

Estudo comparativo dos métodos de coloração hematológica, para confecção de atlas de hematologia.

Comparative study of hematological staining methods for the creation of hematology atlases.

Thainá de Paulo Gonçalves¹, Simone Pereira Alves², Erica Cristina Rocha Roier³, Ana Paula Martinez de Abreu³, Philipe Mariano Almeida Fontes¹, Renata Fernandes Ferreira de Moraes³

Como citar esse artigo. Gonçalves, TP. Alves, SP. Roier, ECR. Abreu, APM. Fontes, PMA. Moraes, RFF. Estudo comparativo dos métodos de coloração hematológica, para confecção de atlas de hematologia. Rev Fluminense de Extensão Universitária. 2024;14(1):22-27.



Resumo

Este estudo realiza uma análise detalhada e estrutura a criação de um atlas de coloração hematológica específico para amostras de sangue bovino. Ao consultar obras de referência nas áreas da ciência laboratorial e medicina veterinária, a elaboração deste atlas busca oferecer um conjunto de exemplos como modelo para pesquisas futuras, funcionando como um método comparativo. Durante a execução do projeto, amostras de sangue bovino foram processadas por meio de esfregaços e submetidas a três diferentes técnicas de coloração: Panótico Rápido, Giemsa e Wright. As lâminas foram fotografadas utilizando microscópio da marca COLEMAN, XSZ-N107T, Brasil, de modelo Nikon, Eclipse E200, Japão, que possui a câmera acoplada BIO-HMDI 10.5MP, Biofocus, Brasil, do laboratório de insetos e vetores da Universidade de Vassouras. O resultado foi à produção de um documento composto por 27 páginas, dedicando um capítulo para cada corante utilizado, destacando exclusivamente as morfologias celulares normais de bovinos. Portanto, o propósito essencial deste atlas é, por meio da comparação das células sanguíneas, servir como uma referência para análises em futuras pesquisas no campo da hemopatologia. Além disso, este atlas facilita o acesso a informações essenciais para avaliadores, proporcionando uma ferramenta prática e de fácil consulta. A disponibilidade de um recurso visual detalhado e acessível é crucial para garantir precisão e eficiência na identificação de anomalias celulares, contribuindo significativamente para a qualidade e rapidez das análises hematológicas em ambientes veterinários.

Palavras-chave: Esfregaço sanguíneo; Sangue bovino; Corante.

Abstract

This study performs a detailed analysis and structures the creation of an atlas of hematological staining specific to bovine blood samples. By consulting reference works in the areas of laboratory science and veterinary medicine, the preparation of this atlas seeks to offer a set of examples as a model for future research, functioning as a comparative method. During the execution of the project, bovine blood samples were processed through smears and subjected to three different staining techniques: Rapid Panoptic, Giemsa and Wright. The slides were photographed using a microscope of the brand COLEMAN, XSZ-N107T, Brazil, of model Nikon, Eclipse E200, Japan, which has a BIO-HMDI 10.5MP camera coupled, Biofocus, Brazil, from the insect and vector laboratory of the University of Vassouras. The result was the production of a document composed of 27 pages, dedicating a chapter to each dye used, highlighting exclusively the normal cellular morphologies of bovines. Therefore, the essential purpose of this atlas is to serve as a reference for future research in the field of hemopathology through the comparison of blood cells. In addition, this atlas facilitates access to essential information for evaluators, providing a practical and easy-to-reference tool. The availability of a detailed and accessible visual resource is crucial to ensure accuracy and efficiency in the identification of cellular anomalies, contributing significantly to the quality and speed of hematological analyses in veterinary settings.

Keywords: blood smear; bovine blood; dye.

Introdução

Para que se determine uma terapia correta e um prognóstico para cada caso, é necessário que o médico veterinário estabeleça um diagnóstico, assim como estratégias de prevenção e controle para os indivíduos ou rebanhos ainda não acometidos. Para que isso ocorra de forma precisa, é necessário que o clínico tenha uma sequência de exames definidos e que seja realizado em

todos os animais¹.

Um dos exames mais solicitados para avaliação do estado de saúde do animal é o hemograma. Ele serve como um auxílio ao exame clínico, facilitando a percepção de possíveis alterações que não são visíveis na anamnese². O método de esfregaço sanguíneo é um importante aliado ao exame laboratorial, e possui grande relevância em conjunto com o hemograma, sendo possível diagnosticar anormalidades no sangue. Ele é corado dentro de alguns segundos ou minutos,

Afiliação dos autores:

¹Discentes do curso de medicina veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

²Discente do curso de mestrado profissional da Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

³Docentes do curso de medicina veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil

* Email de correspondência: thainag@outlook.com.

Recebido em: 14/11/2023. Aceito em: 11/06/2024.

dependendo do corante de eleição³. Existem vários tipos de corantes e combinações disponíveis. No entanto, a coloração do tipo *Romanowsky*, que incluem os corantes de Wright, Giemsa e Diff-Quik (Panótico Rápido) são bem conhecidas e as mais utilizadas, em razão do seu baixo custo, praticidade e facilidade de execução⁴.

O mercado possui diversos atlas de hematologia de animais domésticos, com outras colorações mais elaboradas, entretanto há uma escassez de material que exiba as colorações feitas com o Panótico Rápido, sendo o mesmo o corante mais utilizado na rotina laboratorial para corar esfregaço sanguíneo.

Dessa forma, a preparação de um atlas hematológico, com células coradas com o Diff-Quick, corante mais utilizado na rotina laboratorial, junto de outras duas técnicas diferentes (Wright e Giemsa), convém a médicos veterinários auxiliar em diagnósticos de forma que seja uma consulta rápida de método comparativo entre células saudáveis e que apresentem alguma patologia.

Materiais e Métodos

Este projeto de inovação tecnológica faz parte de um projeto maior de pesquisa com o título: “Acompanhamento hematológico e bioquímico de novilhas da raça bovina Girolando”, realizado na Universidade de Vassouras, aprovado pelo CEUA sob número 014/2022.

A construção desse produto sucedeu-se das coletas utilizando o sangue de três bovinos, sendo um macho e uma fêmea em idade adulta e um bezerro, com amostras de sangue coletadas em tubos EDTA (com anticoagulante), sendo uma amostra transferida para o tubo de microhematócrito. Foi realizada a técnica de esfregaço sanguíneo e corada com suas diversas formas de cores representativas, visando enriquecer o conhecimento sobre como os diferentes corantes agem nas células. A partir das coletas realizadas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa supracitado, foram confeccionados esfregaços sanguíneos corados utilizando-se três metodologias diferentes: Panótico Rápido, Wright e Giemsa, descritas a seguir.

O método de coloração Panótico Rápido, baseado no princípio de *Romanowsky*, age em 15 segundos. O procedimento envolve a preparação e secagem dos esfregaços sanguíneos, seguido de submersão sequencial em três soluções com Triarilmetano, Xantenos e Tiazinas. Cada submersão dura 5 segundos, seguida pela lavagem com água deionizada e secagem ao ar na posição vertical⁵.

A coloração de Wright é uma técnica histológica que usa corantes ácidos, eosina (vermelho), e básico azul de metileno para diferenciar células sanguíneas. A composição inclui 30 ml de Glicerina Bidestilada,

3 gramas de Wright e 1000 ml de Metanol, com pH variando de 8,0 a 9,2 a 25°C. O procedimento consiste em cobrir a lâmina com Wright puro por 1 minuto, adicionar 20 gotas de água tamponada pH 6,8-7,0 por 5-8 minutos, e finalizar com lavagem e secagem em posição vertical⁶.

O corante Giemsa, composto por azul II e eosinato de azul, é combinado com May-Grünwald para oferecer uma coloração abrangente aos elementos celulares. A composição é de 6 gramas de Giemsa, 500 ml de Glicerina e 500 ml de Metanol. O procedimento inclui cobertura da lâmina com metanol puro por 3 minutos, seguido pela aplicação da solução diluída de Giemsa (1 gota por 1 ml de água destilada) por 13-15 minutos. Após lavagem com água destilada, a lâmina é deixada secar em posição vertical⁷.

Após estes procedimentos, as lâminas foram fotografadas utilizando microscópio da marca COLEMAN, XSZ-N107T, Brasil, de modelo Nikon, Eclipse E200, Japão, que possui a câmera acoplada BIO-HMDI 10.5MP, Biofocus, Brasil, do laboratório de insetos e vetores da Universidade de Vassouras.

Como resultado desses procedimentos, foi criado um atlas que destaca uma ampla coleção de células coradas por distintos corantes. Este atlas, apresentado em um documento PDF com 27 páginas, revela cuidadosamente 54 imagens catalogadas.

A estrutura do atlas é organizada em seções dedicadas a corantes específicos, como Wright, Panótico Rápido e Giemsa. Cada seção é composta por 18 fotos coloridas, alocando seis imagens para cada animal em consideração. O cuidado na disposição visa proporcionar uma visão abrangente das variações celulares.

Cada fotografia é enriquecida com comentários elucidativos. Esses comentários não se limitam a descrever o método de coloração empregado, como também identificam a célula apresentada, especificando a qual animal ela pertence. Esta abordagem visa oferecer uma compreensão detalhada não apenas do processo de coloração, mas da identidade e contexto das células observadas.

Ao unir a precisão na catalogação das imagens com informações detalhadas sobre os métodos de coloração, o atlas se destaca como uma ferramenta para profissionais e estudantes envolvidos na análise de células.

Resultados

Durante a aplicação dos três corantes, foram confeccionadas lâminas com diferentes colorações e imagens distintas. Ao comparar as imagens, houve nítida percepção visual de tonalidades e nuances na coloração das células, onde foi perceptível a diferença

que os corantes desempenham ao demarcar as estruturas celulares. Também foi possível notar variações significativas na dificuldade e no tempo necessário para colorir as lâminas.

Com isso, foi desenvolvido um atlas em formato PDF com 27 páginas, apresentando uma coleção de 54 imagens de células coradas por diferentes corantes. O atlas está organizado em seções dedicadas aos corantes Wright, Panótico Rápido e Giemsa, com cada seção contendo 18 fotos coloridas. Cada animal considerado possui seis imagens por corante. Cada fotografia foi acompanhada por comentários elucidativos que não

apenas descrevem o método de coloração utilizado, mas, identificam a célula apresentada e especificam a qual animal ela pertence, conforme ilustrado nas figuras 1-9.

Apesar da abrangência das imagens, incluindo leucócitos e eritrócitos, é importante salientar uma limitação: a busca por basófilos revelou-se desafiadora, resultando na ausência da catalogação dessa célula específica nas imagens apresentadas.

Em comparação, o Panótico Rápido se destacou como o mais eficiente em termos de facilidade e rapidez na coloração. Enquanto isso, o corante Wright demandou

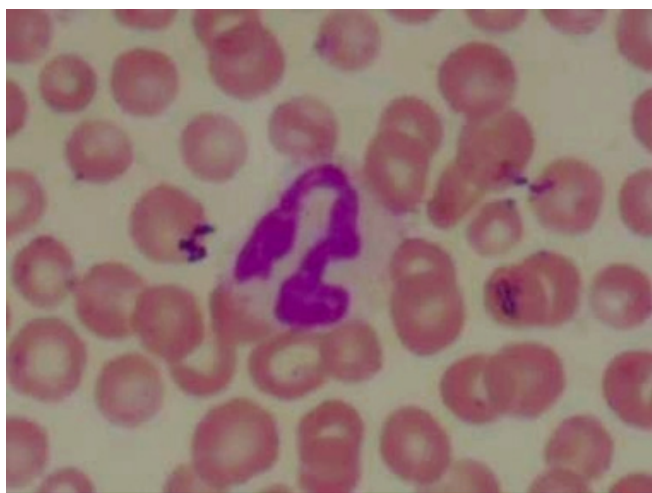


Figura 1: Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Wright. Neutrófilo de um bovino macho. Aumento 100x. Autoria: Thainá Gonçalves, 2023

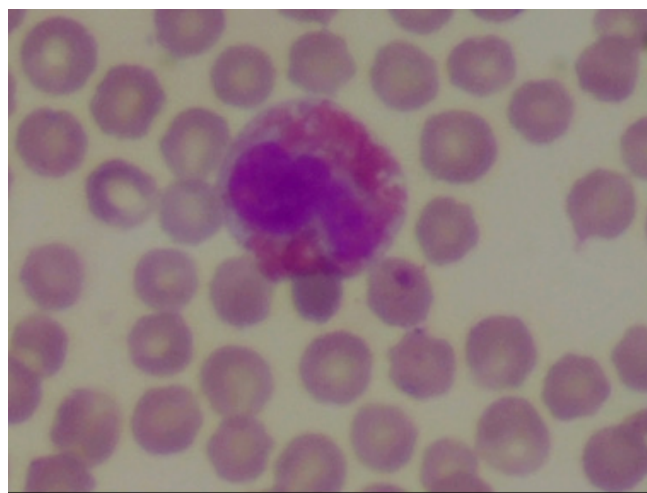


Figura 2: Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Wright. Eosinófilo de um bovino fêmea. Note a melhor definição dos grânulos desta célula. Aumento 100x. Autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

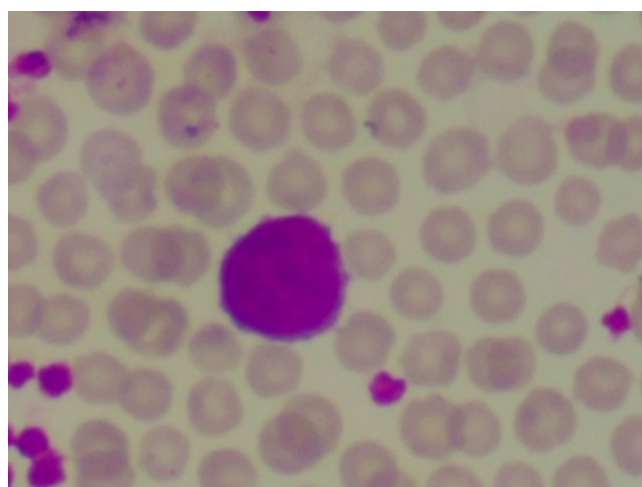


Figura 3: Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Wright. Linfócito reativo de um bezerro. Aumento 100x. Autoria: Thainá Gonçalves, 2023.



Figura 4: Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Panótico Rápido. Neutrófilo de um bovino macho. Note a diferença de tonalidade de azul entre as colorações. Aumento 100x. Autoria: Thainá Gonçalves, 2023.



Figura 5. Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Panótico Rápido. Eosinófilo de um bovino fêmea. Note a baixa definição dos grânulos desta célula. Aumento 100x. A autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

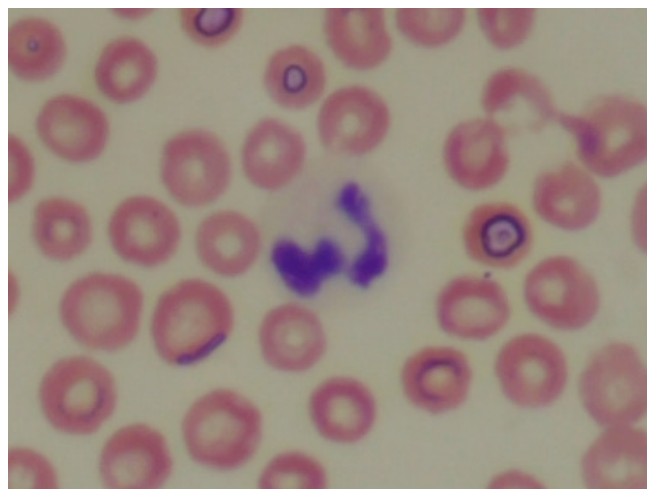


Figura 7. Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Giemsa. Neutrófilo de um bovino macho. Aumento 100x. A autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

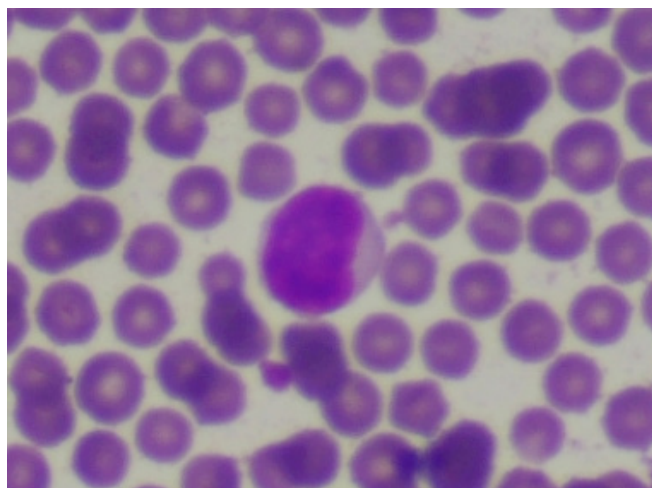


Figura 6. Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Panótico Rápido. Linfócito de um bezerro. Aumento 100x. A autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

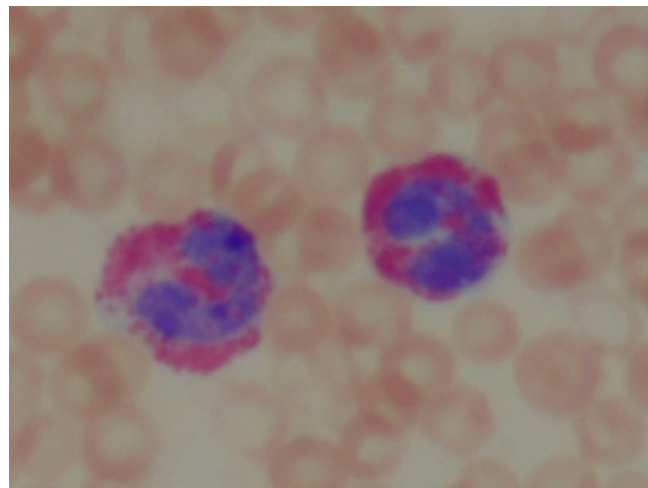


Figura 8. Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Giemsa. Eosinófilo de um bovino fêmea. Note a baixa definição dos grânulos desta célula. Aumento 100x. A autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

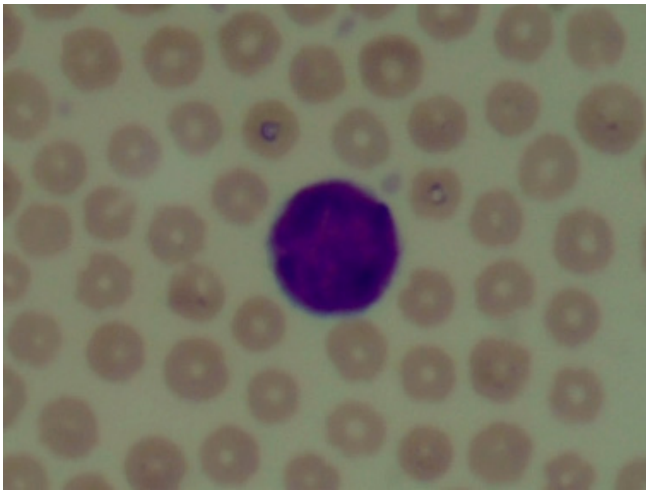


Figura 9. Esfregaço sanguíneo corado por metodologia segundo Giemsa. Linfócito reacional de um bezerro. Aumento 100x. Autoria: Thainá Gonçalves, 2023.

um tempo médio de 9 minutos, e o Giemsa exigiu um período ainda mais longo e uma habilidade um pouco mais aprimorada, evidenciada pela necessidade de repetir a coloração em algumas lâminas para obter resultados precisos.

Entretanto, tanto o Giemsa quanto o Wright demonstraram uma diferenciação mais eficaz dos leucócitos. Por outro lado, o método Panótico Rápido destacou-se por proporcionar uma diferenciação satisfatória das células de maneira rápida.

Discussão

No final do século XIX, houve avanços significativos nas técnicas tintoriais em hematologia. *Romanowsky* desempenhou um papel crucial ao desenvolver uma combinação de corantes derivados de azul de metileno e eosina. Estes corantes, geralmente dissolvidos em metanol, permitem distinguir células por cores distintas. As formulações disponíveis atualmente, como Leishman, May-Grunwald, Giemsa e Wright, são compostas por proporções variadas desses corantes⁸, o que garantiu neste estudo uma melhor qualidade na coloração quando estes tipos de corantes foram utilizados.

Todos os três corantes são neutros e atuam do mesmo modo, dependem do pH da solução para uma demarcação das estruturas. As estruturas ácidas são coradas em tons de vermelho e as estruturas básicas em tons de azul. Em estruturas com o pH neutro, essa coloração se torna intermediária entre o azul e o vermelho⁷. Quando coradas as lâminas, a percepção pode apresentar colorações distintas, por consequência da acidez ou alcalinidade excessiva⁴, que foi demonstrada quando se comparou as colorações. Diferentes corantes

podem apresentar variações significativas de pH, pois dependem do tempo em contato com o ar ambiente e grau de umidade, e ainda, de acordo com a bula do Panótico instantâneo, a contaminação entre corantes do mesmo kit podem modificar a acidez/alcalinidade do reagente.

Ao utilizar o Panótico Rápido, macroscopicamente o esfregaço deve apresentar uma tonalidade rosa-mate. Quando utilizado o microscópio, as plaquetas apresentam coloração púrpura com um ponto vermelho visível⁵. Um esfregaço corado com Wright, macroscopicamente deve ter uma tonalidade rosa-mate uniforme. Microscopicamente, as plaquetas devem ser púrpuras com pontos avermelhados visíveis⁶. Já o esfregaço corado com Giemsa, macroscopicamente, este deve apresentar uma tonalidade rosa-mate uniforme. Microscopicamente, as plaquetas devem se apresentar púrpuras com pontos avermelhados visíveis⁷. Como diversos autores descrevem esta variação de tonalidades entre os corantes, o atlas atinge sua finalidade, que é demonstrar ao patologista veterinário imagens que ilustram estas diferenças.

Lâminas que exibem uma coloração intensamente avermelhada sugerem a presença de acidez excessiva, enquanto aquelas que apresentam tonalidades fortemente azuladas indicam um nível elevado de alcalinidade⁶, ponto este difícil de mensurar principalmente com o Panótico Rápido uma vez que sua metodologia tem um grau de subjetividade.

Quando comparados os três métodos de coloração, o Wright apresentou resultados mais satisfatórios, além disso, possui como vantagem não necessitar de fixação para coloração das lâminas. O Giemsa apresentou resultados satisfatórios, contudo possui o inconveniente de necessitar de um tempo maior para coloração⁹. Quando observados o Panótico Rápido, Giemsa e o Wright nota-se a diferença de demarcação dessas estruturas, sendo o Giemsa e o Wright demarcando melhor as estruturas celulares e seus grânulos. Todavia, em uma alta demanda de exames a serem trabalhados, a utilização deles se torna impossibilitada, visto que demandam um tempo maior para corar as células¹⁰, justificando a existência de uma comparação entre imagens para facilitar a identificação de diferentes tipos celulares.

É necessário destacar que nas lâminas analisadas, não foi possível encontrar a presença de basófilos, sendo células por sua natureza, difíceis de serem encontradas em esfregaços sanguíneos, pois tem um número reduzido circulante e sua formação é antígeno dependente, por isso, em alguns casos como infestações parasitárias e alergias, há possibilidade de serem encontrados, contudo não é uma certeza¹¹.

Considerações finais

O Panótico Rápido mostrou-se mais eficiente em termos de velocidade e praticidade, mas, em contrapartida, a qualidade da coloração que o Wright e o Giemsa entregam é superior.

Ainda que possua resultados inferiores em relação aos demais corantes, o Panótico Rápido é capaz de corar as estruturas de modo que seja possível a diferenciação das células de uma forma rápida.

Agradecimentos

Quero expressar minha sincera gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Sem o financiamento concedido por eles, nada disso seria possível.

Apoio financeiro

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse de nenhuma natureza.

Referências

1. Bond GB, Almeida R, Ostrensky A, Molento CFM. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. *Cienc Rural* [Internet]. 2012 Jul;42(7):1286–93. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000044>
2. Rondelli LAS, Becker M, Caldeira FHB, Ribeiro M, Furlan FH, Colodel EM, et al.. Anemia hemolítica em bovinos de corte em sistema de criação extensiva em Mato Grosso e Rondônia. *Pesq Vet Bras* [Internet]. 2018 Aug;38(8):1475–83. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5265>
3. Ramirez-Ubillus GC, Neira-Montoya CR, Sedano-Gelvet EE, Verona-Cueva JF. Validation of a new method for estimating low platelet counts: G&S method. *J Bras Patol Med Lab* [Internet]. 2020;56:e1912020. Available from: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200036>
4. Gonçalves J, Pizzichini E, Pizzichini MMM, Steidle LJM, Rocha CC, Ferreira SC, et al.. Reliability of a rapid hematology stain for sputum cytology. *J bras pneumol* [Internet]. 2014 May;40(3):250–8. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132014000300008>
5. Panótico Rápido [RapidPanopticon]. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratórios LTDA: 2015.
6. Wright [Wright]. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratórios LTDA: 2015.
7. Giemsa [Giemsa]. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratórios LTDA: 2015.
8. Zebral Y, Zafalon BS, Robaldo R. Teste de corantes para análise e identificação de células sanguíneas em *Odontesthes bonariensis*. In: XX Congresso de Iniciação Científica: III Amostra Científica – Universidade

Federal de Pelotas; 2011. Nov 8-11; Pelotas, Brasil. Pelotas/RS: Universidade Federal de Pelotas, 2011.

9. Schützler RC. Estudo comparativo entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa dentro de uma rotina laboratorial. *Reis* [Internet]. 5º de novembro de 2022;9(2). Available from: <https://reis.unisociesc.com.br/index.php/reis/article/view/375>

10. Magalhães AM, Ramadina RR, Barros CSL, Peixoto PV. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* [Internet]. 2011;(1):23–32. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000100006>

11. Valle SF, Contreras LVQ. Hematologia e alterações hematológicas em ruminantes domésticos. *Revista Brasileira de Buiatria* [Internet]. 2021;2763-955X. Available from: doi: 10.4322/2763-955X.2022.001