁺	NS	NS
	Tipo de enxerto	0,0354	-
<i>VCMr/VCM</i>	ANC	0,129	NS
	PLT	0,102	NS
	CD34 ⁺	NS	NS
	Tipo de enxerto	NS	-
<i>RetAbs</i>	ANC	< 0,001	0,0830
	PLT	< 0,001	0,00359
	CD34 ⁺	0,179	0,0211
	Tipo de enxerto	0,037	-

ANC: contagem absoluta de neutrófilos; MFI: índice médio de fluorescência; PLT: contagem de plaquetas; VCMr/VCM: razão entre volume corpuscular médio do reticulócito/volume corpuscular médio do eritrócito maduro; RetAbs: contagem absoluta de reticulócito; CD34⁺: células CD34⁺ infundidas; NS: não significativo.

Tabela 4: Análise multivariada.

Tipo de Transplante	Resposta Reticulocitária	Variáveis Preditoras	Valor de P	r²
<i>Alogênico</i>	MFI	PLT	0,0116	0,279
	VCMr/VCM	PLT	0,0638	0,252
	RetAbs	ANC + PC	< 0,001	0,687
<i>Autólogo</i>	MFI	CD34 ⁺	0,0630	0,292
	VCMr/VCM	PLT	0,0711	0,189
	RetAbs	PLT + CD34 ⁺	0,00232	0,844

ANC; contagem absoluta de neutrófilos; MFI: índice médio de fluorescência; PLT: contagem de plaquetas; VCMr/VCM: razão entre volume corpuscular médio do reticulócito/volume corpuscular médio do eritrócito maduro; RetAbs: contagem absoluta de reticulócito; CD34⁺: células CD34⁺ infundidas; CP: tipo de célula progenitora.



5. CAPÍTULO 1:

***IMMATURE RETICULOCYTES ARE THE EARLY PREDICTOR OF
ENGRAFTMENT IN AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC BONE MARROW
TRANSPLANTATION.***

SUBMETIDO AO PERIÓDICO: THE HEMATOLOGY JOURNAL



The Hematology Journal

The Official Journal of the European
Haematology Association

Helena Zerlotti Wolf Grotto
Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP
Caixa Postal 6111, CEP 13083-970
Campinas, São Paulo Brazil

Editor-in-Chief

Laurent Degos
Institut d'hématologie
Hôpital Saint-Louis
1 Avenue Claude Vellefaux
75475 Paris Cedex 10 - France
Tel : + 33 1 53 72 22 36
Fax : + 33 1 42 41 14 70 / 53 72 22 35
Email : thj@chu-stlouis.fr

Managing Editor Andrea Bullock

Section Editors

Y. Beuzard Red blood cells
P. Fenaux Malignant hematology
G. Gilliland Oncogenesis
A. Green Gene regulation and therapy
F. Grosveld Red blood cells
K. Lechner Hemostasis and thrombosis
L. Moretta Immunology
J. San Miguel General hematology
N. Schmitz Transplantation

Consulting Editors

A. Biondi Paediatrics
P. Pandolfi Animal Models



European Haematology Association Board

J. Björkholm, Sweden
R. Foa, Italy
J. Goldman, United-Kingdom
A. Gratwohl, Switzerland
A. Hagenbeek, The Netherlands
D. Hoelzer, Germany
A. V. Hoffbrand, United-Kingdom
B. Löwenberg, The Netherlands
P. Mannucci, Italy
D. Meyer, France
E. Montserrat, Spain
U. Seligsohn, Israel
V. Garcia, Spain



A Division of Macmillan Press Ltd, UK
www.nature.com/thj

ms key	first author	short title	pp	fig	tab	status
001/083	Noronha	Reticulocytes and bone marrow transplantation	16	3	2	for Peer Review

August 31, 2001

Dear Contributor,

Your manuscript has been selected for Scientific Peer Review and the Editor already has several potential referees in mind. This process usually takes four to six weeks and we make every effort to ensure that referees are available before sending your manuscript for review. Your help in providing the Editor with the widest possible choice of Experts is greatly appreciated and enables us to ensure the timely review of your work.

You may wish to suggest several people whose opinions you consider to be relevant to the review of your work. (Please provide names and contact details for at least 4 experts.) This is also the time to indicate whether you anticipate any potential conflict with regard to the review of your work. The Editor does not divulge his choice of referees to authors.

Please ensure that you have provided us with a Signature Page which includes the full name and accreditation of each author, with the original signatures of all authors. This page should include a statement affirming that your work is original and has not been submitted for consideration or published elsewhere.

We will look forward to receiving the results from the Scientific Peer Review of your work.

Thank you for your interest in *The Hematology Journal*.

Sincerely,

Nancy Hamilton

Andrea Bullock

IMMATURE RETICULOCYTES ARE THE EARLY PREDICTOR OF ENGRAFTMENT IN AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

José Fernando de Almeida Noronha

Carmino Antonio de Souza

Afonso Celso Vigorito

Francisco J Penteado Aranha

Roberto Zulli

Eliana CM Miranda

Helena Zerlotti Wolf Grotto

Department of Clinical Pathology and Bone Marrow Transplantation Unit

State University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

Correspondence address:

Helena Zerlotti Wolf Grotto

Departamento de Patologia Clínica

Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP

Caixa Postal 6111, CEP 13083-970

Campinas, São Paulo, Brasil

Fax 55 19 3788 9434

Email: grotto@fcm.unicamp.br

Keywords: autologous bone marrow transplantation, allogeneic bone marrow transplantation, reticulocytes, immature reticulocyte fraction.

Running title: Reticulocytes and bone marrow transplantation.

ABSTRACT

Introduction: Reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction have shown to be adequate in the evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation (BMT). The purpose of this study was to evaluate reticulocyte parameters by means of flow cytometric reticulocyte counting in a group of patients who had undergone autologous and allogeneic BMT. Pattern of reticulocyte response and predictive value of absolute neutrophil count (ANC), platelet count, number of CD34+ cell infused and graft source for reticulocyte response have been studied.

Material and Methods: We compared absolute reticulocyte count (RetAbs), Mean fluorescence index (MFI) and Mean reticulocyte volume/ Mean corpuscular volume ratio (MRV/MCV) with conventional criteria (ANC and platelet count) in 22 allogeneic and 20 autologous BMT patients.

Results: An abrupt increase of MRV/MCV ratio or a rise in MFI value were the earliest sign of erythropoietic recovery in allogeneic transplantation (63.6% and 22.8% of cases, respectively). In 13.6% of cases both parameters presented simultaneously. All, but 3 autologous transplants showed reticulocytes parameters earlier than ANC recovery. Granulocyte recovery and peripheral blood progenitor cells (PBPC) graft were predictive variables for RetAbs response in allogeneic transplant. In autologous group high number of CD 34+ infused cells and platelet recovery were predictive variables for RetAbs response.

Conclusion: A rise in the immature reticulocyte population is the earliest sign of haematopoietic recovery post BMT and may be useful as an additional predictor of engraftment.

INTRODUCTION

Bone Marrow Transplantation (BMT) represents a real possibility of cure of a variety of malignant and non-malignant disorders. Myeloablative preparative regimens followed by infusion of haematopoietic progenitors cells have shown to be efficient in the treatment of haematological malignancies, mainly in chronic¹ and acute myeloid leukaemias². The administration of haematopoietic growth factors after BMT diminishes

the duration of neutropenia and, consequently, decreases the possibility of side effects and haematological toxicity^{3,4}. Autologous marrow transplantation and, more recently, the introduction of peripheral blood progenitors cells (PBPC) have reduced the morbidity and mortality associated with the early phase following transplantation⁵. Allogeneic PBPC may be associated with a lower risk of non-relapse death in patients with advanced disease⁶⁻⁸. Predict engraftment failure may allow the introduction of an appropriate treatment. Usually, the observation of rising peripheral blood neutrophil and platelet counts is the conventional clinical criterion of engraftment.

Reticulocyte count performed by automatic flow cytometry methods is a good representative of erythropoiesis activity and its evaluation has been suggested as an early predictor of the bone marrow regeneration after transplantation⁹⁻¹³.

In the present study we have evaluated reticulocyte parameters by means of flow cytometric reticulocyte counting, in a group of patients undergoing to autologous and allogeneic BMT for haematological disorders. Pattern of reticulocyte response and predictive value for reticulocyte response after BMT have been studied.

PATIENTS AND METHODS

In this study 26 patients underwent allogeneic BMT and 21 autologous BMT. Four (15.4%) allogeneic and 1 (4.8%) autologous BMT patients presented early death before neutrophil recovery. Consequently 22 (84.6%) allogeneic and 20 (95.2%) autologous BMT patients were analysed (Table I). All analysed patients had signed informed consent. Institutional Protocols were used and approved by local Ethical Committee.

Autologous BMT patients received granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), 5µg/kg daily, starting either on day 1 or 5 after transplant, according to Multicenter randomised trial performed at that time¹⁴. Automated reticulocyte analysis was performed daily. Haematological parameters and reticulocyte analysis were carried out using the Pentra 120 Retic (ABX-Horiba, France), a complete automated haematological analyser. Reticulocyte analysis comprises impedance, fluoro-flow cytometry and argon-laser

technologies. RNA content is analysed by a patented fluorescent dye with Thiazole orange, a membrane-permeable basic dye that binds to RNA after 25 seconds incubation time. The distribution cytogram separates red blood cells and three different reticulocyte maturity classes: low (LFR), medium (MFR) and high (HFR) RNA content. A mean fluorescence index (MFI) is obtained by the fluorescence intensity search for the mean reticulocyte channel. Further reticulocyte parameters provided by Pentra 120 Retic are: proportional (%) absolute reticulocyte count (RetAbs), corrected reticulocyte count according to anaemia degree (CRC) and mean reticulocyte volume (MRV).

Haematological recovery: peripheral blood cell counts including differential and reticulocytes counts were performed daily, before, during and after BMT. Granulocyte engraftment was defined as the first of 2 consecutive days with an absolute neutrophils count (ANC) $\geq 0.5 \times 10^9 /L$ following a post-transplant *nadir*. Platelet engraftment was defined as the first of 7 consecutive days with a platelet count $\geq 20 \times 10^9 /L$ without platelet transfusion. Criteria to define erythroid engraftment were RetAbs, MFI and MRV/MCV (Mean reticulocyte volume/mean corpuscular volume) ratio. For RetAbs we considered the day that reticulocyte count reached $20 \times 10^9 /L$ value¹⁵.

In a previous study MFI proved to be more stable and more reproducible than other maturation reticulocyte fractions⁹. Therefore, we established that parameter as representative of reticulocyte immaturity. MFI value corresponding to first day of an ascendant curve and such value being at least twice the previous one was defined as the indicator of reticulocyte recovery. In addition, an abrupt increase of MRV/MCV ratio was tested as indicator of bone marrow recovery, suggested previously by d'Onofrio *et al.*¹⁶.

STATISTICAL ANALYSIS

Measures of skewness, Kurtosis, histograms, boxplots, plots of estimate probability density function and quartile-quartile comparison with the Gaussian curve used the validation of models. Univariate analysis was performed using Linear Regression for continuous variables and non-parametric Kruskal-Wallis' test for categorical variables.

The multivariate analysis was also performed using Linear Regression and each category of reticulocyte was modelled independently. The selection of explanatory variables was made using stepwise model selection and Mallows' Cp. statistic for comparison of models. We considered as significant the P -value ≤ 0.05 . All the calculations were made in Statistical Software Splus version 2000 from MathSoft Inc.

RESULTS

The reticulocyte count, MFI and HFR fell progressively after the outset of marrow ablation. Following this period there was a significant elevation in MFI and MRV/MCV in all patients who achieved granulocyte and platelet engraftment. MFI and MRV/MCV recoveries were observed earlier than ANC and platelet count responses in all of allogeneic transplantation and in most of cases of autologous group (17 out of 20 patients) (Table 2) (Figures 1 and 2).

In our study the first event in allogeneic transplantation was an abrupt increase of MRV/MCV ratio presented in 63.6% of cases, followed by a rise in MFI value. In 13.6% of cases MFI and MRV/MCV signalled erythroid restore in the same day and 22.8% of cases MFI value preceded MRV/MCV ratio sign. Autologous transplant group presented slight difference from allogeneic group: 3 out of 20 patients (15%) showed neutrophil recovery previously to reticulocyte response. Between MFI and MRV/MCV ratio, most of the cases had MFI sign as the first indicator of marrow reconstitution and 20% had a coincidence in MFI and MRV/MCV day recovery.

In the univariate analysis of allogeneic transplant group it was observed a correlation between MFI and the following parameters: platelet recovery ($P= 0.01$), RetAbs ($P= 0.01$) and PBPC graft source ($P= 0.03$). RetAbs presented a correlation between ANC ($P< 0.0001$), platelet ($P< 0.001$) and PBPC graft source ($P= 0.03$). MRV/MCV did not have any correlation with engraftment parameters.

Multivariate analysis showed that granulocyte recovery and source of infused cells (PBPC) were predictive variables for RetAbs response ($P< 0.0001$). MFI and MRV/MCV did not have any predictive variables.

In autologous group, univariate analysis showed a significant correlation between RetAbs and platelet recovery ($P=0.003$) and number of CD34+ cells infused ($P=0.02$). MFI and MRV/MCV did not correlate with other parameters. Multivariate analysis showed that high number of CD 34 + cell and platelet recovery were predictive variables for RetAbs response ($P= 0.002$). MFI and MRV/MCV, however, did not have any predictive variables.

Figures 2 and 3 show the probability curves of reticulocyte recovery, ANC and platelet engraftment. In summary, figures show that MFI and MRV/MCV ratio preceded ANC, platelet and RetAbs recoveries in autologous and allogeneic transplants. On the other hand, no difference was observed between ANC versus RetAbs, platelet versus RetAbs and MFI versus MRV/MCV ratio.

Four recipients of allogeneic transplantation did not have granulocyte engraftment and died before day 30. However, according to our criteria, two out of four patients presented MFI plus MRV/MCV responses, one patient showed MRV/MCV response and another one presented isolated MFI increase.

One autologous transplantation patient had neither neutrophil nor reticulocyte rise. Absolute reticulocyte count reached the value of $20.0 \times 10^9/L$ in two out of five unsuccessful engraftments, but it was followed by an immediate downfall. The remainder three showed values smaller than $16,0 \times 10^9/L$ until their death.

DISCUSSION

Several studies^{13,17,18} have been reported the possibility of reticulocyte quantification and its maturity fractions to provide an earlier response in haematological recovery after BMT. Several authors have adopted different criteria as indicative of erythropoiesis response. Davies *et al.*¹⁰ and Kanold *et al.*¹⁹ considered HFR counts in percentage values as indicative of erythroid recovery, meanwhile Greinix *et al.*¹³ considered HFR counts in absolute values. Absolute reticulocyte count was adopted by van Besien *et al.*²⁰ and percentage of immature reticulocyte fraction (IRF) by Santamaria *et al.*²¹. Dalal *et al.*¹⁵ used the quantification of younger reticulocytes represented by the

reticulocyte maturity index (RMI) and defined the engraftment as the first day of a 3-day trend of $\text{RMI} \geq 2.0$. Spanish Multicentric Study Group for Haematopoietic Recovery¹⁷ recommended as criterion for erythroid response HFR value $> 3\%$. Torres *et al.*²² using Pentra 120 Retic, defined erythroid engraftment as the first post-transplantation day when MFI and IRF values reached 10 and 10%, respectively, and HFR higher than 3% for at least three consecutive days. Using the same equipment we could observe not only that patients have different baselines and *nadir* concerning MFI and HFR values, but also that it was difficult to define a MFI value as indicative of erythroid response starting. In our study two (10%) autologous and five (22%) allogeneic transplantations did not reach MFI value $\geq 10\%$, but presented an erythroid recovery, followed by ANC and platelet recoveries. According to our analysis, there is an indication of erythroid restore whenever MFI reaches the value corresponding to the double of the previous one for 3 consecutive days. We have applied the same criterion previously, using a semi-automated equipment and similar results were obtained. Rising IRF was the first haematology recovery sign in all studied patients ($n=10$), preceding the increase of neutrophils and platelets⁹.

The present study showed that MFI response was earlier in autologous (median day 8) than in allogeneic transplantation (median day 11) and it was always earlier than neutrophil recovery (median days 11 and 17.5 respectively). These data agree with those obtained by Greinix *et al.*¹³, which described the sequence of reticulocyte events in 27 allogeneic and 21 autologous marrow recipients. Highly fluorescent reticulocytes reappeared after a median time of 7 days in allogeneic and 11 days in autologous marrow graft. Other studies have reported similar results^{10,17-19}.

MFI response was earlier than RetAbs recovery. RetAbs accompanied neutrophil and platelet kinetics (Figures 2 and 3). Baiocchi *et al.*²³ and Testa *et al.*²⁴ suggested that the time between immature reticulocyte rise and total of reticulocyte response probably is due to IL-3 activity released during the myeloablative phase. Testa *et al.*²⁵ showed that highly immature reticulocyte recovery may reflect an initial wave of erythroid progenitors, followed only later by a more consistent erythroid differentiation.

Determinations of mean volume of reticulocytes can be obtained with some automated haematology analysers. An extreme erythropoietic stimulation produces larger reticulocyte due to the skipping of cell divisions in the bone marrow by the accelerated erythropoiesis and shortening of the interval between differentiation of stem cells and emergence of reticulocytes²⁶. Studies have indicated that MRV values change rapidly during experimental induction of iron deficiency and in specific replacement therapy anaemia. MCV and reticulocyte counts change later²⁷. The production of microreticulocytes and the inversion of the MRV/MCV ratio can be the first manifestation of iron-deficient erythropoiesis. The presence of macroreticulocytes has been pointed as an early finding of vitamin B12/folate deficiency²⁶. d'Onofrio *et al.*¹⁶ studied transplanted patients and observed that the suppression and regeneration of erythropoiesis are associated with a progressive decrease of MRV followed by an abrupt increasing of MRV/MCV ratio.

Allogeneic peripheral-blood cells restore neutrophil and platelet counts faster than allogeneic bone marrow^{8,28}. We tested the possibility of haematopoietic stem cell transplantation source (BM or PBPC) being a predictive variable for reticulocyte response in the allogeneic group. Multivariable analysis confirmed ANC recovery and PBPC graft as predictive variables of RetAbs ($P < 0.0001$). The analysis was restricted to allogeneic transplantation because all autologous transplantation patients had received PBPC. Our results are in agreement with those obtained by Santamaria *et al.*²¹ and d'Onofrio *et al.*¹⁸.

Regarding autologous group we have found a relationship between RetAbs and CD34+ infused cells, emphasising the importance of mobilisation regimen and the number of progenitors cells collected in the erythropoietic recovery.

Our results confirm the rising of immature reticulocyte population as being the earliest sign of haematopoietic recovery and the use of automated reticulocyte quantification and immaturity fractions may be integrated in clinical protocols in order to evaluate bone marrow reconstitution after transplantation.

Table I: Patient's characteristics and graft data.

Characteristics	Autologous	Allogeneic
Number of patients	20	22
Male	15 (75%)	16 (72.7%)
Female	5 (25%)	6 (27.3%)
Median age/years (range)	32.5 (12-56)	31.3 (12-59)
Diagnosis:		
- Acute myeloid leukaemia	0	3
- Acute lymphocyte leukaemia	0	1
- Aplastic anaemia	0	3
- Multiple myeloma	4	0
- Chronic Myeloid leukaemia	1	15
- Hodgkin's disease	6	0
- Non Hodgkin lymphoma	9	0
Graft		
- BM	0	15
- PBPC	19	7
- BM+PBPC	1	0
Conditioning regimen		
- BU+CY	0	19
- CY	0	2
- BU+CY+VP16	0	1
- BEAM	15	0
- MELPHALAN	5	0
Infused cells		
-CD 34 ⁺ cells/Kg – median (range)	6.28 (2.03-16.45)	3.84 (1.21-9.34)
- < 2 x 10 ⁶ CD 34 ⁺ cells/Kg	0	2
- 2-5 x 10 ⁶ CD 34 ⁺ cells/Kg	3	17
- > 5 x 10 ⁶ CD 34 ⁺ cells/Kg	17	3

PBPC: peripheral blood progenitor cells collected after stimulation with G-CSF; BM: bone marrow; BU: Busulfan; Cy: Cyclophosphamine; VP16: Etoposide; BEAM: Carmustine/Cytarabine/ Melphalan regimen.

Table 2: Haematological recovery data.

	ALLOGENEIC	AUTOLOGOUS
ANC - median days (range)	17.5 (9-30)	11 (9-15)
PLATELETS - median days (range)	16.5 (12-53)	14 (8-56)
MFI - median days (range)	11 (2-20)	8 (2-13)
MRV/MCV - median days (range)	9 (6-16)	7 (3-14)
RetAbs - median days (range)	16,5 (11-30)	12 (6-16)

ANC: absolute neutrophil count; MFI: mean fluorescence index; MRV/MCV: mean reticulocyte volume/mean corpuscular volume; RetAbs: absolute reticulocyte count.

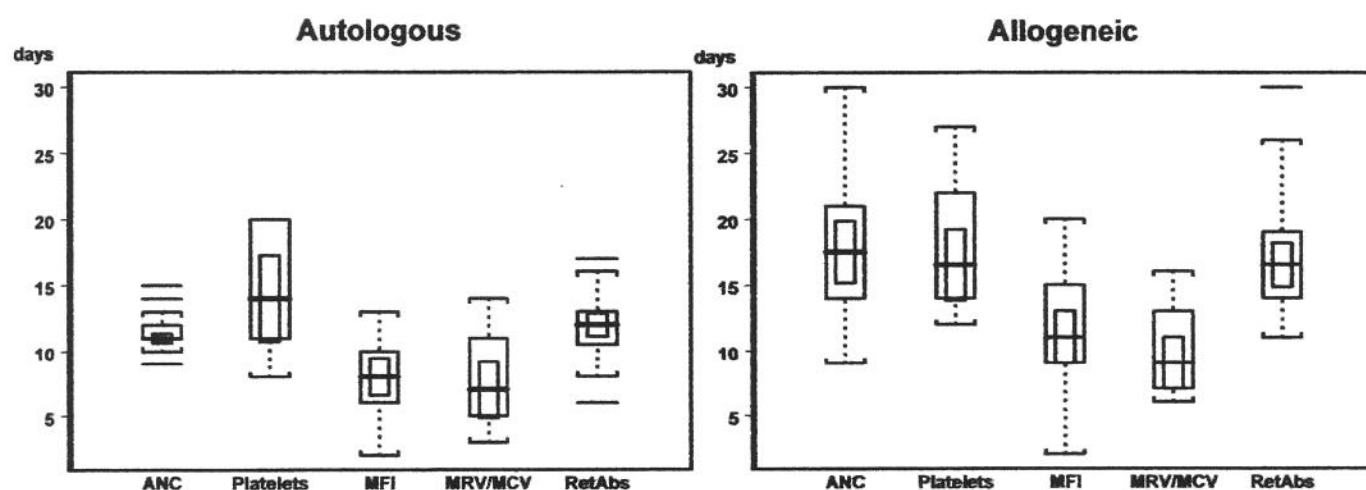


Figure 1: Boxplots related to engraftment data

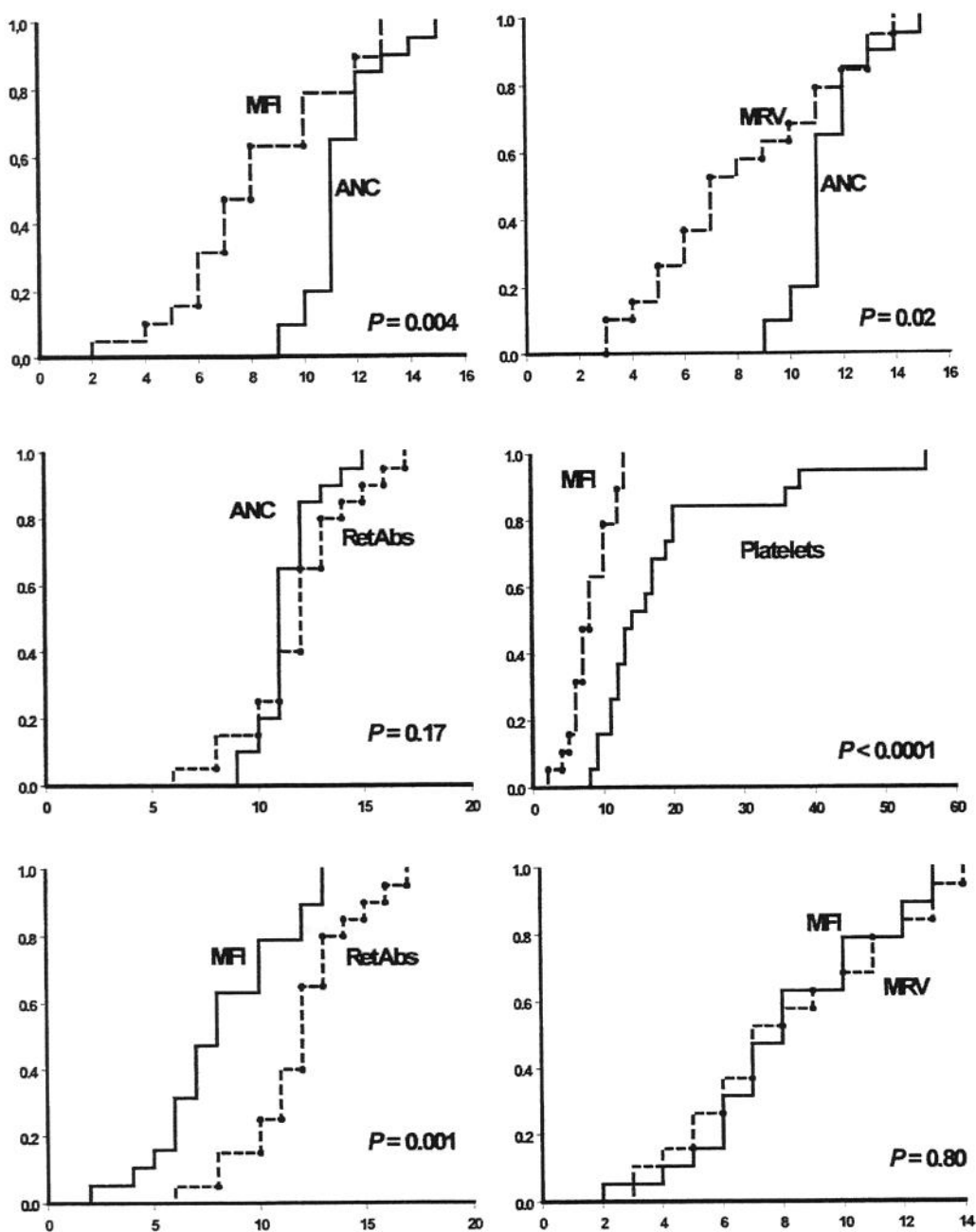


Figure 2: Probability of Reticulocyte parameters recovery and engraftment data (ANC and platelets) in Autologous transplants

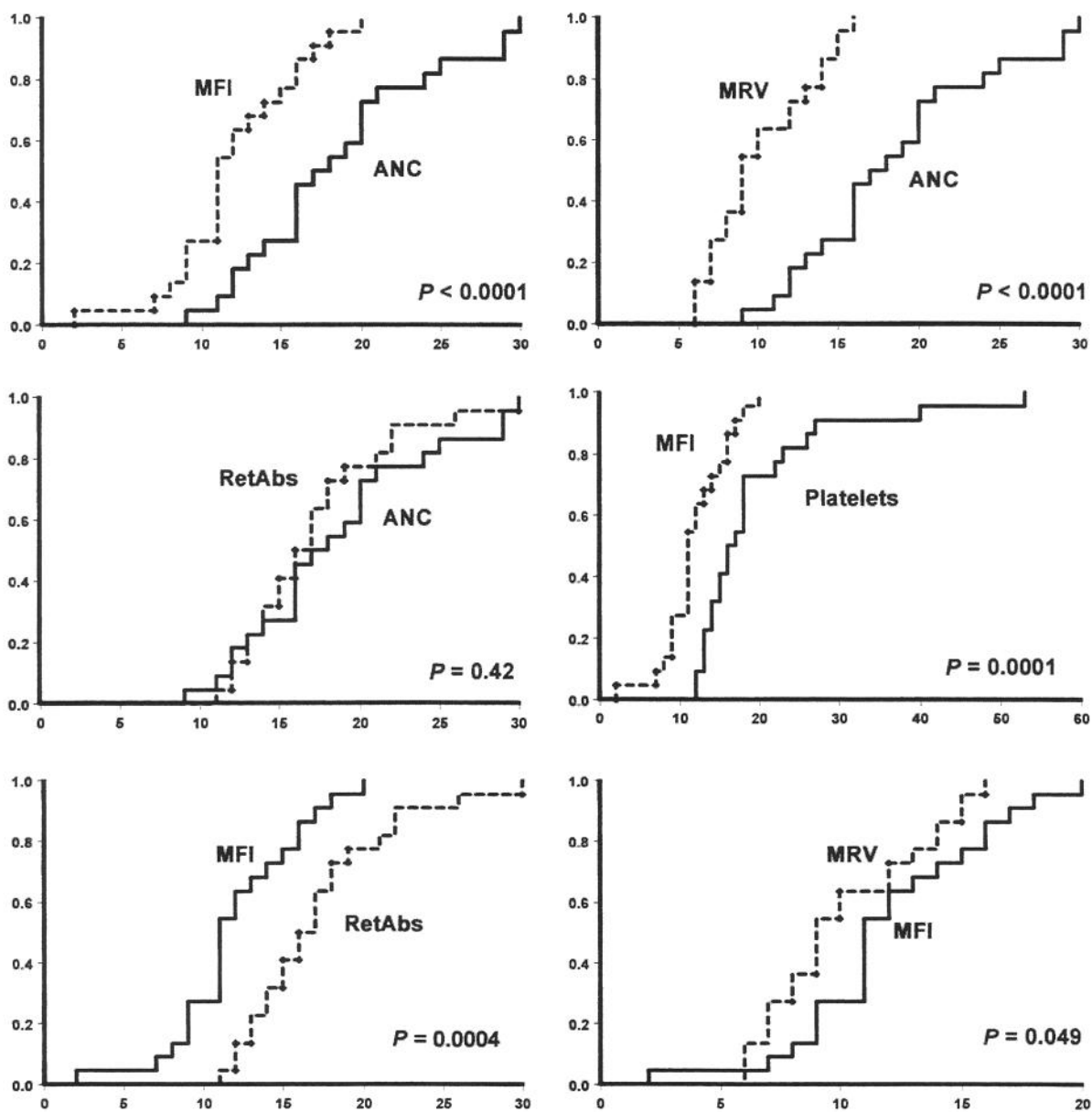


Figure 3 - Probability of Reticulocyte parameters recovery and engraftment data (ANC and platelets) in Allogeneic transplants

REFERENCES

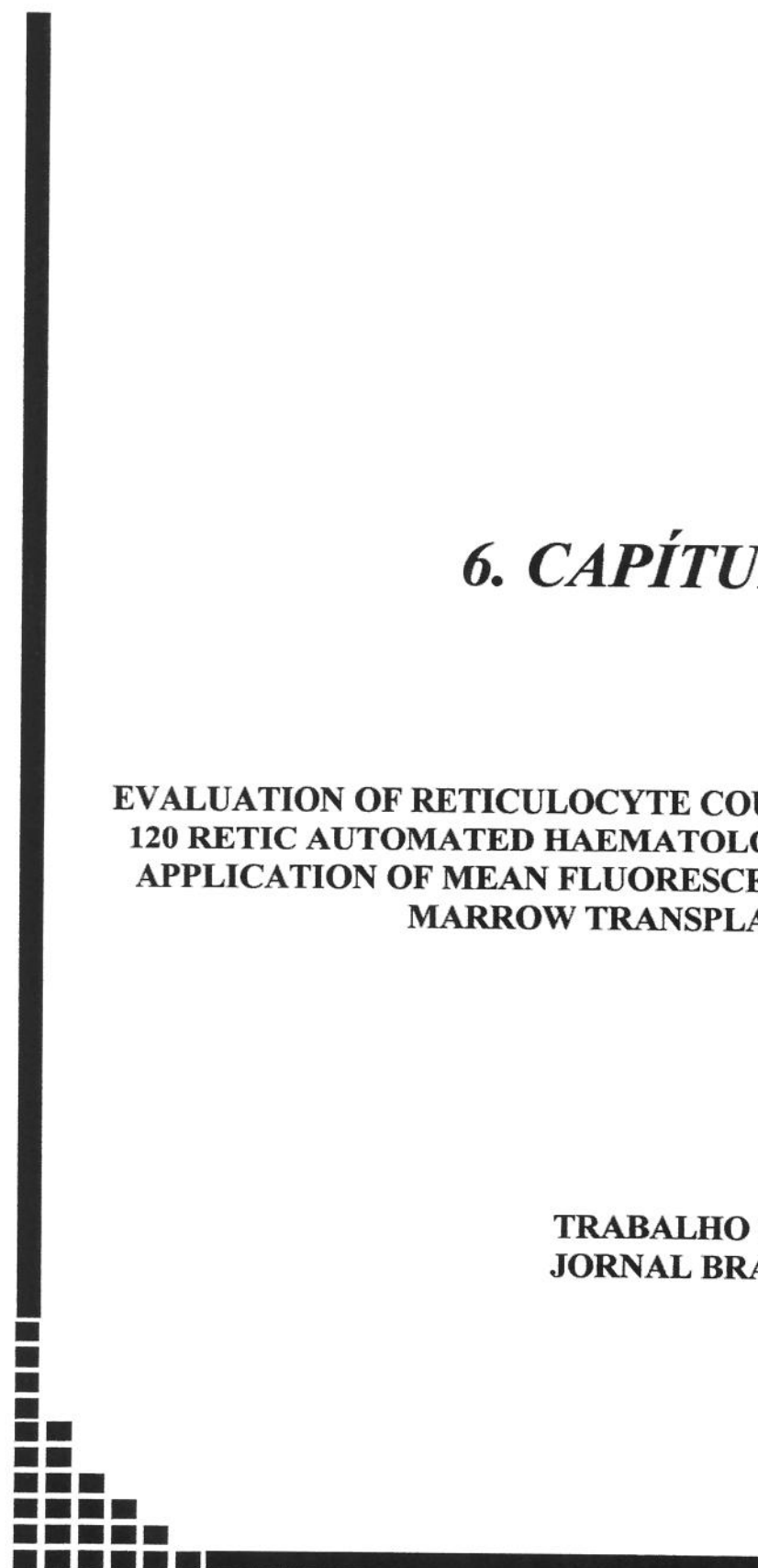
- 1 Carella AM, Celesti L, Lerma E, Dejana A, Frassoni F. Stem-cell mobilization for autografting in chronic myeloid leukemia. *Blood* 11 (3): 154, 1997.
- 2 Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, Leoni F, Damasio E, Visani G, Papa G, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *New England Journal Medicine* 332 (4): 217, 1995.
- 3 Socinski MA, Cannistra AS, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte -macrophage colony stimulating factor expands the circulating haematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1 (8596): 1194, 1988.
- 4 Rabinowe SN, Neuberg D, Bierman PJ, Vose JM, Nemunaitis J, Singer JW, Freed AS, Mauch P, Demetri G, Onetto N, et al. Long-term follow-up of phase III study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid malignancies. *Blood* 81 (7): 1903,1993.
- 5 Nemunaitis J, Singer JW, Buckner CD, Durnam D, Epstein C, Hill R, Storb R, Thomas ED, Appelbaum FR. Use of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in graft failure after bone marrow transplantation. *Blood* 76 (1): 245, 1990.
- 6 Champlin RE, Schmitz N, Horowitz M, Chaquis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR Jr, Hertenstein B, Klein JP, Montserrat E, Zhang MJ, Ringden O, Tomany SC, Rowlings PA, Van Hoef ME, Gratwohl A. Blood stem cells versus bone marrow as a source of haematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 95: 3702, 2000.

- 7 Williams SF, Bitran JD, Richards JM, De Christopher PJ, Barker E, Conant J, Colomb HM, Orlina AR. Peripheral blood derived stem cell collection for use in autologous transplantation after high dose chemotherapy: an alternative approach. *Bone Marrow Transplantation* **10**: 409, 1990.
- 8 Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers MED, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Blume K, Heimfield S, Rowley S, Appelbaum FR. Transplantation of Bone Marrow as compared Peripheral-Blood Cells from HLA-identical relatives in patients with Haematologic cancers. *The New England Journal of Medicine* **344**: 175, 2001.
- 9 Grotto HZW, Vigorito AC, Noronha JFA, Lima GALM. Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment . Evaluation of a semi-automated reticulocyte method. *Clinical Laboratory Haematology* **21**: 285, 1999.
- 10 Davies SV, Cavill I, Bentley N, Fegan CD, Poynton CH, Whittaker JÁ. Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. *British Journal of Haematology* **81**: 12, 1992.
- 11 Gerritsen EJ, Stam ED, Van den Berg H, Haraldsson A, Van Tol MJ, Vossen JM. Follow-up of leukocyte and reticulocyte counts for the prediction of early graft failure after non-HLA-identical BMT in children. *Bone Marrow Transplantation* **17** (5): 781, 1996.
- 12 Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Cornwell III GG. Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. *American Journal of Hematology* **32**: 81, 1989.

- 13 Greinix HT, Linkesch W, Keil F, Kalhs P, Schwarzingner I, Schneider B, Oesterreicher C, Brugger S, Kapiotis S, Lechner K. Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. *Bone Marrow Transplantation* **14**: 307, 1994.
- 14 Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, Azevedo AM, Eid KA, Aranha FJP, Lorand-Metze I, Oliveira GB, Correa ME, Reis AR, Miranda EC, De Souza CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation* **22**: 1145, 1998.
- 15 Dalal BI, Stockford GR, Naimam SC, Spinelli, Philips GL. Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplantation* **17**: 91, 1996.
- 16 d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M, Micciulli G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood* **85** (3): 818, 1995.
- 17 Spanish Multicentric Study Group for Haematopoietic Recovery. Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of haematologic recovery. *European Journal of Haematology* **53**: 293, 1994.
- 18 d'Onofrio G, Tichelli A, Foures C, Theodorsen L. Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clinical Laboratory Haematology* **18**: 45, 1996.
- 19 Kanold J, Bezou MJ, Coulet M, Quainon F, Malpuech G, Travade Ph, Deméocq F. Evaluation of erythropoietic / hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional peripheral blood cell counting. *Bone Marrow Transplantation* **11**: 313, 1993.

- 20 van Besien K, Nichols CR, Tricot G, Langefeld C, Miller ME, Akard L, English DK, Graves VL, Cheerva A, McCarthy LJ, Jansen J. Characteristics of engraftment after repeated autologous bone marrow transplantation. *Experimental Hematology* **18**: 785, 1990.
- 21 Santamaria A, Martino R, Bellido M, Remacha AF. Reticulocyte recovery is faster in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation than in bone marrow transplantation. *European Journal Haematology* **58** (5): 362, 1997. Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Cornwell III GG. Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. *American Journal of Hematology* **32**: 81, 1989.
- 22 Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martin C, Valls C, Nevado L, Rodriguez A, Casaño J, Martinez F, Gómez P. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Hematology* **86**: 24, 2001.
- 23 Baiocchi G, Scambia G, Benedetti P, Menichella G, Testa U, Pierelli L, Martucci R, Foddai ML, Bizzi B, Mancuso S, Peschle C. Autologous stem cell transplantation: sequential production of hematopoietic cytokines underlying granulocyte . *Cancer Research* **55**: 1297, 1993.
- 24 Testa U, Martucci R, Rutella S, Scambia G, Sica S, Benedetti PP, Pierelli L, Menichella G, Leone G, Mancuso S, et al. Autologous stem cell transplantation: release of early and late acting growth factors relates with hematopoietic ablation and recovery. *Blood* **84** (10): 3532, 1994.
- 25 Testa U, Rutella S, Martucci R, Scambia G, d'Onofrio G, Pierelli L, Sica S, Benedetti PL, Menichella G, Foti E, Mastroberardino G, Mancuso S, Leone G, Peschle C. Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. *British Journal of Haematology* **96**: 762, 1997.

- 26 Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *International Journal Clinical Laboratory Research* **28**: 1, 1998.
- 27 Clarkson DR, Moore EM. Reticulocyte size in nutritional anemias. *Blood* **48**: 669,1976.
- 28 Vigorito AC, Marques JFC Jr, Aranha FJP, Oliveira GB, Miranda ECM, Carmino AS. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies: an update. *Hematologica* **86**: 665,2001.



6. CAPÍTULO 2

**EVALUATION OF RETICULOCYTE COUNTING USING THE PENTRA
120 RETIC AUTOMATED HAEMATOLOGY ANALYZER: CLINICAL
APPLICATION OF MEAN FLUORESCENCE INDEX (MFI) IN BONE
MARROW TRANSPLANTATION.**

**TRABALHO PUBLICADO NO PERIÓDICO:
JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA 36:
234 – 240, 2000.**

Recebido em 28/04/00
Aceito para publicação em 21/08/00

Evaluation of reticulocyte counting using the Pentra 120 Retic automated haematology analyzer: clinical application of mean fluorescence index (MFI) in bone marrow transplantation

Avaliação da contagem de reticulócitos usando o analisador hematológico Pentra 120 Retic: aplicação clínica do índice médio de fluorescência (MFI) no transplante de medula óssea

Helena H.Z. Grotto¹
José Fernando Noronha²

key words

Reticulocyte count
Immature reticulocyte fraction
Automated hematology
analyzer
Bone marrow transplantation
Automation

abstract

Objective: To evaluate the Pentra 120 Retic hematology analyzer performance in a routine laboratory and the utility of the mean fluorescence index (MFI) parameter as indicator of bone marrow recovery after transplantation (BMT). **Material and methods:** Pentra 120 Retic analyses reticulocytes by flow cytometry using Thiazole orange as RNA dye. **1)** Evaluation instrument protocol: NCCLS (1993); **2)** MFI and BMT: reticulocyte count and immaturity fractions were monitored in fifteen patients undergoing BMT. **Results:** **1)** Equipment evaluation: repeatability test showed an acceptable coefficient of variation (CV) = 5.5 and 11.6% for reticulocyte counts in samples with normal values and CV = 4.47 and 11.6% in samples with high reticulocyte values. In samples with reticulocyte below 0.5% the CVs were higher (CV = 18.5 and 22.4%), but without clinical implication. Among maturity fractions, the MFI showed to be the most precise one, with CV = 6.9 and 11.9% in normal samples, CV = 3.0 and 3.55% in reticulocytosis and CV = 28.3 and 38.5% in reticulocytopenia samples. Linearity and carry-over tests produced $r = 0.99$ and contamination < 5%, respectively. Comparison with Cell Dyn 3500 revealed a concordance between both analyzers concerning reticulocyte count in % and absolute values. Analysis of samples presenting Howell-Jolly bodies, nucleated red blood cells and basophilic stippling suggested a non-interference of these abnormalities in reticulocyte identification; **2)** MFI and BMT: MFI values showed a significant increase in eleven patients and the response preceded neutrophil and platelet recovery. Four of fifteen patients had an inadequate engraftment and did not present either platelet/neutrophil or reticulocyte recoveries. **Conclusion:** Pentra 120 Retic provides results with precision and quality and it is indicated for routine use. Reticulocyte immaturity parameters are not only useful but also indicators of early predictive engraftments.

Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 95-100, 2000

234

Jornal Brasileiro de Patologia

resumo

unitermos

Objetivo: Avaliar o desempenho do analisador hematológico Pentra 120 Retic na rotina laboratorial e a utilidade do índice médio de fluorescência (MFI) como indicador da recuperação medular após o transplante de medula óssea (TMO). **Material e métodos:** O Pentra 120 Retic analisa os reticulócitos por meio de citometria de fluxo, usando o Thiazole Orange como marcador do RNA. **1)** Protocolo de avaliação do instrumento: NCCLS (1993); **2)** MFI e TMO: contagem dos reticulócitos e as frações de imaturidade foram monitorizadas em 15 pacientes submetidos à TMO. **Resultados:** **1)** Avaliação do equipamento: teste de reprodutibilidade mostrou coeficiente de variação (CV) = 5,5 e 11,6% nas contagens de reticulócitos provenientes de amostras com valores normais de reticulócitos e CV = 4,47 e 11,6% nas reticulocitoses. Nas amostras com reticulócitos < 0,5%, o CV foi maior (CV = 18,5 e 22,4%), mas sem comprometimento clínico. Entre as frações de maturidade, o MFI mostrou ser o mais preciso, com CV = 6,9 e 11,9% nas amostras normais, CV = 3 e 3,55% nas reticulocitoses e CV = 28,3 e 38,5% nas reticulocitopenias. Testes de linearidade e carry-over resultaram, respectivamente, em $r = 0,99$ e < 5% de contaminação. Comparação com o Cell Dyn 3500 revelou concordância entre os analisadores no que se refere às contagens de reticulócitos em valores percentuais e absolutos. Análise de amostras apresentando corpúsculos de Howell-Jolly, eritroblastos e granulações basófilas sugere não haver interferência dessas alterações na identificação dos reticulócitos; **2)** MFI e TMO: houve um aumento significativo nos valores de MFI em 11 pacientes pós-TMO, e essa resposta precedeu a recuperação dos neutrófilos e das plaquetas. Quatro dos 15 pacientes estudados não tiveram sucesso no procedimento de TMO e não apresentaram recuperação dos neutrófilos/plaquetas, assim como dos reticulócitos. **Conclusão:** O Pentra 120 Retic fornece resultados precisos e de qualidade, e mostrou-se adequado para uso em rotina. Os parâmetros de imaturidade dos reticulócitos mostraram ser úteis no acompanhamento de pacientes submetidos à TMO, além de serem indicadores precoces da recuperação medular.

Contagem de reticulócitos
Fração de imaturidade dos
reticulócitos
Analisadores hematológicos
automatizados
Transplante de medula óssea
Automação

1. Professora assistente doutor.
2. Aluno de pós-graduação.
Trabalho realizado no Departamento de
Patologia Clínica da Faculdade
de Ciências Médicas (Unicamp).

Jornal Brasileiro de Patologia

• Repeatability

Six samples, being 2 normal, 2 with reticulopenia and 2 with reticulocytosis were analyzed 10 successive times. The coefficient of variation (CV) was calculated for all parameters.

• Linearity

Two samples were diluted to give a final concentration of 100%, 90%, 70%, 50%, 30% and 10% and the linearity for reticulocyte count was assessed.

• Carry-over

According to the protocol H44-P (NCCLS 1993) (13), the specimens used for this test were selected for their elevated and depressed RBC count. The first sample was processed 3 consecutive times and immediately followed by 3 times of the low RBC count sample. Automated and manual modes were tested.

• Stability

Stability of storage was performed on 6 samples, being 2 normal, 2 with reticulopenia and 2 with reticulocytosis. They were analyzed immediately after venipuncture and at 24, 48 and 72 hours. During the study the blood was preserved at 4°C.

• Comparability

One hundred and twenty-seven blood samples with hematological normal values were selected from the routine and processed in Pentra 120 Retic and Abbott Cell Dyn 3500, a semi-automated hematology analyzer which identifies reticulocytes by a non-fluorescent flow cytometer method, using new

Table 1 Reference values obtained from Pentra 120 Retic

	Mean	SD	Min	Max
Retics %	1.422	0.437	0.53	2.76
Retics # ($\times 10^9/l$)	69.10	20.768	27.2	134.9
LFR (%)	83.670	6.890	67.4	98.4
MFR (%)	13.102	4.901	1.06	25.6
HFR (%)	3.190	2.505	0	10.0
MFI (%)	16.265	3.997	6.4	25.5
MRV (fl)	102.08	5.3	88	124

Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, 2000

236

Table 2 Repeatability test

		Retics %	Retics #	LFR	MFR	HFR	MFI	MRV
A	CV (%)	5.5	5.75	3.45	11.2	32.1	6.9	2.32
	Range	1.86-2.18	82.2-97.9	70.3-77.9	18.1-24.4	3.02-7.84	19.9-24.4	99-106
	CV (%)	11.6	11.1	4.79	20.2	42.2	11.9	2.16
	Range	1.36-1.95	73.4-88.2	74.1-87.3	10.6-20.6	1.42-6.09	14.1-21.4	98-105
B	CV (%)	18.5	18.7	4	81.9	206	28.3	6.98
	Range	0.13-0.27	3.6-7.4	88.5-100	0-11.5	0-6.06	4.9-9.31	89-111
	CV (%)	22.4	22.9	13.2	88.4	73.4	38.5	5.01
	Range	0.22-0.4	5.4-9.9	78.8-100	0-35.5	0-6.45	4.88-24.9	95-113
C	CV (%)	4.47	6.03	2.56	3.11	8.05	3	3.03
	Range	10.7-12.6	281.9-353	55.1-60.1	25.1-27.2	14-18	31.5-34.8	107-118
	CV (%)	3.27	3.8	4.1	8.51	6.16	3.55	1.58
	Range	5.52-6.16	192-208.5	51.7-59.2	21.5-28.6	18.1-21.9	32.8-36.3	94-99

Samples A: normal blood.

Samples B: low reticulocyte count.

Samples C: high reticulocyte count.

Jornal Brasileiro de Patologia

methylene blue as dye. Fractions of reticulocyte maturity are calculated depending on the absorption intensity, being classified as: mature, midmature and immature reticulocyte. Parameters collected were reticulocyte percentage and absolute reticulocyte counts. The results were statistically analyzed using one-way Anova test.

• Specificity of testing

To verify the occurrence of the interferents affecting specificity of reticulocyte analysis, we investigated blood samples presenting Howell-Jolly bodies, nucleated erythrocytes and basophilic stippling. These abnormalities were seen in blood films and then run in the equipment. We compared results from equipment to manual method, using microscopy counts on blood smears stained with brilliant cresyl blue; 2000 erythrocytes were counted. We analyzed if these potential interferents might lead to an erroneous reticulocyte quantitation.

Results

Reference values

There was no difference in reticulocyte enumeration between male and female groups. **Table 1** describes the results obtained from 171 adult individuals. These values were adopted as normal for our population.

Repeatability

Table 2 shows the obtained results in this test. Best results were observed in high reticulocyte count samples (Samples C). In spite of high CV values in samples B, all the values are in a range that do not compromise the clinical interpretation. It is interesting to note the MFI CVs. All of them were lower than both MFR and HFR.

Linearity

The correlation coefficient observed in both samples tested were excellent – $r = 0.9937$ and $r = 0.9815$. The tested reticulocyte range was from $16 \times 10^9/l$ to $245.1 \times 10^9/l$.

Carry-over

Two series were carried out in this test. In the automated mode, the carry-over was 3.7% for retics % and 2.92 for retics #. In the manual mode, the results were similar: 4.8% for retics % and 2.4% for retics #.

It means that the contamination practically inexists in the reticulocyte counting.

Stability

Among the studied parameters, the best results were observed for: retics #, retics % and MRV. They showed an excellent stability up to 72 hours. Immaturity fractions varied within an acceptable range during the period. MFI performance was better, showing a very good stability during the evaluated period. **Figures 1, 2 and 3** show the results.

Comparability

The one-way Anova test showed no difference between Abbott Cell Dyn 3500 and Pentra 120 Retic values ($p < 0,01$). The results are in **Table 3**.

Specificity of testing

Seventeen samples with abnormalities as basophilic stippling, presence of Howell-Jolly bodies and nucleated erythrocytes were selected from the routine and submitted to the equipment and manual method. All of them presented some degree of anemia and several morphological alterations at microscopy analysis. Reticulocyte counting showed high percentage values in 16 samples using automatic method and 15 by manual count. Therefore, apparently the reticulocyte identification by Pentra 120 Retic does not suffer interference when red cell abnormalities are present in anemic blood samples.

Reticulocytes as an indicator of bone marrow recovery

Twelve patients receiving allogenic and 3 receiving autologous BMT were included in this study. Four of the allogenic group had an inadequate engraftment. Granulocyte engraftment was defined by a neutrophil count of at least $0.5 \times 10^9/l$ for 2 consecutive days and platelet engraftment was indicated by a platelet count of at least $20 \times 10^9/l$ without transfusion requirement for 1 week. MFI recovery was defined as the first value of an ascendant curve and this value being at least twice the previous one. Two patients (patient 9 and 10) had the MFI value 4 times the previous one and other 2 (patients 8 and 11) 3 times (**Table 4**). Engraftment occurred in all cases with a corrected reticulocyte counting (CRC) greater than 0.55%, except patient 8. Four non-satisfactory

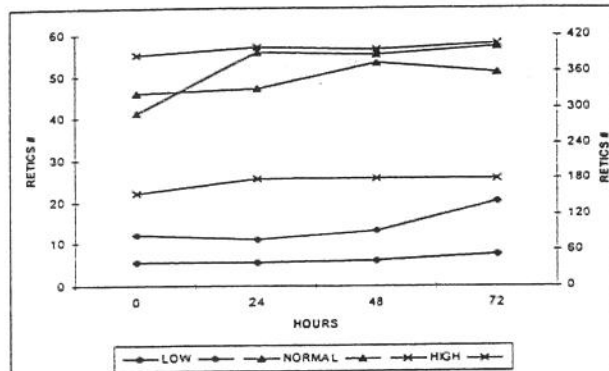
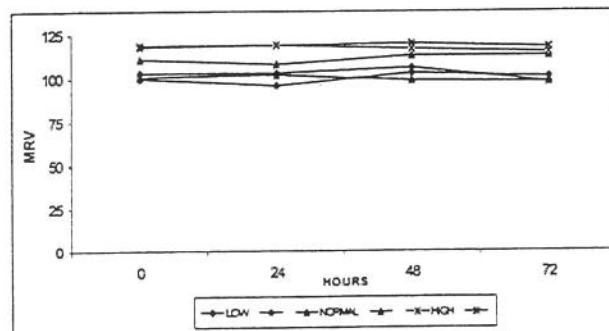
Figure 1 - Stability test for Retic # ($\times 10^9/l$)

Figure 2 - Stability test for MRV (fl)

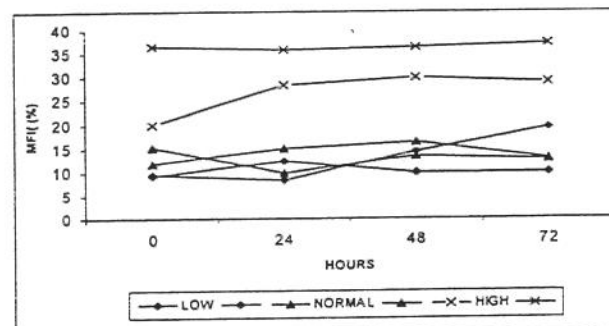


Figure 3 - Stability test for MFI (%)

engraftment cases neither reached 0.5% CRC value nor showed a rise in MFI value.

Discussion

Reticulocyte count is an important parameter in the investigation of several hematological conditions. However, the manual method is imprecise and inaccurate. The confidence in reticulocyte count was re-established with the automation advent (14).

Methods based on fluorescence measurements of RNA content and flow cytometry permit that many thousands of cells are counted in a fast and reliable way. Besides, difference in RNA content distinguishes varied maturation reticulocyte stages and provides an insight into the erythropoietic activity of the bone marrow (5).

In this study, the Pentra 120 Retic was evaluated in normal individuals with a presumed normal erythropoietic activity in order to know the performance equipment in a routine laboratory and in a specific hematological situation: bone marrow recovery after transplantation.

It is important to establish the reference values, because they vary depending on the used equipment, especially maturation fraction values or RMI (7). According to our results, the reference intervals for the 3 fractions are different for the other reported analyzers (3, 7, 11). These data confirm that the reference interval is method-dependent and that each laboratory must establish its own reference values. In our study, there was not a difference between males and females adult's values, according to other reports (1). The College of American Pathologists reticulocyte project commends a maximum coefficient of variation below 15% in imprecision test (15). At normal and high reticulocyte counts the CVs for retics %, retics # and MFI % were within this expected value. Although the observed CVs were higher than 15% at the low reticulocyte counts, the obtained range still reflects a clinical situation of severe reticulocytopenia. Nevertheless, the instrument CV is lower than the microscopic method one (5). This fluctuation has another connotation in clinical situations where small variations are important to define a response of erythropoietic activity of the bone marrow, for example, after transplantation. Following daily reticulocyte counting in this group of patients, we noted that when CRC is lower than 0.2% the MFI oscillation is evident and the interpretation may be done with caution. After that, if the engraftment had success, both CRC % and MFI % have a tendency to increase, independently of small fluctuations.

Some studies have been suggested an ex-vivo reticulocyte maturation, based on stability tests. A decrease in reticulocytes counts after storage might represent a change in the maturation stage of the cell (9). Other authors suggest a stability of the RNA content of the cells and recommend that samples

stored at room temperature should be analyzed within 72h of their being taken or up to 120h for refrigerated samples (4). In this study, the reticulocyte count showed a good stability up to 72h when samples are kept at 4°C. Among maturation fractions, the MFI was more stable than HFR. It is recommended to use this parameter instead HFR as representative of immaturity.

The comparison of the Pentra 120 Retic with Cell Dyn 3500 did not show a statistically significant difference, but revealed a tendency to higher values emitted by Pentra than by Cell Dyn 3500. A high sensibility and specificity of the fluorescence technique compared to the supra-vital staining in detecting reticulocytes can explain the higher values. In practice, Pentra 120 Retic presents the advantage to be completely automated; it does not require pre-dilution preparation and in a short period of time provides confident results concerning to several reticulocytes parameters.

The linearity of the Pentra 120 Retic in the absolute count was excellent and demonstrated that the equipment is able to detect low number of cells, even in very dilute samples. Carry-over test revealed an insignificant contamination among samples run.

The currently used fluorescent dyes stain DNA as well as RNA (5). Inclusions as Howell-Jolly bodies, erythrocytes containing malarial parasites or nucleated RBCs are fluorescent and have the potential to spuriously elevate a reticulocyte count (12). We analyzed 17 samples with basophilic stippling, Howell-Jolly bodies and nucleated RBCs, in isolated or combined forms. All of them presented a considered anemia level and high reticulocyte counts by automated and microscopic methods. However, in 12 of 17 samples the manual method revealed higher values than automated method. Based on these data, we can conclude that the reticulocyte identification by Pentra 120 Retic do not suffer interference when red cell abnormalities are present in anemic samples.

Reticulocytes as an indicator of bone marrow recovery

The clinical usefulness of reticulocyte maturity fractions was here evaluated studying transplanted patients. Our preliminary results confirm the value of MFI in early detection of engraftment after BMT (2). However, different standards were used to define MFI value as a predictor engraftment parameter. As we mentioned previously, the MFI corresponds to the RMI

Table 3

Data from 127 normal blood samples processed in Pentra 120 Retic and Cell Dyn 3500

	Pentra 120 Retic		Cell Dyn 3500	
	Retics %	Retics # (x 10 ⁹ /l)	Retics %	Retics # (x 10 ⁹ /l)
Mean	1.3693	66.819	1.2859	61.396
SD	0.4355	20.329	0.3079	14.46
Min	0.53	27.2	0.6	24.0
Max	2.76	134.9	2.21	105

Table 4

Patients submitted to BMT and day of bone marrow recovery

N	Diagnosis	BMT	Neutrophils	Platelets	MFI day
			day recovery	day recovery	recovery
1	AA	Allogenic	-*	-*	-*
2	AML	Allogenic	-*	-*	-*
3	CML	Allogenic	-*	-*	-*
4	MM	Allogenic	11	12	10
5	CML	Allogenic	22	15	15
6	CML	Allogenic	19	17	14
7	NHL	Autologous	12	14	11
8	NHL	Autologous	12	-	5
9	CML	Allogenic	26	27	11
10	CML	Autologous	13	-	12
11	CML	Allogenic	15	15	11
12	MDS	Allogenic	-*	-*	-*
13	CML	Allogenic	13	17	9
14	AML	Allogenic	11	10	9
15	AML	Allogenic	21	13	11
Mean			15.9 (n = 11)	15.5 (n = 9)	10.4 (N = 11)
(range)			(11-26)	(10-27)	(5-15)

AA: aplastic anaemia; AML: acute myeloid leukaemia; CML: chronic myeloid leukaemia; NHL: non Hodgkin lymphoma; MM: multiple myeloma; MDS: myelodysplastic syndrome.

* inadequate engraftment.

or immature reticulocyte fraction (IRF) provided by other equipment. There are in the literature several approaches concerning the lack of standardization in flow cytometric reticulocyte analysis. The results show the great inter-laboratory variability, probably due to fluorochrome stain, different methods of fluorescence capture and data analysis software algorithms used as to distinguish reticulocytes from the mature erythrocytes as to divide the reticulocytes in different stages of maturation (7, 8). Then, numeric values of fluorescence intensity and RMI units differ

among laboratories. Despite these difficulties and adopting our own criteria for MFI value as an indicator of bone marrow recovery, our results are promising. The reticulocyte and MFI behaviors are completely different between successful and unsuccessful engraftment. More than that, in all adequate engraftment, the MFI recovery preceded other usual parameters: neutrophils and platelets recovery, as reported by other authors (6, 16, 17).

The number of patients in this study is limited and further examination in a higher group of

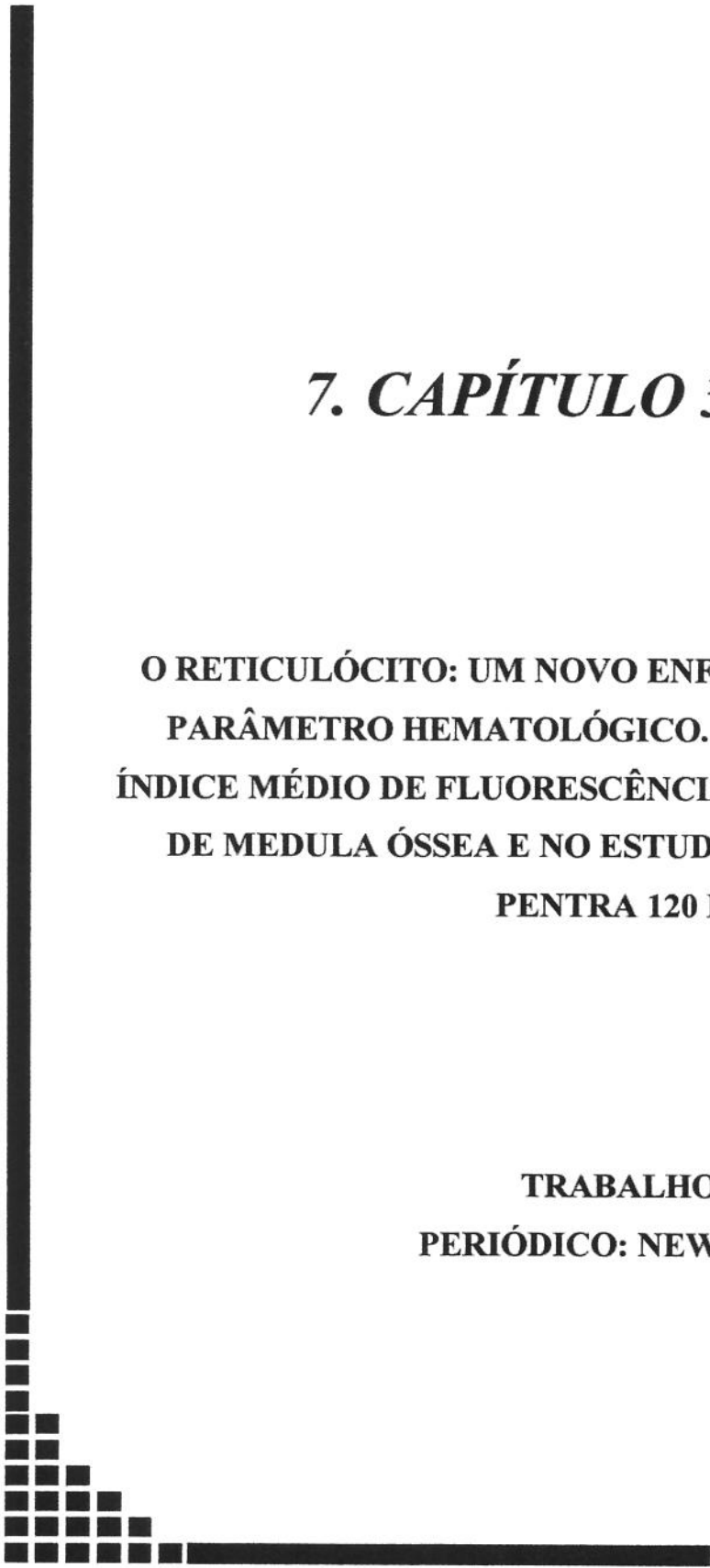
patients will be investigated to confirm our findings and to know whether the kinetics of these parameters is different between autologous and allogenic transplantation.

In conclusion, Pentra 120 Retic can produce results with precision and quality in a short space of time, being suitable for routine use in a hematological laboratory. Effective erythroid output can be determined by the MFI as representative of the early reticulocytes in circulation. This is particularly interesting in predicting response to efficacy of BMT.

References

1. Bowen, D. *et al.* Comparison of a modified Thiazole orange technique with a fully automated analyzer for reticulocyte counting. *J. Clin. Pathol.*, 44: 130-33, 1991.
2. Brugnara, C. Use of the reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of haematological disorders. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 28: 1-11, 1998.
3. Buttarello, M. *et al.* Laboratory evaluation of the Miles H-3 automated reticulocyte counter. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 119: 1141-148, 1995.
4. Cavill, I. *et al.* In vitro stability of the reticulocyte count. *Clin. Lab. Haematol.*, 18: 9-11, 1996.
5. Corberand, J.X. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol. Cell Ther.*, 38: 487-94, 1996.
6. Dalal, B.I. *et al.* Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplant.*, 17: 91-92, 1996.
7. Davis, B.H. *et al.* Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study. *Am. J. Clin. Pathol.*, 102: 468-77, 1994.
8. Davis, B.H. *et al.* Proposal for standardization of flow cytometric reticulocyte maturity index (RMI) measurements. *Cytometry*, 14: 318-26, 1993.
9. Hamilton, J.L. *et al.* Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method using the Coulter STKS-2A blood cell counter. *Clin. Lab. Haematol.*, 17: 145-49, 1995.
10. Hillman, R.S. & Finch, C.A. *Red cell manual*. 6th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company. 1992. p. 16.
11. Kim, Y.R. *et al.* A rapid and sensitive reticulocyte method on a high-throughput hematology instrument. *Lab. Hematol.*, 3: 19-26, 1997.
12. Lofsness, K.G.; Kohnke, M.L. & Geier, N.A. Evaluation of automated reticulocyte counts and their reliability in the presence of Howell-Jolly bodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101: 85-90, 1994.
13. NCCLS (1993). *Reticulocyte counting by flow cytometry: Proposed Guideline. Document H44-P*. Villanova, Pennsylvania, USA, 1993.
14. Rowan, R.M.; Cavill, I. & Corberand, J.X. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clin. Lab. Haematol.*, 18: 3-8, 1996.
15. Savage, R.A.; Skoop, D.P. & Rabinovitch, A. Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report from the College of American Pathologists reticulocyte project. *Blood Cells*, 11: 97-112, 1985.
16. Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery. Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of hematologic recovery. *Eur. J. Haematol.*, 53: 293-97, 1994.
17. Testa, U. *et al.* Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. *Brit. J. Haematol.*, 96: 762-75, 1997.

Endereço para correspondência
Helena Z. W. Grotto
Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas
Unicamp - Campinas
Caixa Postal 6111
CEP 13083-970 - São Paulo-SP
Fax: 00-55-19-32893273
e-mail: grotto@fcm.unicamp.br



7. *CAPÍTULO 3*

**O RETICULÓCITO: UM NOVO ENFOQUE PARA UM CLÁSSICO
PARÂMETRO HEMATOLÓGICO. APLICAÇÃO CLÍNICA DO
ÍNDICE MÉDIO DE FLUORESCÊNCIA (MFI) NOS TRANSPLANTES
DE MEDULA ÓSSEA E NO ESTUDO DAS ANEMIAS USANDO
PENTRA 120 RETIC**

**TRABALHO PUBLICADO NO
PERIÓDICO: NEWSLAB 35: 142 – 151,1999.**

O RETICULÓCITO: UM NOVO ENFOQUE PARA UM CLÁSSICO PARÂMETRO HEMATOLÓGICO

Aplicação clínica do Índice Médio de Fluorescência (MFI) nos Transplantes de Medula Óssea e no estudo das Anemias usando o Pentra 120 RETIC

Grotto HZW¹, Noronha JFA², Borba R²

1 - Profa. Assistente Doutora

2 - Alunos de pós-graduação do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

O reticulócito (RTC) corresponde ao último estágio da série eritróide na medula óssea. Após o eritroblasto ejetar o seu núcleo, o RTC atravessa a parede dos sinusóides medulares e é liberado do espaço hematopoietico para o sistema vascular periférico (5). Foi primeiramente notado por Erb, em 1860, quando através do uso de ácido pícrico ou acético demonstrou a presença de grânulos nas células vermelhas humanas e de animais anêmicos. O primeiro investigador a descrever essas células como RTCs foi Ehrlich, em 1891, usando azul de metileno para corar os retículos. No início de 1930, Heilmeyer publicou a descrição clássica da morfologia dos RTCs, subdividindo-os em quatro grupos, dependendo da intensidade da coloração. O grupo 0 corresponderia ao normoblasto nuclear que contém um denso retículo perinuclear. O estágio I, apresentaria uma densa rede de retículo, que se tornaria mais extensa, porém mais frouxa no estágio II. No grupo III as células teriam essa rede desintegrada, espalhada pela célula e no grupo IV o retículo apareceria como grânulos esparsos pela célula. No indivíduo normal, cerca de 61% dos RTCs circulantes são do grupo IV, 32% do grupo III, 7% do grupo II e apenas 0,1% pertencem ao grupo I (15, 20).

O material precipitado e agregado pelos corantes supravitalis corresponde à organelas como mitocôndrias, pequeno número de ribossomos, centríolo e remanescentes de corpúsculos de Golgi. Essas estruturas são mais evidentes quando jovem é o RTC. Durante a maturação o RTC retira as organelas degeneradas por um processo de autofagia, onde pequenos vacúolos englobam as organelas, funde-as formando um único e grande fagossoma e então expulsa seu conteúdo no espaço extracelular (15).

A presença de um extenso sistema ribossomal no RTC jovem permite que essa célula, embora desprovida de núcleo, sintetize 1/3 do total de hemoglobina contida no eritrócito maduro. Contribui nesse processo a presença de uma grande quantidade de receptores de transferrina na membrana dos RTCs mais jovens, que vão se tornando mais raros à medida que o processo de maturação se completa, sendo inexistentes na hemácia madura. Normalmente o tempo de maturação do RTC é de cerca de quatro dias, sendo que os três primeiros ainda na medula óssea e somente o último na circulação sanguínea. Havendo estímulo da eritropoiese, o número de RTC aumenta, uma vez que o tempo de matura-

ção intra medular é encurtado, podendo chegar a um dia. Esses RTC extremamente jovens contêm grande quantidade de RNA, são maiores em diâmetro e mais basofílicos (5).

A proporção de RTC em relação às hemácias maduras é indicativa do equilíbrio entre a produção e o ritmo de destruição das hemácias. Quando a vida média das células vermelhas diminui, a proporção de novas células na circulação aumenta (16). Assim, a quantificação dos RTC pode ser indicativa da atividade eritropoietica da medula óssea.

Uma maior aplicabilidade clínica desse parâmetro laboratorial tem sido limitada devido à grande imprecisão das contagens manuais feitas à microscopia. Vários fatores contribuem para o alto grau de imprecisão do teste:

- O pequeno número de células analisadas em relação à população das hemácias confere um erro estatístico muito grande. No limite inferior de normalidade da contagem em % dos RTC, o coeficiente de variação pode chegar a 50% (5). Uma maneira de minimizar o erro estatístico é usar algum tipo de acessório acoplado ao microscópio, como o disco de Miller que delimita as áreas onde serão contados os RTC e as hemácias. Dependendo do coeficiente de variação de-

sejado e do número estimado de RTC a ser obtido, estima-se o número de hemácias a serem quantificadas de modo que o erro estatístico possa ser diminuído (20).

- Falta de uniformidade na definição do RTC, o que leva a uma grande variabilidade intra-observadores. Células pertencentes ao grupo IV de Heilmeyer, embora mais freqüentes na circulação sangüínea são as mais difíceis de serem reconhecidas e identificadas como RTC. A definição proposta por Gilmer & Koepke (10) e aceita pelo NCCLS (19) e ICSH (13) é que "qualquer célula vermelha anucleada que contenha duas ou mais partículas de material corado em azul correspondente a RNA ribossomal deve ser considerada como RTC".

- Anormalidades de coloração: o RNA ribossomal é corado pela ação catiônica conferida pelo corante, que pode ser o novo azul de metileno, o azul de cresil brilhante ou o azure B. Este, na forma purificada é recomendado pelo ICSH (13), embora muitos laboratórios prefiram o novo azul de metileno. Além das diferenças entre os diversos fabricantes, é importante lembrar da possível variabilidade entre lotes de uma mesma marca.

- Embora a contagem de RTC à microscopia seja um teste tecnicamente simples, é um procedimento enfadonho e demorado.

A Automação na Contagem de RTC

Os primeiros relatos sobre a utilização de métodos fluorescentes para a detecção de RTCs datam dos anos 50 e 60, onde a acridina orange foi introduzida por Vander et al, em 1963, usando um procedimento não automatizado (26). Em 1980, Tanke et al descreveram o método usando

pironina Y como corante fluorescente e a citometria de fluxo para a contagem das células (23). Vários corantes podem ser utilizados na citometria de fluxo, além da acridina orange e pironina Y: tioflavina T, dimetiloxacarbocianina, Thiazole orange, brometo de etídio e auramina O. A maior parte deles cora RNA e DNA e diferem entre si quanto ao tempo de incubação necessário para que haja a reação (5).

As vantagens da citometria de fluxo fluorescente são evidentes e sua superioridade frente ao método microscópico tem sido apontada por vários autores (8, 14, 25). A possibilidade de um número muito superior de células ser analisado diminui consideravelmente o grau de imprecisão e aumenta a reprodutibilidade do método. Além disso, como a intensidade da fluorescência numa célula é proporcional à sua quantidade de RNA, esse sistema fornece informações quanto ao grau de maturação da população reticulocitária. Assim, RTCs mais jovens ou imaturos terão uma intensidade de fluorescência muito maior do que RTCs mais maduros. Dessa forma a avaliação do ritmo da produção das células vermelhas pela medula pode ser estimado (15).

A utilização dessa nova tecnologia proporcionou que novos conceitos fossem introduzidos, onde a contagem de RTC associada a novos parâmetros obtidos a partir da determinação do conteúdo do RNA por célula, fizessem reviver esse antigo parâmetro hematológico como de grande valia na avaliação da atividade eritropoiética da medula, na diferenciação das anemias, na resposta medular pós quimioterapia ou transplante de medula óssea e como indi-

cador de medulas responsivas ou não à tratamento com eritropoetina (3, 5).

Os Novos Parâmetros Reticulocitários

De acordo com a intensidade de fluorescência, os RTC são subdivididos em três frações de imaturidade: baixa, média e alta e são correspondentes à classificação proposta por Heilmeyer em 1932 (in 5). A maior fração presente normalmente na circulação é a fração de baixa imaturidade, correspondente aos RTCs prestes a se tornarem hemácias maduras. Por outro lado, os de alta imaturidade são mais raros e os de média imaturidade apresentam valores intermediários. O parâmetro denominado RMI ("reticulocyte maturity index") foi introduzido por alguns autores, embora a sua definição não seja homogênea na literatura. Alguns consideram como um índice referente ao conteúdo de RNA baseado unicamente na fração de alta fluorescência ou imatura, enquanto outros o usam como correspondente à soma das frações de alta e média imaturidades. O termo IRF ("immature reticulocyte fraction") também foi proposto como indicativo da fração de alta intensidade de fluorescência. Até o momento não existe um consenso sobre a padronização desses termos, assim como não é possível determinar um valor de referência único para esses parâmetros, que variam dependendo do equipamento e da metodologia utilizadas na sua determinação (3, 9).

O que é consenso na literatura é a grande valia da determinação das frações de imaturidade dos RTCs em situações clínicas, onde se quer avaliar o potencial de resposta da medula óssea pós quimioterapia em diferentes tipos de leu-

cem e na recuperação medular pós transplante de medula óssea. Em ambas situações, a fração de alta imaturidade de RTC tem sido reconhecida como indicador precoce de recuperação medular, antecedendo parâmetros laboratoriais rotineiramente utilizados, como a contagem de plaquetas e de neutrófilos no sangue periférico (6, 11, 22, 24).

Outros índices celulares referentes aos RTCs dizem respeito ao tamanho e ao conteúdo de hemoglobina dessas células. O volume corpuscular médio dos RTCs (VCMR) decresce à medida que a célula vai se aproximando da fase de hemácia madura, ou seja, quanto mais jovem o RTC maior seu VCMR. A relação entre VCMR/VCM das hemácias é de 1,2, já que o volume dos RTC é cerca de 20% maior do que das hemácias. Em situações de stress eritropoiético, como nas anemias hemolíticas graves, o VCMR está consideravelmente aumentado devido à eritropoiese acelerada, com menor número de divisões celulares e menor intervalo de tempo entre a diferenciação das "stem cells" até a liberação dos RTC para a circulação. Esses macroreticulócitos possuem uma menor concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do que eritrócitos normais. Uma produção aumentada de macroreticulócitos pode ser observada após sangramentos, exposição a altas altitudes, injeção de eritropoetina e após tratamento de deficiência de ferro. A presença de microreticulócitos tem sido apontada como um indicador precoce do desenvolvimento da deficiência de ferro, assim como os macroreticulócitos seriam preditores da deficiência de vitamina B12 e/ou ácido fólico (3).

Os RTCs são menos densos do que hemácias maduras, devido a uma

menor concentração de hemoglobina e maior conteúdo de água no RTC em relação à hemácia madura. Alguns analisadores hematológicos determinam índices reticulocitários referentes ao conteúdo de hemoglobina dessas células, determinando assim o CHCMR (concentração de hemoglobina corpuscular média dos RTCs) e HCMR (hemoglobina corpuscular média dos RTCs). Estudos em pacientes submetidos à tratamento com eritropoetina mostram a utilidade desses parâmetros como indicativos da atividade eritropoiética, assim como no monitoramento da instalação da deficiência de ferro em pacientes renais crônicos recebendo eritropoetina (16, 18, 21). Boyd e Brugnara (2) estimaram a probabilidade de crianças desenvolverem deficiência do ferro através dos valores de CHR e sugerem que esse índice é um preditor importante da deficiência de ferro, precedendo o VCM, HCM e CHCM. Estudo recente onde diversos parâmetros laboratoriais foram testados para diagnosticar deficiência de ferro em crianças, mostrou que o conteúdo de hemoglobina do RTC foi o melhor preditor da deficiência de ferro e da anemia ferropriva, superando a determinação da ferritina sérica (4). O CHCMR parece ser um indicador precoce do sucesso do tratamento com hidroxiuréia em pacientes com anemia falciforme. A indução de síntese da hemoglobina fetal aumentaria a hidratação das células, reduzindo o número de RTCs de grande densidade (17).

Parâmetros Reticulocitários como Preditores de Recuperação Medular Pós Transplante de Medula Óssea

Esse trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a utiliza-

ção dos parâmetros reticulocitários fornecidos pelo Pentra 120 RETIC (ABX-Diagnostics Ltda.) como indicadores da recuperação medular em pacientes portadores de doenças hematológicas e submetidos à transplante de medula óssea (TMO).

Descrição do Sistema

O Pentra 120 RETIC é um analisador hematológico totalmente automatizado que fornece, além das contagens total e diferencial de células a análise dos RTC, perfazendo um total de 38 parâmetros. O conteúdo de RNA dos RTC é analisado através de um corante fluorescente com Thiazole orange, corante básico que se liga ao RNA após 25 segundos de incubação. O sistema é totalmente automatizado e a contagem dos RTC é processada simultaneamente com a contagem completa (CBC) e diferencial de leucócitos (DIFF), utilizando código de barra para identificação e sistema de "racks" que permite que se selecione o grupo de parâmetros desejados (CBC, DIFF, RTC ou a combinação entre eles). Técnicas de impedância, fluorescência, citometria de fluxo e utilização de argon-ion laser fornecem informações sobre o tamanho dos RTC e o seu conteúdo de RNA. O citograma de distribuição discrimina hemácias maduras e três diferentes classes de maturação dos RTC, denominadas LFR, MFR e HFR, correspondentes à baixa, média e alta fluorescência ou imaturidade. Quatro alarmes patológicos são emitidos e ajustáveis de acordo com os critérios estabelecidos pelo usuário: IMM (RTC imaturos), NRBC (células vermelhas nucleadas), RET+ (reticulocitose) e RTC- (reticulocitopenia). Amostras apresentando valores abaixo ou acima dos limites preconizados são au-

tomaticamente reavaliadas. Além das três frações de imaturidade são fornecidos: contagem absoluta de RTC (#), contagem percentual (%), VCMR, MFI (índice médio de fluorescência, correspondente ao RMI já descrito na literatura) e a contagem corrigida de RTC (CRC%), índice que é obtido levando-se em conta a gravidade da anemia. É feita uma correção da contagem em % dos RTC multiplicando esse valor pela razão entre o hematócrito do paciente pelo hematócrito normal (12).

Inicialmente foram determinados todos os valores de referência para o equipamento Pentra 120 RETIC.

Foram analisadas 171 amostras de indivíduos adultos normais (86 homens e 85 mulheres). O teste Anova mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os sexos. A Tabela 1 resume os dados obtidos.

Pacientes Estudados

17 pacientes atendidos pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hemocentro/UNICAMP foram estudados. Foram feitas análises seriadas, diárias, onde os dados do hemograma e dos RTC foram obtidos. O dia "0" correspondeu ao dia em que foi realizado o transplante. Foram adotados os seguintes si-

nais indicativos de recuperação medular pós transplante:

- contagem de neutrófilos $\geq 0,5 \times 10^9/l$ por dois dias consecutivos
- contagem de plaquetas $\geq 20 \times 10^9/l$ sem necessidade de transfusão por uma semana
- MFI: o primeiro valor de uma curva ascendente, sendo este valor pelo menos o equivalente ao dobro do anterior. Esse critério foi adotado porque, estudando a literatura, pudemos constatar não haver uma uniformidade no valor de HFR ou RMI como indicadores de aceite do transplante. Os valores variam de acordo com o equipamento e metodologia utilizados.

Tabela 1 - Valores de referência de uma população normal (n=171) analisada pelo Pentra 120 RETIC

	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
RTC %	1,422	0,437	0,53	2,76
RTC # ($\times 10^9/l$)	69,10	20,768	27,2	134,9
LFR (%)	83,670	6,890	67,4	98,4
MFR (%)	13,102	4,901	1,06	25,6
HFR (%)	3,109	2,505	0	10,0
MFI (%)	16,265	3,997	6,4	25,5
VCMR (fl)	102,08	5,3	88	124

Figura 1 - Sequência de dados obtidos durante o procedimento de TMO

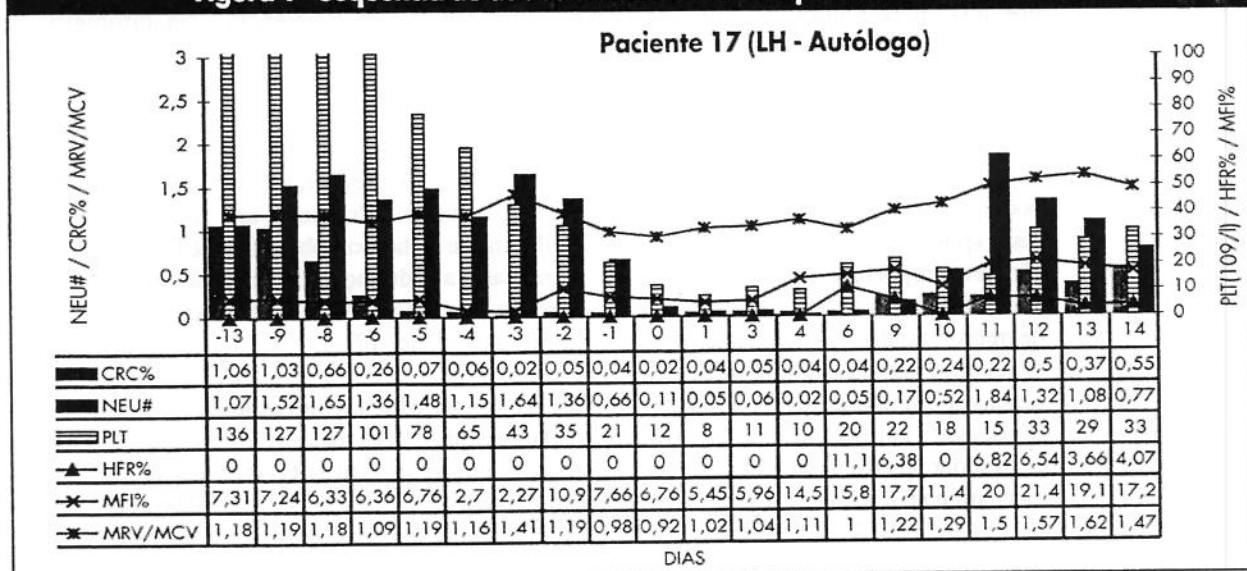


Tabela 2 - Pacientes submetidos ao TMO e dia de recuperação medular

N	Diagnóstico	Tipo de TMO	Dia de recuperação de neutrófilos	Dia de recuperação de plaquetas	Dia de recuperação de MFI
1	AA	Alogênico	.*	.*	.*
2	LMA	Alogênico	.*	.*	.*
3	LMC	Alogênico	.*	.*	.*
4	MM	Alogênico	11	12	10
5	LMC	Alogênico	22	15	15
6	LMC	Alogênico	19	17	14
7	LNH	Autólogo	12	14	11
8	LNH	Autólogo	12	-	5
9	LMC	Alogênico	26	27	11
10	LMC	Autólogo	13	-	12
11	LMC	Alogênico	15	15	11
12	SMD	Alogênico	.*	.*	.*
13	LMC	Alogênico	13	17	9
14	LMA	Alogênico	11	10	9
15	LMA	Alogênico	21	13	11
16	LMC	Alogênico	17	-	11
17	LH***	Autólogo	11	13	4
		Média (RANGE)	15,9 (n=13) (11-26)	15,3 (n=10) (10-27)	10 (n=13) (4-15)

AA: anemia aplástica; LMA: leucemia mielóide aguda, LMC: leucemia mielóide crônica, LNH: linfoma não Hodgkin; MM: mieloma múltiplo; SMD: Síndrome mielodisplásica; LH: linfome de Hodgkin.

*: enxerto inadequado.

***: vide figura 1 onde está representada a evolução desse paciente com todos os valores hematimétricos observados.

Tabela 3 - Valores referentes aos RTCs nos diversos tipos de anemia estudados (valores em média $\pm$ desvio padrão)

Grupo	N	RTC # ($\times 10^9/l$)	HFR (%)	MFI (%)	VCMR (fl)
Normal	62	63,8 $\pm$ 38	2,5 $\pm$ 2,7	14 $\pm$ 4,8	102,7 $\pm$ 8,67
A. Falciforme	25	283,9 $\pm$ 97,5	7,7 $\pm$ 6,9	24,9 $\pm$ 7,7	112,8 $\pm$ 12
Heterozigoto Hb S (AS)	10	99,9 $\pm$ 121,2	3,7 $\pm$ 2,9	17,5 $\pm$ 51	100,3 $\pm$ 11,9
Heterozigoto SC	5	170,5 $\pm$ 46,4	5,14 $\pm$ 4,3	21,4 $\pm$ 7,1	101,6 $\pm$ 9,3
HB Bart's	12	68,3 $\pm$ 27,9	4,3 $\pm$ 4,2	17,5 $\pm$ 6,9	89 $\pm$ 11,4
β talassemia heterozigótica	5	129,1 $\pm$ 66,6	6,9 $\pm$ 6,3	21,0 $\pm$ 7,4	79,4 $\pm$ 3,5
A. Ferropriva	12	72,2 $\pm$ 44,4	5,5 $\pm$ 5	19,3 $\pm$ 6,6	85,1 $\pm$ 9,9

RESULTADOS

Treze dos dezessete pacientes transplantados mostraram recuperação medular após o procedimento. Em todos eles a elevação do MFI precedeu o aumento dos neutrófilos e plaquetas como indicadores da recuperação medular. O paciente 9, portador de LMC e que recebeu transplante alogênico mostrou a recuperação medular através do valor de MFI 11 dias antes do que a indicação dada pelos neutrófilos e 16 dias antes da estabilização das plaquetas em $20,0 \times 10^9/l$. Todos os pacientes que tiveram sucesso no procedimento do transplante, exceto um, mostraram valores de CRC acima de 0,5%. Os pacientes cujos transplantes não foram bem sucedidos não alcançaram esse valor em nenhum momento pós-transplante, assim como não mostraram uma elevação significativa nos valores de MFI. A Tabela 2 resume os resultados dos pacientes estudados e submetidos ao TMO.

A Figura 1 demonstra a evolução de um paciente submetido a TMO, onde todos os parâmetros foram seriadamente coletados.

COMENTÁRIOS

Os resultados por nós obtidos confirmam os dados da literatura que apontam o RMI como um indicador precoce de recuperação medular pós TMO, precedendo os critérios rotineiramente adotados, como a elevação das contagens de neutrófilos e plaquetas (6, 7, 11, 22, 24). Esse fato é de importância clínica porque um diagnóstico precoce da falência do enxerto pode permitir a introdução mais rápida de um tratamento apro-

priado. Até recentemente os parâmetros laboratoriais utilizados que sinalizavam o sucesso ou não do procedimento eram a elevação das contagens de neutrófilos e plaquetas. Entretanto, a falha na recuperação dos neutrófilos pode refletir eventos como infecções ou doença enxerto versus hospedeiro. Uma efetiva recuperação eritróide deveria ser representada pelas contagens de reticulócitos periféricos, o que era bastante limitada até o advento da automação, que trouxe credibilidade nas quantificações, mesmo nos valores baixos (7). Aliado às contagens vemos que a determinação das frações imaturas de RTC podem auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação medular (22, 24). No entanto, é importante que cada laboratório determine os seus valores de referência de acordo com o equipamento utilizado, uma vez que não existe consenso na literatura sobre o padrão ou o valor sinalizador de recuperação hematopoiética (11).

Índices Reticulocitários na Investigação das Anemias

As anemias podem ser classificadas em dois grupos: as causadas por um decréscimo de produção de eritrócitos pela medula óssea (anemias não-regenerativas) e aquelas causadas por um aumento de perda ou destruição dos eritrócitos (anemias regenerativas). No primeiro grupo a resposta reticulocitária é pobre, enquanto no segundo observamos reticulocitose, como uma tentativa da medula óssea em repor as células perdidas (5, 12). Além das contagens dos RTC, as frações de imaturidade fornecem importantes informações sobre o grau de atividade eritropoiética em diferentes tipos de anemias. Estudamos os índices reticulocitari-

os em um grupo de pacientes portadores de diversas hemoglobinopatias e anemia ferropriva atendidos no Hemocentro/UNICAMP, cujo diagnóstico laboratorial das anemias foi realizado nas seções de Hematologia Geral e de Investigação de Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica/HC/UNICAMP. Os valores de RTC foram fornecidos pelo Pentra 120 RETIC. A Tabela 3 resume os dados por nós obtidos.

Como pode ser observado as maiores contagens de RTC acompanham as anemias onde um componente hemolítico participa do quadro anêmico. Por ordem decrescente de valores de RTC temos: anemia falciforme, hemoglobinopatia SC e β talassemia heterozigótica. Os valores de HFR e MFI são coincidentes com as contagens em números absolutos de RTC. Esses dados são condizentes com a dinâmica do sistema hematopoiético medular: havendo destruição periférica, a medula é estimulada a produzir células vermelhas em ritmo acelerado, lançando na circulação RTCs mais imaturos, que vão se acumular na corrente sanguínea onde completarão seu ciclo de maturação (3). É interessante notar o comportamento dos RTC na anemia ferropriva: embora os valores absolutos dos RTC se sobreponham ao grupo normal sem anemia, os valores de HFR e MFI são significativamente superiores ao grupo normal. Um dos mecanismos utilizados para repor o ferro intracelular na anemia ferropriva é estimular uma maior síntese de receptores de transferrina na membrana de eritrócitos imaturos (1). Essa seria a explicação pelo elevado valor de HFR na anemia ferropriva. No caso das anemias de do-

ença crônica, onde os receptores da transferrina não estão elevados, os valores de RMI são significativamente mais baixos do que na deficiência de ferro, podendo ser auxiliares na diferenciação entre anemia ferropriva e anemia de doença crônica (27).

Alguns autores sugerem que a fração de imaturidade dos RTC poderia ser útil para diferenciar anemia ferropriva de β talassemia heterozigótica (28), duas anemias que cursam com microcitose e hipocromia, com diagnóstico diferencial por vezes difícil de ser feito. Os nossos dados mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos, embora a contagem absoluta de RTC seja mais elevada na β talassemia heterozigótica.

No grupo de Síndromes Falciformes, os valores de MFI, HFR e VCMR foram estatisticamente diferentes entre os SS e os AS. Como se sabe, o quadro clínico e labora-

torial da anemia falciforme é bastante diverso do observado no heterozigoto AS. Fenômenos repetidos de falcização e hemólise observados no SS levam a uma maior atividade eritropoiética e, consequentemente, à reticulocitose acompanhada de numerosos RTC imaturos na circulação. Pacientes SC apresentam quadro clínico e laboratorial semelhante aos SS e, mais uma vez, o comportamento dos RTCs mostrou um padrão semelhante entre esses dois tipos de hemoglobinopatias.

CONCLUSÃO

O Pentra 120 RETIC mostrou ser um equipamento adequado para um laboratório clínico, fornecendo resultados confiáveis em um curto espaço de tempo. Sua operacionalização é simples e durante o período em estudo não apresentou intercorrências que interferissem no seu

funcionamento. O advento das novas tecnologias para determinação do número de RTC e dos seus graus de imaturidade abrem novas perspectivas para a investigação da dinâmica eritropoiética, proporcionam a obtenção de resultados que resgatem a credibilidade desse conhecido parâmetro laboratorial. O estudo completo dos RTC pode ser um importante auxiliar na investigação das anemias, nos processos de recuperação medular e no monitoramento terapêutico de diversas desordens hematopoiéticas.

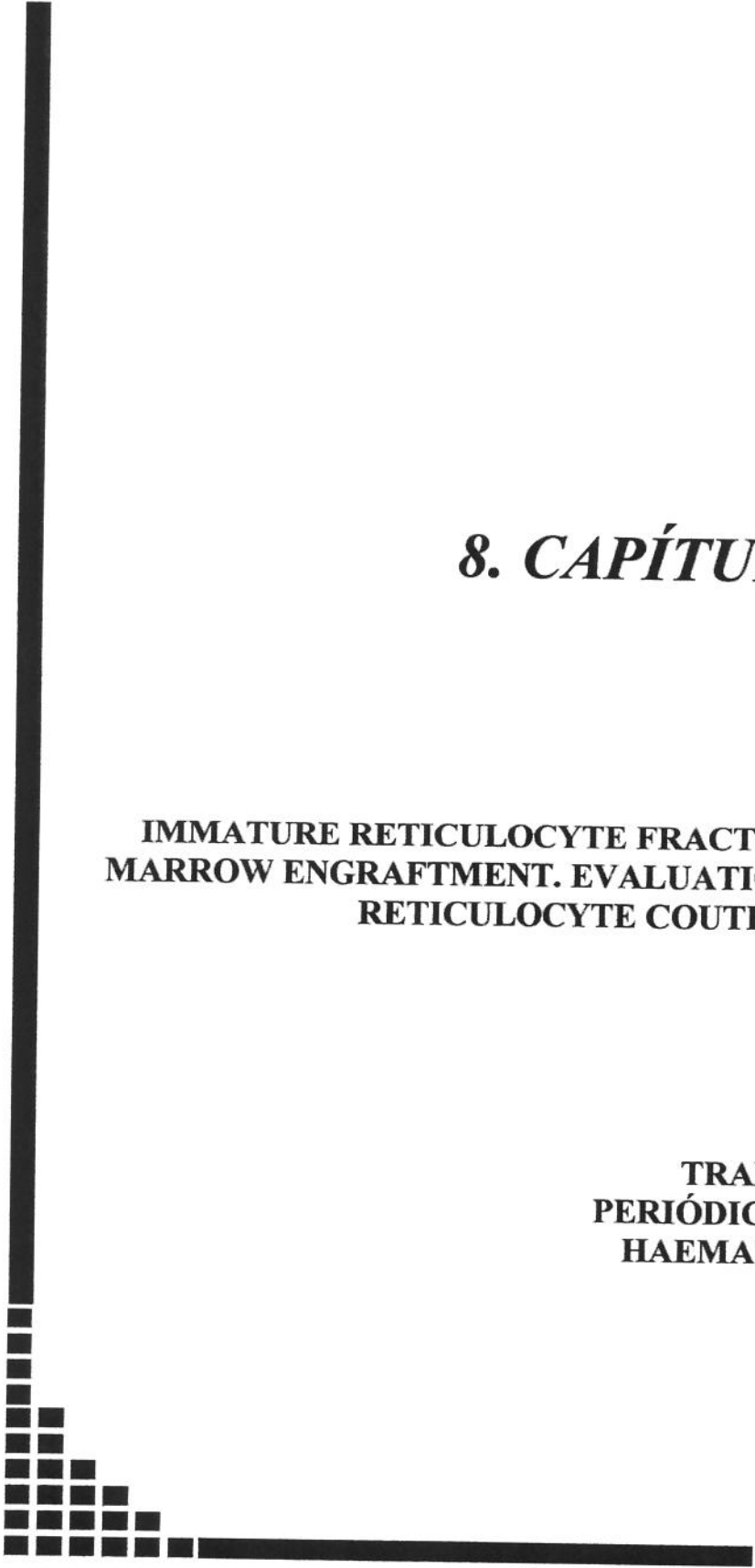
Agradecimentos

Os autores agradecem à ABX Diagnostics Ltda. pela gentileza na doação dos reagentes utilizados durante os estudos. Os autores são gratos também aos componentes do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hemocentro/UNICAMP, pelo auxílio na obtenção dos dados referentes aos pacientes. ¶

Referências Bibliográficas

- 1 - Beguin Y. (1992) *The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. Haematologica* 77, 1-10.
- 2 - Boyd T, Brugnara C (1996) *Reticulocyte and red cell indices with the Bayer Technicon H*3 analyzer: identification of iron deficiency in pediatric samples during routine screening. Clinical Chemistry* 42, s248.
- 3 - Brugnara C. (1998) *Use of the reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of haematological disorders. International Journal of Clinical Research* 28, 1-11.
- 4 - Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. (1999) *Reticulocyte content to diagnose iron deficiency in children. JAMA*, 16: 2225-2230.
- 5 - Corberand JX. (1996) *Reticulocyte analysis using flow cytometry. Hematology and Cell Therapy* 38, 487-494.
- 6 - Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, Phillips GL (1996). *Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. Bone Marrow Transplantation* 17, 91-92.
- 7 - Davies SV, Cavill I, Bentley N, Fegan CD, Poynton CH, Whittaker JA. (1992) *Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. British Journal of haematology* 81, 12-17.

- 8 - Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA et al. (1994) Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional Interlaboratory Correlation Study. *American Journal of Clinical Pathology* 102, 468-477.
- 9 - Davis BH, DiCorato M, Bigelow NC, Langweiller MH. (1993) Proposal for standardization of flow cytometric reticulocyte maturity index (RMI) measurements. *Cytometry* 14, 318-326.
- 10 - Gilmer PR & Koepke JA (1976) The reticulocyte, an approach to definition. *American Journal of Clinical Pathology* 66, 262-267.
- 11 - Grotto HZW, Vigoritto AC, Noronha JFA, Lima GAL (1999) Immature reticulocyte fraction as a criteria for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clinical and Laboratory Haematology* 21 (in press).
- 12 - Hillman RS, Finch CA. (1992). *Red cell manual*. 6th edn. F.A. Davis Company. Philadelphia.
- 13 - ICSH (1991) Guidelines for reticulocyte counting by microscopy on supravital stained preparations. WHO/LBS/92.3.
- 14 - Kim YR, Kantor J, Landayan M, Kihara J, Bearden J, Sheehan E. (1997) A rapid and sensitive reticulocyte method on a high-throughput hematology instrument. *Laboratory Hematology* 3, 19-26.
- 15 - Koepke JF & Koepke JA. (1986) Reticulocytes – review. *Clinical and Laboratory Hematology* 8, 169-179.
- 16 - Macdougall IC, Cavill I, Hulme B et al (1992) Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *BMJ* 304, 225–226
- 17 - Mohandas N. (1993) Reticulocyte biology in red blood cell disorders. New perspective for hematology – conference proceedings. Takkytown, NY, USA: Bayer Diagnostics - 46.
- 18 - Nagel RL, Vichinsky E, Shah M et al. (1993) F reticulocyte response in sickle cell anemia treated with recombinant human erythropoietin: a double-blind study. *Blood* 81, 9- 14
- 19 - NCCLS (1984) Methods for Reticulocyte Counting. Proposed Standard NCCLS Document H16-P, NCCLS, Villanova, Pennsylvania 19085, USA.
- 20 - Rowan RM, Cavill I, Corberand JX. (1996) The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clinical and Laboratory Haematology* 18, 3-8.
- 21 - Sowade O, Sowade B, Brilla K et al. (1997) Kinetics of reticulocyte maturity fractions and indices and iron status during therapy with eportin beta (recombinant human erythropoietin) in cardiac surgery patients. *American Journal of haematology* 55, 89-96.
- 22 - Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery (1994) Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of hematologic recovery. *European Journal of Haematology* 53, 293-297.
- 23 - Tanke HJ, Nieuwenhuis IAB, Koper GJM, Slat JCM, Ploem JS. (1980) Flow cytometry of human reticulocytes based on RNA fluorescence. *Cytometry* 1, 313-320.
- 24 - Testa U, Rutella S, Martucci G et al. (1997) Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. *British Journal of Haematology* 96, 762-775.
- 25 - Tichelli A, Gratwohl A, Driessen A et al (1990) Evaluation of Sysmex R1000. *American Journal of Clinical Pathology* 93, 70-78
- 26 - Vander JB, Harris CA, Ellis SR. (1963) Reticulocyte count by means of fluorescence microscopy. *American Journal of Haematology* 62, 132-140.
- 27 - Wells DA, Daigneault-Creech CA, Simrell CR. (1992) Effect of iron status on reticulocyte mean channel fluorescence. *American Journal of Clinical Pathology* 97, 130-134.
- 28 - Yoldi F, DeBlas JM, Alvarez D, Alonso D, Rivera F, Rodriguez JM. (1991) Automatización del recuento de reticulocitos. *Sangre* 33, 219-222.



8. *CAPÍTULO 4*

**IMMATURE RETICULOCYTE FRACTION AS A CRITERION FOR
MARROW ENGRAFTMENT. EVALUATION OF A SEMI-AUTOMATED
RETICULOCYTE COUNTING METHOD**

**TRABALHO PUBLICADO NO
PERIÓDICO: CLINICAL LABORATORY
HAEMATOLOGY, 21: 285 – 287, 1999.**

TECHNICAL NOTE

Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method

H.Z.W. GROTTO *Department of Clinical Pathology and Hemocentro,*
A.C. VIGORITTO *School of Medical Sciences,*
J.F.A. NORONHA *UNICAMP, Campinas, SP,*
G.A.L.M. LIMA *Brazil*

Keywords Bone marrow transplantation, haematology automation, reticulocyte count, reticulocyte indices

Flow cytometric reticulocyte analysis is more precise and more sensitive than manual reticulocyte counting. Besides this, the measured fluorescence intensity allows the quantification of reticulocyte maturity (Rowan, Cavill & Corberand 1996). The reticulocyte maturity index (RMI) or percentage of highly fluorescent reticulocytes (HFR) have been shown to be an early predictor of the regenerative activity of the bone marrow, specially useful in bone marrow transplantation (Corberand 1996). The majority of studies have used a flow cytometer dedicated to automatic reticulocyte analysis, utilizing a fluorescent dye. The value of HFR as a predictor of engraftment varies depending on the method and equipment used. The Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery (1994) identified an immature reticulocyte fraction (expressed as the percentage of middle and high fluorescent reticulocytes) $> 5\%$ and HFR $> 3\%$ (1992) as a predictor of marrow recovery. Davies *et al.* (1992) defined as at least three successive HFR rising counts and Dalal *et al.* (1996) suggested RMI ≥ 2.0 as a reticulocyte signal of engraftment.

The present study evaluated the performance of a semi-automated reticulocyte counter in the routine hematology laboratory of the University Hospital of Campinas, SP, Brazil and assessed the reticulocyte count as an early indicator of bone marrow recovery after transplantation in patients with leukaemias. The CELL-DYN 3500 (Abbott) is a haematology analyser which identifies reticulocytes by a non-fluorescent flow cytometric method, using New methylene blue as the dye. Fractions of reticulocyte maturity are calcu-

lated depending on the absorption intensity and are classified as: mature, midmature and immature reticulocytes fraction (IRF). Two hundred samples from normal individuals without anaemia were collected and normal values were determined (Table 1). Ten patients undergoing bone marrow (BMT) or peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) were included in the study: six patients had chronic myeloid leukaemia (CML) and four had acute myeloid leukaemia (AML). The criteria for engraftment following BMT or PBSCT was defined as the first day of a 3-day trend of neutrophil count (NC) $\geq 0.5 \times 10^9/l$ and platelet count (PC) $\geq 20 \times 10^9/l$. The IRF values in the normal group obtained on our equipment was different from the literature values using fluorescent dye. Therefore, the present study did not use the recommended criterion (HFR $> 3\%$) (Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery (1994)). Moreover, some patients did not reach normal values before or during transplantation. The first day on which the IRF was twice the minimum value after transplantation as an indicator of bone marrow recovery was adopted. After this the IRF continued to increase.

Rising IRF was the first sign of haematology recovery in all patients studied (Table 2), preceding the rise in neutrophils and platelets (Figure 1). IFR-signalled engraftment between 6 and 12 days after transplantation (median 8.7), while the neutrophils rose from 14 to 26 (median 18.2) days and PC from 11 to 37 (median 17.2) days.

Although reticulocyte identification by a non-fluorescent flow cytometric method may have some interference from other red cell inclusions, the precision and accuracy are greatly improved compared with manual methods (Hamilton *et al.* 1995; Corberand 1996). The present results

Accepted for publication 17 March 1999

Correspondence: Dr H.Z.W. Grotto, Departamento de Patologia Clinica, Faculdade de Ciencias Medicas - UNICAMP, Caixa Postal 6111, CEP 13083-970-Campinas-SP, Brazil.

© 1999 Blackwell Science Limited

Table 1. Reference values - CELL DYN 3500

	Retics (%)	Retics ($\times 10^9/l$)	MRF (%)	MiRF (%)	IRF (%)	MiRF+IRF (%)
Mean	1.44	68.9	68.8	26.3	4.7	31.1
Range	0.72-2.18	37.7-104.0	57.9-78.9	17.0-35.3	1.1-8.9	21.7-41.6

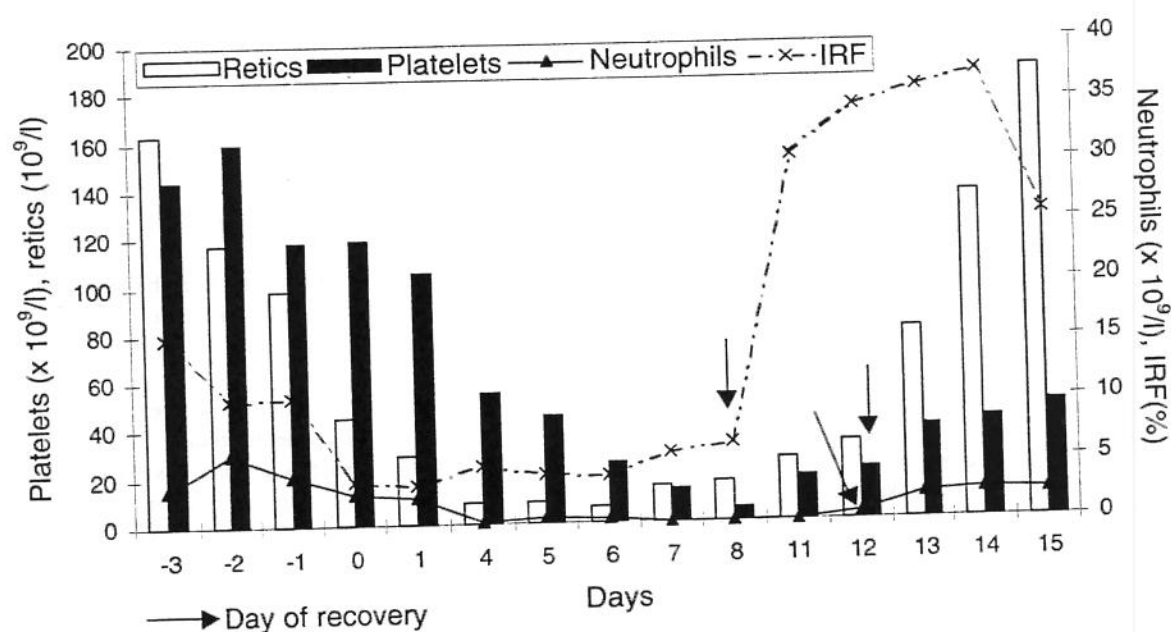
Retics, reticulocytes; MRF, mature reticulocyte fraction; MiRF, midmature reticulocyte fraction; IRF, immature reticulocyte fraction.
 $n = 200$.

Table 2. Patients and predictive values for monitoring recovery

Patient	Diagnosis	Neutrophils days to $0.5 \times 10^9/l$	Platelets days to $20.0 \times 10^9/l$	IRF days to rise	Interval between neutrophils and IRF rise	Interval between platelet and IRF rise
1	CML	16	11	7	9	4
2	CML	25	37	12	13	25
3	AML	19	13	8	15	9
4	CML	21	16	11	10	5
5	CML	19	16	7	12	9
6	AML	14	*	6	8	*
7	AML	12	12	8	4	4
8	CML	15	**	12	3	**
9	CML	15	11	8	7	3
10	AML	26	22	8	18	14
Mean		18.2	17.2	8.7	9.5	8.6

IRF, Immature reticulocyte fraction.

*Patient dependent on platelet transfusion. **Oscillating platelet count (from 8 to $38 \times 10^9/l$). IRF rise: the first day on which IRF was twice the minimum value after transplantation.

**Figure 1.** Sequence of haematological events in a patient with AML submitted to BMT.

© 1999 Blackwell Science Ltd. *Clin. Lab. Haem.*, 21, 285-287

indicate that it is possible to use this kind of equipment in bone marrow recovery assessment. However clinical laboratories need to develop standardization and reference values, since maturity grading indexes vary among reticulocyte counters and methods. Additionally, each laboratory must determine its own IRF predictive value as an indicator of haematological recovery.

References

- Corberand J.X. (1996). Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematology and Cell Therapy* **38**, 487–494.
- Dalal B.I., Stockford G.R., Naiman S.C., Spinelli J.J. & Phillips G.L. (1996). Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplantation* **17**, 91–92.
- Davies S.V., Cavill I., Bentley N., Fegan C.D., Poynton C.H. & Whittaker J.A. (1992). Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. *British Journal of Haematology* **81**, 12–17.
- Hamilton J.L., Pollard Y., Grant D., Patterson K. & Machin S.J. (1995) Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method using the Coulter® STKS-2A blood cell counter. *Clinical and Laboratory Haematology* **17**, 145–149.
- Rowan R.M., Cavill I. & Corberand J.X. (1996). The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clinical and Laboratory Haematology* **18** (Suppl. 1), 3–8.
- Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery. (1994). Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of hematologic recovery. *European Journal of Haematology* **53**, 293–297.



9. DISCUSSÃO

A possibilidade da quantificação dos reticulócitos e da fração de maturação dos reticulócitos representarem uma resposta precoce sobre a recuperação da medula óssea após TMO, tem sido descrita em vários estudos. DAVIS et al. (1989) estudando pacientes com leucemia mielóide aguda, mostraram que há uma correlação entre a ascensão dos valores de RMI e contagem de neutrófilos após TMO. GREINIX et al (1994) descreveram a sequência de eventos dos reticulócitos em 27 pacientes com TMO alogênico e 21 com TMO autólogo. O tratamento ablativo da medula, causou uma rápida queda nos reticulócitos de alta fluorescência, havendo recuperação 7 dias após o TMO alogênico e 11 dias após TMO autólogo. Em ambos os grupos, a recuperação dos reticulócitos foi mais precoce que a observada nos neutrófilos. Os autores mostraram que a recuperação da eritropoiese ocorreu rapidamente em pacientes que receberam eritropoetina após infusão de medula. A resposta do HFR foi mais precoce nos enxertos autólogos (dia médio = 8) que nos alogênicos (dia médio = 11) e sempre mais precoce que a recuperação dos neutrófilos (dias médios = 11 e 17,5 respectivamente).

Diferentes autores adotaram diferentes critérios para a avaliação da resposta eritropoiética ; alguns consideram a contagem de HFR em porcentagem (DAVIES et al., 1992, KANOLD et al., 1993, d'ONOFRIO et al., 1996), outros consideram a contagem absoluta do HFR (GREINIX et al., 1994). O "Spanish Multicentric Study Group for Haematopoietic Recovery" (1994) usou como critério de resposta eritropoiética o valor de $HFR > 3\%$. Outros autores utilizaram a contagem absoluta de reticulócitos (van BESIEN et al., 1990, d'ONOFRIO et al., 1996) ou a fração de imaturidade do reticulócito (IRF) (SANTAMARIA et al., 1997). DALAL et al. (1996), definiram a recuperação como o primeiro de 3 dias consecutivos com o índice de maturidade do reticulócito ($RMI \geq 2,0$). TORRES et al. (2001), utilizando o Pentra 120 Retic (ABX – HORIBA), definiram a recuperação eritróide como sendo o primeiro dia pós – transplante em que os valores de MFI e IRF alcançados foram de 10 e 10% respectivamente, e do RETH superiores a 3% durante pelo menos três dias consecutivos. Usando o Pentra 120 Retic, nós observamos que os pacientes apresentaram diferentes comportamentos e medidas de MFI e RETH, dificultando a definição do valor preditivo do MFI para recuperação pós – transplante. Dois pacientes submetidos à transplante autólogo e cinco à transplante alogênico não alcançaram o valor de $MFI \geq 10$, mas apresentaram recuperação eritróide, acompanhada

pela resposta de granulócitos e plaquetas. De acordo com nossa análise, quando há um significativo aumento no valor de MFI correspondendo ao dobro do dia anterior, tendência que se mantém durante três dias consecutivos, haveria indicação de uma recuperação eritróide. Nós aplicamos critérios semelhantes anteriormente, utilizando um equipamento semi-automático para contagem de reticulócitos e observamos resultados similares (GROTTO et al., 1999). O aumento da fração de imaturidade do reticulócitos (IRF) foi o primeiro sinal da recuperação hematológica em todos os pacientes estudados (n=10), precedendo o aumento de neutrófilos e plaquetas.

A determinação do volume médio dos reticulócitos pode ser obtida com o uso de alguns analisadores hematológicos automáticos. Um aumento no tamanho médio dos reticulócitos pode ser produzido devido a uma extrema estimulação eritropoiética e sucessivas divisões celulares na medula óssea, acompanhadas de um encurtamento do intervalo entre a diferenciação da célula tronco até o reticulócito (BRUGNARA, 1998). Alguns estudos indicam que o valor do VCMr altera rapidamente durante a indução experimental da deficiência de ferro e na terapia de reposição nas anemias carenciais, sinalizando a mudança na eritropoiese, enquanto o VCM e a contagem global de reticulócitos só se alteram mais tarde (CLARKSON & MOORE, 1976). A razão VCMr/VCM é normalmente igual a 1,2. A produção de microreticulócitos e inversão da razão VCMr/VCM pode ser a primeira manifestação da deficiência de ferro, enquanto a presença de macroreticulócitos no sangue periférico tem sido apontada como uma constatação precoce da deficiência de vitamina B12 ou folato (BRUGNARA, 1998). d'ONOFRIO et al. (1996), estudando pacientes submetidos à TMO, observaram que o sucesso da supressão e regeneração eritropoiética estão associados a uma queda progressiva no VCMr seguido por um aumento abrupto da razão VCMr/VCM.

Em nosso estudo todos os pacientes com transplante alogênico apresentaram resposta de reticulócitos mais precoce que a resposta de neutrófilos. Em 63,6% dos casos o primeiro evento foi um aumento abrupto da razão VCMr/VCM, seguido pelo aumento do valor de MFI. Em 13,6% dos casos o MFI e VCMr/VCM sinalizaram a resposta no mesmo dia e em 22,7% dos casos o valor de MFI precedeu o sinal da razão VCMr/VCM.

No grupo de pacientes com TMO autólogo, 3 dos 20 pacientes estudados mostraram recuperação de neutrófilos anterior à resposta dos reticulócitos. Em 55% dos casos tiveram o sinal do MFI como o primeiro indicador da reconstituição medular e em 25% dos casos tiveram uma coincidência no dia recuperação do MFI e VCMr/VCM.

Embora as respostas do RetAbs e dos neutrófilos tenham sido bastante semelhantes, pudemos observar que em 45,4% dos pacientes com transplante alogênico e em 45% com transplante autólogo, o dia de resposta do RetAbs antecedeu a resposta do ANC. Outros 9,1% e 5% de pacientes com transplante alogênico e autólogo respectivamente, tiveram o dia de resposta do RetAbs no mesmo dia de resposta do ANC. A resposta do RetAbs foi posterior à resposta dos neutrófilos em 45,5% dos transplantes alogênicos e 50% dos transplantes autólogos.

BENSINGER et al. (2001) estudando o transplante alogênico de células hematopoiéticas, mostraram que o transplante alogênico de células do sangue periférico restabelece as contagens de neutrófilos e plaquetas mais rapidamente que o transplante alogênico de células da medula óssea e sem aumentar o risco de GVHD. Outros estudos sugerem que o número de células $CD34^+$ interfere com a evolução da recuperação medular. Mais do que $5 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $CD34^+$ infundidas, proporciona um resultado rápido e durável do enxerto, enquanto pacientes que recebem menos que 1 ou $2 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $CD34^+$ são mais susceptíveis à demora de resposta ou falha do enxerto (VIGORITO et al., 2001). Nosso estudo apresentou uma mediana de $6,28 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $CD34^+$ mobilizadas e infundidas em 20 pacientes submetidos à TMO autólogo e com sucesso no enxerto. Dezesete receberam mais do que $5,0 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $CD34^+$, e 3 receberam entre $2,0$ e $5,0 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $CD34^+$. Os resultados demonstraram a relação entre a resposta do RetAbs e a quantidade de células $CD34^+$ infundidas nos pacientes com transplantes autólogos, o que reforça a importância do regime de mobilização e o número de progenitores coletados na recuperação da eritropoiese.

Nos pacientes com transplante autólogo, a administração de fator de crescimento (CSF-G) nos dias 1 ou 5 pós-transplante, mostrou uma influência na precocidade da resposta do reticulócito. O CSF-G é considerado um fator de crescimento linhagem-específico. Entretanto, por agir sinergicamente com CSF-GM e IL-3, potencializa

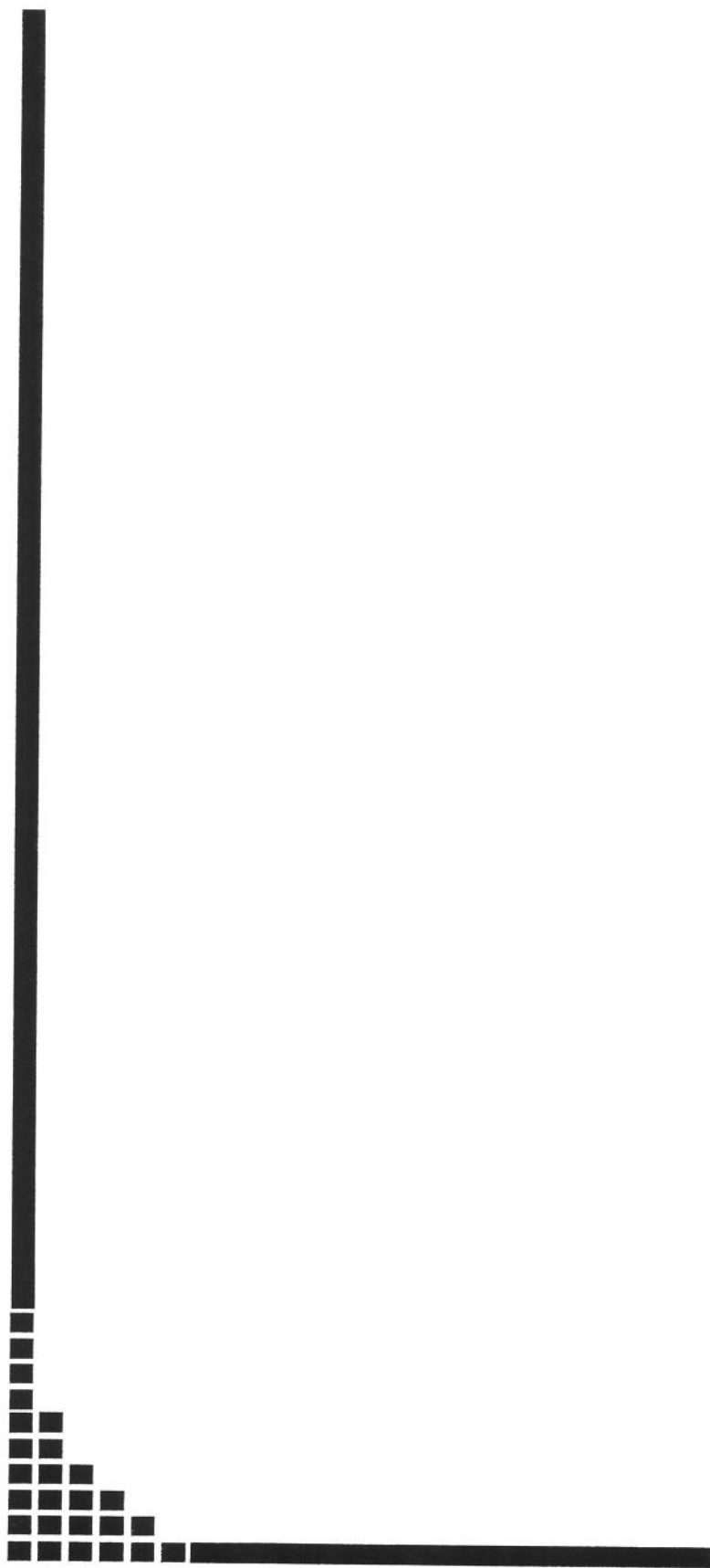
os efeitos destes elementos sobre os progenitores hematopoiéticos humanos (McNIECE et al., 1989). Quando combinado com a eritropoietina (EPO), CSF-G aumenta o número (VANNUCCHI et al., 1996) e a velocidade do ciclo normal das unidades formadoras de expansão eritróide (BFU-E) *in vitro*. (BROXMEYER et al., 1994).

As respostas do RetAbs e IRF foram mais rápidas em transplante de células progenitoras do sangue periférico que no transplante de células da medula óssea em um estudo comparando pacientes submetidos a transplante autólogo e alogênico (SANTAMARIA et al., 1997). Em nosso trabalho foi testada a possibilidade do tipo de células progenitoras transplantada (MO ou CPP) ser uma variável preditiva para a resposta de reticulócitos no grupo dos transplantes alogênicos. Usando análise multivariada pudemos observar que aproximadamente 70% das respostas do RetAbs podem ser explicadas pela contagem absoluta de neutrófilos e do tipo de células infundidas ($P < 0,001$). A análise foi restrita ao transplante alogênico, porque todos os pacientes com transplantes autólogos receberam CPP, impossibilitando o estudo comparativo.



10. CONCLUSÕES

1. Parâmetros reticulocitários relacionados ao volume e grau de imaturidade das células são indicativos da atividade eritropoiética da medula.
2. A detecção da reticulócitos imaturos no sangue periférico antecede a elevação global da contagem de reticulócitos no processo de recuperação medular pós-transplante.
3. As respostas do MFI e da razão VCMr/VCM antecedem a elevação da contagem de neutrófilos nos transplantes alogênicos e autólogos.
4. A resposta reticulocitária foi mais precoce nos transplantes autólogos do que nos alogênicos.
5. Foram fatores preditivos da resposta reticulocitária nos transplantes alogênicos a contagem de neutrófilos e o tipo de célula progenitoras infundidas (CPP). A resposta plaquetária e o número de células CD34⁺ infundidas foram preditoras da resposta reticulocitária no transplante autólogo.
6. O monitoramento da recuperação eritróide, pós-transplante, através da determinação de índices de imaturidade e volume do reticulócito, pode ser auxiliar na análise da evolução dos procedimentos de TMO, sendo um indicador precoce da reconstituição medular.



11. SUMMARY

Introduction: Reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction have shown to be adequate in the evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation (BMT). The purpose of this study was to evaluate reticulocyte parameters by means of flow cytometric reticulocyte counting in a group of patients who had undergone autologous and allogeneic BMT. Pattern of reticulocyte response and predictive value of absolute neutrophil count (ANC), platelet count, number of CD34⁺ cell infused and graft source for reticulocyte response have been studied.

Material and Methods: We compared absolute reticulocyte count (RetAbs), Mean fluorescence index (MFI) and Mean reticulocyte volume/ Mean corpuscular volume ratio (MRV/MCV) with conventional criteria (ANC and platelet count) in 22 allogeneic and 20 autologous BMT patients.

Results: An abrupt increase of MRV/MCV ratio or a rise in MFI value were the earliest sign of erythropoietic recovery in allogeneic transplantation (63.6% and 22.8% of cases, respectively). In 13.6% of cases both parameters presented simultaneously. All, but 3 autologous transplants showed reticulocyte parameters earlier than ANC recovery. Granulocyte recovery and peripheral blood progenitor cells (PBPC) graft were predictive variables for RetAbs response in allogeneic transplant. In autologous group high number of CD 34⁺ infused cells and platelet recovery were predictive variables for RetAbs response.

Conclusion: A rise in the immature reticulocyte population is the earliest sign of haematopoietic recovery post BMT and may be useful as an additional predictor of engraftment.



12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON JE. Bone marrow transplantation for myelodysplasia. **Blood Reviews**, 14: 63, 2000.
- APPELBAUM FR. Antibody-Targeted therapy for Myeloid Leukemia. **Seminars in Hematology**, 36, (6): 2, 1999.
- ARBAJE YM, BETRAN G. Chronic myelogenous leukemia complicated by autoimmune hemolytic anemia. **American Journal of Medicine**, 88: 197, 1990.
- BACIGALUPO A, BRAND R, OBETO R, BRUNO B, SOCIE G, PASSWEG J, LOCASCIULLI A, VAN LINT M, TICHELLI A, McCANN S, MARSH J, LJUNGMAN P, HOWS J, MARIN P, SCHREZENMEIER H. Treatment of acquired aplastic anaemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy. The European Group for Blood and Marrow Transplant experience. **Seminars in Hematology**, 37: 69, 2000.
- BANDARENKO N, BRECHER ME. Collection and transfusion of leucocytes, dendritic cells, and stem cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6^a Ed. USA: Mc Graw Hill. 1893, 2001.
- BANKS PM. Pathology of malignant Lymphomas. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6^a Ed. USA: Mc Graw Hill. 1207, 2001.
- BARLOGIE B, SHAUGHNESSY J, MUNSHI N, EPSTEIN J. Plasma Cell Myeloma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6^a Ed. USA: Mc Graw Hill. 1279, 2001.
- BAYNES RD, HAMM C, DANSEY R, KLEIN J, CASSELLS L, KARANES C, ABELLA E, PETERS WP. Bone marrow and peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation: Focus on autografting. **Clinical Chemistry**, 46, 8(B): 1239, 2000.
- BENSINGER WI, MARTIN PJ, STORER B, CLIFT R, FORMAN SJ, NEGRIN R, KASHYAP A, FLOWERS MED, LILLEBY K, CHAUNCEY TR, STORB R, BLUME K, HEIMFIELD S, ROWLEY S, APPELBAUM FR. Transplantation of Bone Marrow as compared Peripheral-Blood Cells from HLA-identical relatives in patients with Haematologic cancers. **The New England Journal of Medicine**, 344: 175, 2001.

- BERENSON RJ, BENSINGER WI, HILL RS, ANDREWS RG, GARCIA LJ, KALAMASH DF, STILL BJ, SPITZER G, BUCKNER CD, BERNSTEIN ID. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cell with breast cancer and neuroblastoma. **Blood**, 7: 1717, 1991.
- BORIM LNB, RUIZ MA, CONTE ACF, CAMARGO B. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22: 47, 2000.
- BRECHER G, STOHLMAN F. Reticulocyte size and erythropoietic stimulation. **Proceedings of Society Experimental Biology Medicine**, 107: 887, 1961.
- BROXMEYER HE, BENNINGER L, PATEL SR, PATEL SR, BENJAMIN RS, VADHAN-RAJ S. Kinetic response of human marrow myeloid progenitor cells to *in vivo* treatment of patients with granulocyte colony-stimulating factor is different from the response to treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Experimental Hematology**, 22: 100, 1994.
- BRUGNARA C, ZELMANOVIC D, SORETTE M, BALLAS SK, PLATT O Reticulocyte hemoglobin: an integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. **American Journal of Clinical Pathology**, 108: 133, 1997.
- BRUGNARA C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. **International Journal of Clinical Laboratory Research**, 28: 1, 1998.
- BUCKNER CD, CLIFT RA, SANDERS JE, STEWART P, BENSINGER WI, DONEY K, SULLIVAN KM, WITHERSPOON RP, DEEG HJ, APPELBAUM FR. Marrow harvesting from normal donors. **Blood**, 64: 630, 1994.
- CAVILL I. The rejected reticulocyte. **British Journal of Haematology**, 84: 563, 1993.
- CHABNER BA, WILSON W, SUPKO J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6ª Ed. USA: Mc Graw Hill. 185, 2001.

- CHIATTONE CS. Linfomas não-Hodgkin – Introdução. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22, (2): 192, 2000.
- CLARKSON DR, MOORE EM. Reticulocyte size in nutritional anemias. **Blood**, 48: 669, 1976.
- CORBERANT JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. **Hematology and Cell Therapy**, 38: 487, 1996.
- CORTES JE, TALPAZ M, KANTARKIAN H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **American Journal of Medicine**, 100: 555, 1996.
- COTRAN RS, KUMAR VY, ROBINS SLR. **Patologia Estrutural e Funcional 4ª Ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 577, 1991.
- CULLEN P, SOFFKER J, HOPFL M, BREMER C, SCHLAGHECKEN R, MEHRENS T, ASSMANN G, SCHAEFER RM. Hypochromic red cells and reticulocyte haemoglobin content as markers of iron-deficient erythropoiesis in patients undergoing chronic haemodialysis. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, 14 (3): 659, 1999.
- d'ONOFRIO G, CHIRILLO R, ZINI G, CAENARO G, TOMMASI M, MICCIULLI G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. **Blood**, 85 (3): 818, 1995.
- d'ONOFRIO G, TICHELLI A, FOURES C, THEODORSEN L. Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. **Clinical Laboratory Haematology**, 18: 45, 1996.
- DALAL BI, STOCKFORD GR, NAIMAM SC, SPINELLI JJ, PHILIPS GL. Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. **Bone Marrow Transplantation**, 17: 91, 1996.

- DAVIES SV, CAVILL I, BENTLEY N, FEGAN CD, POYNTON CH, WHITTAKER JA. Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. **British Journal of Haematology** 81: 12, 1992.
- DAVIS BH, BIGELOW N, BALL ED, MILLS L, CORNWELL III GG. Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. **American Journal of Hematology**, 32: 81, 1989.
- DAVIS BH. Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity. **Laboratory Hematology**, 2: 2, 1996.
- FERRARA JLM, DEEG HJ. Graft versus host disease. **New England Journal of Medicine**, 324: 667, 1991.
- GARICOBEA B. Genes de imunoglobulinas, doença residual mínima e origem dos linfomas não-Hodgkin B. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22, (2): 194, 2000.
- GATTERMAN N, AUL C, SCHNEIDER W. Two types of acquired sideroblastic anaemia (AISA). **British Journal of Haematology**, 74: 45, 1990.
- GERRITSEN EJ, STAM ED, Van den BERG H, HARALDSSON A, Van TOL MJ, VOSSSEN JM. Follow-up of leukocyte and reticulocyte counts for the prediction of early graft failure after non-HLA-identical BMT in children. **Bone Marrow Transplantation**, 17 (5): 781, 1996.
- GLUCKMAN E, ROCHA V, BOYER-CHAMMARD A, LOCATELLI F, ARCESE W, PA.. J, SOUILLET G, FERREIRA E, LAPORTE JP, FERNANDEZ M, CHASTANG C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors: Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. **New England Journal of Medicine**, 337: 373, 1997.
- GREENBERG P, COX C, LeBEAU MM, FENAUX P, MOREL P, SANZ G, SANZ M, VALLESPI T, HAMBLIN T, OSCIER D, OHYASHIKI K, TOYAMA K, AUL C, MUF G, BENNETT J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, 89: 2079, 1997.

- GREINIX HT, LINKESCH W, KEILN F, KALHS P, SCHWARZINGER I, SCHNEIDER B, OESTERREICHER C, BRUGGER S, KAPIOTIS S, LECHNER K. Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. **Bone Marrow Transplantation**, **14**: 307, 1994.
- GROTTO HZW, VIGORITO AC, NORONHA JFA, LIMA GALM. Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment . Evaluation of a semi-automated reticulocyte method. **Clinical Laboratory Haematology**, **21**: 285, 1999.
- HAMBLIN TJ, OSCIER DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemia cell. **Blood Reviews**, **11**: 119, 1997.
- HAROUSSEAU JL. Acute myeloid leukemia in the elderly. **Blood Reviews**, **12**: 145, 1998.
- HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J. The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Annals of Oncology**, **10**: 1432, 1999.
- HOFFBRAND AV, PETTIT JE. Iron deficiency and other Hypochromic Anaemias. In: Hoffbrand AV, Pettit JE. **Essential Haematology**, 3^a Ed. London: Blackwell Science. 49, 1995.
- HORNING SJ. Hodgkin Lymphoma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6^a Ed. USA: Mc Graw Hill. 1215, 2001.
- HUNTLY BJP, FRANKLIN IM, PIPPARD MJ. Unrelated bone-marrow transplantation in adults. **Blood Reviews**, **18**: 220, 1996.
- JIN NR, HILL RS, FETERSEN FB, BUCKNER CD, STEWART PS, AMOS D, APPELBAUM FR, CLIFT RA, BENSINGER WI, SANDERS JE, et al. Marrow harvesting for autologous. **Experimental Hematology**, **13**: 879, 1985.

- KANOLD J, BEZOU MJ, COULET M, QUAINON F, MALPUECH G, TRAVADE Ph, DEMÉOCQ F. Evaluation of erythropoietic / hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional peripheral blood cell counting. **Bone Marrow Transplantation**, **11**: 313, 1993.
- KELSEY PR, GEARY CG. Sea-blue histiocytes and Gaucher's cells in bone marrow of patients with chronic myeloid leukaemia. **Journal of Clinical Pathology**, **41**: 960, 1988.
- KETTERER N, SALLES G, MOULLET I, DUMONTET C, ELJAAFARI-CORBIN A, TREMISI P, THIEBLEMONT C, DURAND B, NEIDHARDT-BERARD EV, SAMAHA H, RIGAL D, COIFFIER B. Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies. **British Journal of Haematology**, **103**: 235, 1998.
- KILLICK SB, MARSH JCW. Aplastic anaemia: Management. **Blood Reviews**, **14**: 157, 2000.
- KNOX WF, BHAVANI M, DAVSON J, GEARY CG. Histological classification of chronic granulocyte leukemia. **Clinical Laboratory Haematology**, **6**: 171, 1984.
- KORBLING M, MARTIN H, FLIEDNER TM. Autologous blood stem cell transplantation. In: Gale RP, Champlin R eds. **Progress in Bone Marrow Transplantation**. New York: Alan R Liss. 877, 1987.
- LICHTMAN MA, BRENNAN JK. Myelodysplastic disorders (indolent clonal myeloid diseases and oligoblastic leukemia). In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, **6^a Ed.** USA: Mc Graw Hill. 1029, 2001.
- LICHTMAN MA, LIESVELD JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, **6^a Ed.** USA: Mc Graw Hill. 1085, 2001.

- LICHTMAN MA. Classification and clinical manifestation of the clonal myeloid disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**, 6ª Ed. USA: Mc Graw Hill. 1017, 2001.
- LOPES LF. Marcadores moleculares nas leucemias linfocíticas agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22, (2): 166, 2000.
- LORAND-METZE I, VASSALO J, DE SOUZA CA. Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis. . **British Journal of Haematology**, 67: 45, 1987.
- LUSIS MKP. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22, Supl. 2: 175, 2000.
- MACDOUGALL I, DAVIES ME, HUTTON RD, CAVILL I, LEWIS NP, COLES GA. The treatment of renal anaemia in CAPD patients with recombinant human erythropoietin. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 5: 950, 1990.
- McKENNA RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of leukemias. **Clinical Chemistry**, 46, 8 (B): 1252, 2000.
- McNIECE I, ANDREWS R, STEWART M, CLARK S, BOONE T, QUESENBERRY P. Action of interleukin-3, G-CSF and GM-CSF on highly human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF. **Blood**, 74: 110, 1989.
- MONTSERRAT E, ROZMAN C. Chronic lymphocytic leukaemia treatment. **Blood Reviews**, 7: 164, 1993.
- NEGRIN RS, BLUME KG. Allogeneic and Autologous Hematopoietic Cell Transplantation. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, ed. **Williams Hematology** 6ª Ed. USA: Mc Graw Hill. 209, 2001.
- PAES RAP. Linfoma de Hodgkin, nova classificação da OMS (2000). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 22, (2): 188, 2000.

- PATERAKIS GS, VOSKARIDOU E, LOUTRADI A, ROMBOS J, LOUKOPOULOS D. Reticulocyte counting in thalassemic and other conditions with the R-1000 Sysmex analyser. **Annals of Hematology**, **63**: 218, 1991.
- PEDERSEN F. Functional and biochemical phenotype in relation to cellular age of differentiated neutrophils in chronic myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**, **51**: 339, 1982.
- PERRY AR, LINCH DC. The history of bone-marrow transplantation. **Blood Reviews**, **10**: 215, 1996.
- PRENTICE HG, BRENNER MK. Recent advances in bone marrow transplantation in the treatment of leukaemia. In: Hoffbrand V. **Recent Advances in Haematology**. Churchill-Livingstone. Edinburgh: 153, 1988.
- PUI CH. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, eds. **Williams Hematology 6^a Ed.** USA: Mc Graw Hill. 1141, 2001.
- REIFFERS J, LEVEGER G, MARIT G et al. Haematopoietic reconstitution after autologous blood stem cell transplantation. In: Gale RP, Champlin RE, eds. **Bone Marrow Transplantation, Current Controversies, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology**, **91**. New York: Alan R Liss. 313, 1989.
- ROWAN RM, CAVILL I, CORBERAND JX. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. **Clinical Laboratory Haematology** **18**, (1): 3, 1996.
- SANTAMARIA A, MARTINO R, BELLIDO M, REMACHA AF. Reticulocyte recovery is faster in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation than in bone marrow transplantation. **European Journal of Haematology**, **58**, (5): 362, 1997.
- SEYMOUR JF, ESTEY EH. The contribution of Auer to the classification and prognosis of myelodysplastic syndromes. **Leukemia & Lymphoma**, **17**: 79, 1995.

- SHADDUCK RK. Aplastic Anemia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, eds. **Williams Hematology 6^a Ed.** USA: Mc Graw Hill. 375, 2001.
- SPANISH MULTICENTRIC STUDY GROUP FOR HAEMATOPOIETIC RECOVERY. Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation oh haematologic recovery. **European Journal of Haematology**, **53**: 293, 1994.
- SPECTOR N. Tratamento dos linfomas não-Hodgkin agressivos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **22**, (2): 212, 2000.
- STORB R. Bone marrow transplantation. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS. **Cancer, Principles and Practice of Oncology 3^a Ed.** Philadelphia: JB Lippincott. 2474, 1989.
- TANKE HJ, NIEUWENHUIS IAB, KOPER GJM, PLOEM JS. Flow cytometry of human reticulocytes based on RNA fluorescence. **Cytometry**, **1**: 313, 1980.
- TESTA U, RUTELLA S, MARTUCCI R, SCAMBIA G, d'ONOFRIO G, PIERELLI L, SICA S, BENEDETTI PL, MENICHELLA G, FOTI E, MASTROBERARDINO G, MANCUSO S, LEONE G, PESCHLE C. Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. **British Journal of Haematology**, **96**: 762, 1997.
- TORRES A, SANCHEZ J, LAKOMSKY D, SERRANO J, ALVAREZ MA, MARTIN C, VALLS C, NEVADO L, RODRIGUEZ A, CASAÑO J, MARTINEZ F, GÓMEZ P. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Journal of Hematology**, **86**: 24, 2001.
- TURGEON ML. Characteristics of leukemias and lymphomas. In: TURGEON ML. **Clinical Hematology: Theory and Procedures 3^a Ed.** USA: LW & W. 206, 1999.

- TUZUNER N, COX C, ROWE JM, WATROUS D, BENNETT JM. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. **British Journal of Haematology**, **91**: 612, 1995.
- van BESIEN K, NICHOLS CR, TRICOT G, LANGEFELD C, MILLER ME, AKARD L, ENGLISH DK, GRAVES VL, CHEERVA A, MCCARTHY LJ, JANSEN J. Characteristics of engraftment after repeated autologous bone marrow transplantation. **Experimental Hematology**, **18**: 785, 1990.
- VANNUCCHI AM, BOSI A, IERI A, GUIDI S, SACCARDI R, LOMBARDINI L, LINARI S, LASZLO D, LONGO G, ROSSI-FERRINI P. Combination therapy with G-CSF and erythropoietin after autologous bone marrow transplantation for lymphoid malignancies: a randomized trial. **Bone Marrow Transplantation**, **17**: 527, 1996.
- VIGORITO AC, AZEVEDO WM, MARQUES AM, AZEVEDO AM, EID KAB, ARANHA FJP, LORAND-METZE I, OLIVEIRA GB, CORREA MEP, MIRANDA ECM, DE SOUZA CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies. **Bone Marrow Transplantation**, **22**: 1145, 1998.
- VIGORITO AC, MARQUES JFC Jr, ARANHA FJP, OLIVEIRA GB, MIRANDA ECM, DE SOUZA CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies: an update. **Haematologica**, **86**: 665, 2001.
- VOSE JM. Antibody-Targeted therapy for low-grade Lymphoma. **Seminars in Hematology**, **36**, (6): 15, 1999.
- WATANABE K, KAWAI Y, TAKEUCHI K, SHIMIZU N, IRI H, IKEDA Y, HOUWEN B. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. **Journal of Clinical Pathology**, **47**: 736, 1994.
- WEIDEN PL, SULLIVAN KM, FLOURNOY N, SANDERS JE, THOMAS ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, **304**: 1529, 1981.

- WILLIAMS SF, BITRAN JD, RICHARDS JM, De CHRISTOPHER PJ, BARKER E, CONANT J, COLOMB HM, ORLINA AR. Peripheral blood derived stem cell collection for use in autologous transplantation after high dose chemotherapy: an alternative approach. **Bone Marrow Transplantation**, **10**: 409, 1990
- YAMAMOTO M. Imunofenotipagem em leucemias mielóides agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **22**, (2): 169, 2000.
- YEAGER AM, KAIZER H, SANTOS G et al.. Autologous bone marrow transplantation in patients with acute non lymphoblastic leukemia using ex vivo marrow treatment with 4 hydroperoxy cyclophosphamide. **New England of Journal Medicine**, **315**: 141, 1986.
- ZITTOUN R. Chronic myelomonocytic leukaemia. In: Mufti GJ, Galton DAG. **The myelodysplastic syndromes**. Edinburgh: Churchill Livingstone. 65, 1992.



13. APÊNDICE

Tabela 5: Dados dos pacientes submetidos à TMO autólogo:

CASO	SEXO	IDADE (anos)	DIAGNÓSTICO	CITOCINA (dia +1/+5)	FONTE CÉLULAS INFUNDIDAS	CD34+ (10 ⁶ /Kg)	ANC	PLT	MFI%	VCMr/VCM	RetAbs
1	M	56	MM	G-CSF - 1	CPP	7,22	10	9	7	5	8
2	M	18	LNH	G-CSF - 1	CPP	16,45	12	11	N	7	11
3	M	35	MM	G-CSF - 5	CPP	7,4	12	20	13	13	11
4	M	49	LNH	G-CSF - 5	CPP	6,42	11	12	7	7	11
5	F	36	LNH	G-CSF - 5	CPP + MO	3,19	12	56	7	3	12
6	M	43	MM	G-CSF - 1	CPP	6,65	11	9	8	8	10
7	M	21	LNH	G-CSF - 1	CPP	6,76	11	19	5	5	11
8	M	15	LH	G-CSF - 1	CPP	7,47	11	17	4	9	12
9	M	46	LNH	G-CSF - 1	CPP	15,21	9	8	6	N	8
10	M	42	MM	G-CSF - 1	CPP	5,55	11	13	10	N	12
11	F	13	LH	G-CSF - 1	CPP	5,31	9	N	8	10	14
12	F	18	LH	G-CSF - 5	CPP	7,87	11	16	12	13	6
13	M	30	LNH	G-CSF - 5	CPP	6,36	13	13	6	12	12
14	F	53	LNH	G-CSF - 5	CPP	5,77	15	36	6	6	15
15	M	49	LNH	G-CSF - 1	CPP	6,19	11	12	10	11	12
16	M	48	LNH	G-CSF - 1	CPP	2,03	12	38	13	14	13
17	F	21	LH	G-CSF - 5	CPP	5,903	10	11	8	4	11
18	M	29	LH	G-CSF - 1	CPP	5,98	11	17	2	3	10
19	M	23	LMC	G-CSF - 5	CPP	6,17	14	20	12	7	13
20	M	19	LH	G-CSF - 5	CPP	4,61	11	14	10	6	16

M: masculino; F: feminino; MM: mieloma múltiplo, DH: doença de Hodgkin's; LNH: linfoma não-Hodgkin; LMC: leucemia mieloide crônica; G-CSF +1/+5: fator de crescimento de granulócitos administrado no dia +1 ou +5 pós-TMO; CPP: células progenitoras periféricas; MO: células da medula; CD34⁺ (10⁶/Kg): total de células CD34⁺ infundidas; ANC: dia da resposta medular pela contagem absoluta de neutrófilos; PLT: dia da resposta medular pela contagem de plaquetas; MFI%: dia da resposta medular pelo índice médio de fluorescência dos reticulócitos; VCMr/VCM: dia da resposta medular pela razão do volume médio do reticulócito/ volume corpuscular médio; RetAbs: dia da resposta medular pela contagem absoluta do reticulócito.

Tabela 6: Dados dos pacientes submetidos à TMO alogênico.

CASO	SEXO	IDADE (anos)	DIAGNÓSTICO	FONTE DE CÉLULAS INFUNDIDAS	CD34+ (10 ⁶ /Kg)	ANC	PLT	MFI%	VCMr/VCM	RetAbs
1	M	22	LMC	MO	6,48	16	18	20	15	19
2	M	34	LMC	MO	1,81	17	18	16	9	17
3	F	12	AA	MO	4,8	20	27	16	16	21
4	F	27	AA	MO	9,34	11	17	11	7	12
5	F	32	AA	MO	2,53	12	13	2	10	13
6	M	32	LMC	MO	1,21	24	23	17	7	17
7	F	16	LMC	CPP	3,52	18	13	11	7	16
8	F	33	LMA	MO	3,97	20	14	7	14	15
9	M	14	LMC	MO	2,66	19	12	12	6	14
10	M	30	LMC	CPP	3,51	25	26	11	12	18
11	M	39	LMA	CPP	4,43	12	12	9	9	11
12	M	54	LMC	CPP	4,98	21	14	9	12	14
13	M	17	LMC	MO	2,6	30	53	18	14	22
14	M	44	LMC	MO	3,15	29	40	14	10	30
15	M	31	LLA	CPP	4,97	9	15	11	6	12
16	M	48,2	LMC	MO	3,7	20	22	15	13	22
17	M	41	LMC	CPP	5,01	16	16	8	8	13
18	M	36	LMA	MO	4,26	16	13	12	8	18
19	M	24	LMC	MO	3,23	13	18	9	6	15
20	M	59	LMC	MO	4,48	14	18	13	9	17
21	M	28	LMC	MO	3,03	29	16	11	9	26
22	F	25	LMC	CPP	4,33	16	15	11	15	16

M: masculino; F: feminino; LMC: leucemia mielóide crônica; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; AA: anemia aplástica; CPP: células progenitoras periféricas; MO: células da medula óssea; CD34⁺ (10⁶/Kg): total de células CD34⁺ infundidas; ANC: dia da resposta medular pela contagem absoluta de neutrófilos; PLT: dia da resposta medular pela contagem de plaquetas; MFI%: dia da resposta medular pelo índice médio de fluorescência dos reticulócitos; VCMr/VCM: dia da resposta medular pela razão do volume médio do reticulócito/ volume corpuscular médio; RetAbs: dia da resposta medular pela contagem absoluta do reticulócito.