

Fracción de reticulocitos inmaduros

Immature reticulocyte fraction.

Benavídez C¹, García RV¹, Goedelmann CJ¹, González Cid P¹,
Sala MC¹, Durando MC¹.

¹ Laboratorio Central, Hematología y Hemostasia, Hospital de Pediatría
Prof. Dr. Juan P. Garrahan.

benavidezcintia@gmail.com

Fecha recepción: 29/03/2019

Fecha aprobación: 12/04/2018



LABORATORIO

HEMATOLOGÍA
Volumen 23 n° 1: 73-76
Enero - Abril 2019

Palabras claves: IRF,
reticulocitos,
automatización.

Keywords: IRF,
reticulocyte
automation.

Introducción

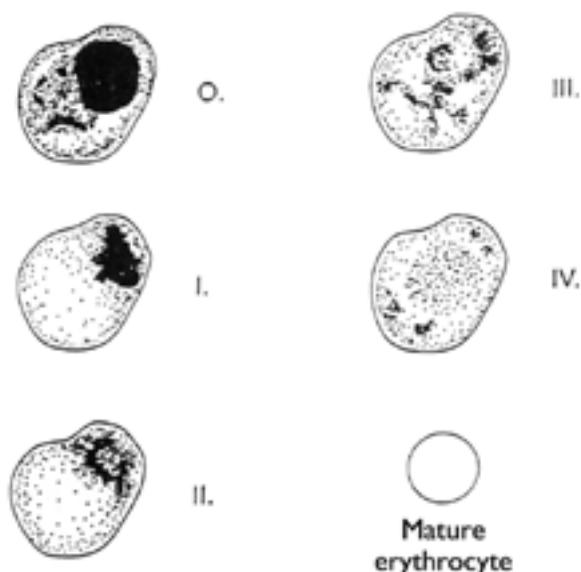
La fracción de reticulocitos inmaduros (IRF) es el término aceptado internacionalmente para hacer referencia a la cuantificación de la fracción más joven de reticulocitos presentes en circulación periférica. Durante el proceso de maduración de las células eritroides, el eritroblasto ortocromático pierde su núcleo y se convierte en un reticulocito, permaneciendo en la médula ósea durante tres días. Luego se libera a circulación donde se completa su maduración en un día. Este proceso representa cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que conducen a la remodelación de la membrana, variaciones del volumen y la eliminación de organelas y ribosomas, disminuyendo la cantidad de ácidos nucleicos citoplasmáticos, lo que refleja la pérdida

de ARN.

Se ha intentado clasificar morfológicamente a los reticulocitos de acuerdo a su madurez, teniendo en cuenta la cantidad y distribución de ARN presente en el citoplasma. En 1932 Ludwig Heilmeyer dividió a las células en cuatro grupos: I, II, III y IV, de acuerdo a la reducción progresiva de los ácidos nucleicos presentes (Figura 1). A partir del eritroblasto ortocromático, elemento con núcleo y material reticular distribuido por todo el citoplasma (no incluido en la clasificación reticulocitaria), se originan los reticulocitos del grupo I, con material reticular densamente agrupado, tras haber sido eyectado el núcleo. Este grupo celular es el estadio con más inmadurez reticulocitaria debido a la mayor cantidad de ARN

citoplasmático. Progresivamente, a medida que los reticulocitos maduran, disminuye y se redistribuye el contenido de ácidos nucleicos, alcanzando el estadio IV de reticulocito propiamente dicho, previo a transformarse en eritrocito maduro. Durante la eritropoyesis de un individuo fisiológicamente normal, más del 60% de los reticulocitos circulantes pertenecen al grupo IV, 30% al grupo III, y el resto a los grupos I y II⁽¹⁾, constituyendo la IRF. Pero en presencia de factores que estimulan la eritropoyesis, aumenta la producción de reticulocitos, se acorta el tiempo de permanencia en la médula ósea y se incrementa el de circulación y maduración en sangre periférica, evidenciándose un aumento de la IRF.

Figura 1. Estados de maduración reticulocitaria según la clasificación de Helimeyer. 0: eritrocito nucleado (eritoblasto ortocromático) fuertemente teñido. Grupo I: eritrocito no nucleado con retículo densamente agrupado. Grupo II: célula con retículo suelto formando una red. Grupo III: retículos dispersos en forma de gránulos y escasos formando una red. Grupo IV: escasos gránulos de retículos.



Fundamento del ensayo

Para determinar la IRF los autoanalizadores hematológicos utilizan dispersión de luz, discriminando por tamaño celular en eritrocitos y reticulocitos de los fragmentos de glóbulos rojos y plaquetas, y tecnología de fluorescencia para evidenciar el contenido de ARN. Las diferentes poblaciones de reticulocitos son separadas entonces de acuerdo al tamaño y cantidad

de ARN, y se clasifican en la fracción reticulocitaria con fluorescencia baja (LFR), media (MFR) y alta (HFR). El recuento de la MFR y HFR se corresponde con las formas reticulocitarias más inmaduras y constituye la IRF (Figura 2). Este modo de cuantificación ha sido consensuado para todos aquellos autoanalizadores que miden tres grupos celulares con diferente intensidad de fluorescencia.

Las distintas líneas de contadores hematológicos cuentan con colorantes de especificidades variables para teñir el ARN de los reticulocitos: los autoanalizadores Mindray colorean con cianina asimétrica, los CELL-DYN de Abbott con cianina, los PENTRA de Horiba con naranja de tiazol, los ADVIA de Siemens con oxacina 750 mientras que la línea XN (y algunos XE y XT) de Sysmex lo hacen con polimetina. Los equipos Beckman Coulter calculan la IRF mediante un método no fluorescente, utilizan nuevo azul de metileno, excepto la última generación, la línea UNICEL, que realiza la medición por citometría de flujo. Debido a las diferencias técnicas, la determinación de

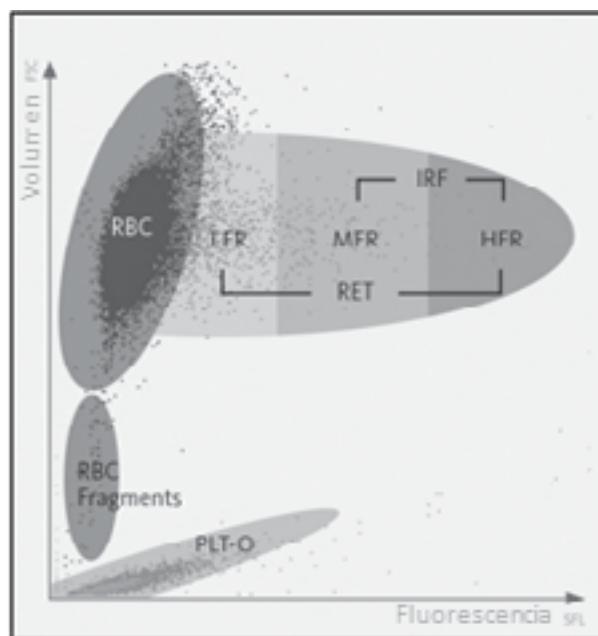


Figura 2. Canal de reticulocitos.

La medición de la IRF es realizada combinando MFR y HFR. La intensidad de la señal de fluorescencia resultante es directamente proporcional al contenido de ácidos nucleicos.

RBC: eritrocitos. RET: reticulocitos. IRF: fracción de reticulocitos inmaduros. LFR: reticulocitos con baja fluorescencia. MFR: reticulocitos con fluorescencia media. HFR: reticulocitos con alta fluorescencia. RBC fragments: fragmentos de eritrocitos. PLT-O: plaquetas ópticas.

la IRF es estrictamente dependiente del método⁽¹⁾, por lo que sus valores no son comparables si son medidos con distintas metodologías.

Características preanalíticas y analíticas

Para la medición de la IRF se utilizan muestras anticoaguladas con EDTAK2 o EDTAK3. La determinación se realiza en conjunto con el hemograma, representando una gran ventaja en cuanto a costos, tiempos de procesamiento y volumen de muestra requerido.

El almacenamiento de las muestras es la variable preanalítica más importante a tener en cuenta para su medición. Al igual que el recuento reticulocitario, los valores de IRF se modifican significativamente a temperatura ambiente luego de 24 hs de extraída la muestra debido a la maduración *in vitro* de los reticulocitos; mientras que si se conserva la muestra entre 4°C y 8°C los resultados se alteran luego de las 72 hs, según la bibliografía consultada⁽¹⁾. De todos modos es recomendable procesar la muestra durante las primeras horas pos extracción para minimizar estos errores, siendo imprescindible que cada laboratorio evalúe la estabilidad de sus muestras.

Se debe realizar el seguimiento del desempeño analítico del método utilizando material de control de calidad interno. Sin embargo, es importante destacar que las partículas y matrices que componen los controles de calidad suelen ser más estables que la sangre fresca, por lo que se puede enmascarar cierta imprecisión en la medición.

En cuanto a la evaluación por un control externo de calidad no existe en la actualidad un programa que incluya este parámetro, dado que las diferentes metodologías utilizadas para su medición hacen dificultoso su desarrollo.

Valores de referencia

La IRF puede expresarse como fracción, con valores entre 0 y 1, o como porcentaje del total de reticulocitos presentes.

Varios grupos de investigadores han reportados intervalos de referencia para adultos, entre ellos Butarello et al., 2017 (IRF 0.015 a 0.14, Mindray BC 6800 y IRF 0.012 a 0.15, Sysmex XE 5000)⁽²⁾, Nunes et al., 2014 (IRF 0.03 a 0.14, Sysmex XE) y otros⁽¹⁾.

En pediatría hay pocos intervalos de referencia reportados. El grupo de Teixeira et al. halló diferen-

cias significativas entre grupos etarios y entre sexo sólo en uno de estos grupos. Utilizando un ADVIA 2120 los datos reportados fueron: IRF 9.0 a 24.0 % (6 meses a 5 años), IRF 7.5 a 23.4 % (6 a 11 años), IRF 6.5 a 26.7 % (mujeres de 12 a 17 años) y IRF 6.9 a 23.0 % (varones de 12 a 17 años). En el laboratorio del hospital Garrahan se obtuvieron valores de referencia para población pediátrica utilizando Sysmex XN: 1,6% a 9,4%, sin encontrarse diferencias significativas entre edad y sexo (datos no publicados).

Al implementar la utilización de este parámetro, cada laboratorio debe verificar o establecer sus intervalos de referencia para el método de detección empleado.

Utilidad clínica

La IRF se ha propuesto como un marcador temprano de recuperación medular útil para el seguimiento de pacientes pos trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). Varios estudios han demostrado que la IRF puede predecir la recuperación de la línea celular mieloide pos TCPH tiempo antes que el recuento absoluto de neutrófilos (ANC)⁽³⁾, parámetro utilizado regularmente con este fin.

También se ha propuesto la medición rutinaria de la IRF para el manejo de pacientes sometidos a quimioterapias. Se espera que un paciente neutropénico con valores de IRF crecientes alcance un ANC > 100/ml en un corto lapso. Mientras que un paciente neutropénico con valores de IRF persistentemente bajos es más propenso a prolongar la neutropenia⁽³⁾. Si bien esta utilidad de la IRF ha sido evaluada durante varios años, y hay estudios que avalan su uso como marcador complementario para evidenciar recuperación medular, aún no ha sido adoptado en la práctica clínica diaria, a pesar de ser una prueba simple, económica, reproducible y ampliamente disponible. Otra utilidad propuesta para la IRF es como marcador temprano de movilización de celular CD34+ durante el proceso de recolección de células madres en sangre periférica, optimizando el tiempo de recolección pos terapia de estimulación⁽¹⁾.

Otros investigadores han estudiado el parámetro para el diagnóstico y seguimiento de las anemias, por ejemplo, la IRF en combinación con el recuento de reticulocitos puede ser útil para diferenciar la esferocitosis hereditaria (HS) de otros trastornos hemolíticos, ya que la HS es caracterizada por un

alto recuento de reticulocitos sin aumento de la IRF, mientras que otras anemias hemolíticas presentan, además del aumento del recuento de reticulocitos, una IRF elevada. El valor bajo de IRF en la HS puede atribuirse a dos posibles causas: el colorante fluorescente no puede ingresar a la célula por disminución de la permeabilidad de la membrana o hay disminución de ARN en estadio reticulocitario por pérdida de proteínas y organelas⁽⁴⁾.

En otras anemias en las que la eritropoyesis es reducida, como en la deficiencia de hierro o en la anemia de los procesos crónicos, el recuento total de reticulocitos se reduce y la IRF puede conservarse dentro del rango normal. Mientras que luego del tratamiento de una anemia nutricional (deficiencia de B12, folato o hierro) el aumento de IRF ocurre varios días antes del aumento en el recuento de reticulocitos⁽¹⁾.

La IRF es un parámetro prometedor que necesita consolidarse en la práctica clínica. Por tal motivo es importante que los laboratorios consideren la puesta punto de este parámetro para ser informado junto al hemograma.

Bibliografía

1. Piva E et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med.* 2015 Mar; 35(1):133-63.
2. Buttarello M et al. Reticulocyte count and extended reticulocyte parameters by Mindray BC-6800: Reference intervals and comparison with Sysmex XE-5000. *Int J Lab Hem.* 2017 Dec;39(6):596-603.
3. Graziutti ML et al. Recovery from neutropenia can be predicted by the immature reticulocyte fraction several days before neutrophil recovery in autologous stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation.* 2006 Feb;37(4):403-9.
4. Mullier F et al. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann Hematol* (2011) 90:759-768.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.