ANTONIO ALTAIR MAGALHÃES OLIVEIRA

COMPORTAMENTO DO "NEW METHYLEN BLUE" NA COLORAÇÃO DE RETICULÓCITOS

Trabalho experimental apresentado à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em
Farmácia e Bioquímica - Área de Análises Clínicas

SÃO PAULO
1980

À Heloisa e Althair, meus pais.

À Nálcia, minha esposa.

*Ao Prof.Dr. Domênico H.G.P. Barbieri
orientador e grande amigo.*

À Lídia Maria Martins Fontes

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra. Iracema Alencastro da Silva, pelo incentivo, apoio e sugestões.

Ao Prof.Dr. Günter Hoxter pela colaboração na execução da Análise Estatística.

Ao Prof. Gilberto de Castro Porto, pela amizade, incentivo e auxílio nas revisões.

À Inês Imperatriz pela colaboração na revisão da bibliografia.

A Yvone de Abreu Gambeta pela datilografia.

À colega Maria Cláutemis Guimarães Reis pela colaboração na execução da parte experimental.

Aos colegas e amigos da Hematologia, pelo incentivo e apoio:

Profa. Lúcia Helena Meloni Bruneri

Profa. Primavera Borelli Garcia

Frederico José Floriano Theobaldo

Neusa Mitsuko Niwa

Álide Aparecido Tercero

Célia Maria Viegas Giraldes

Marlene Arroio Moreira

A todos os colegas e amigos que de forma direta ou indireta, colaboraram na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	4
3. EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES E RESULTADOS	5
3.1 Solução Metanólica do "New Methylen Blue" (NMB)	5
3.2 Solução aquosa do NMB - preparação em lâmina..	6
3.3 Solução aquosa do NMB - preparação "a fresco"..	7
3.4 Solução salina do NMB - contagem em câmara conta-glóbulos	7
3.5 Solução aquosa do NMB segundo o método de BRECHER ⁶ , com modificação da técnica	9
3.6 Análise das experiências descritas	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Material	11
4.1.1 Grupo Controle	11
4.1.2 Grupo Patológico	12

	Pág.
4.2 Métodos	12
4.2.1 Coleta de Material	12
4.2.2 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o Azul de Cresil Brilhante	13
4.2.3 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o "New Methylen Blue" - Método de BRECHER ⁶ ..	13
4.2.4 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o "New Methylen Blue" - Método de BRECHER modificado	14
4.2.5 Métodos Gerais	14
4.2.6 Métodos Estatísticos	15
5. RESULTADOS	19
5.1 Grupo Controle: contagem de reticulócitos...	19
5.2 Grupo Patológico: contagem de reticulócitos.	19
5.3 Grupo Controle: Análise Estatística	20
5.4 Grupo Patológico: Análise Estatística	20
5.5 Grupo Patológico	20
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9. APÊNDICE	42

I. INTRODUÇÃO

A determinação do número de reticulócitos é de grande valia para o estudo das hemopatias, notadamente das anemias, com objetivo diagnóstico, acompanhamento evolutivo, avaliação terapêutica e outros.

Os reticulócitos são elementos celulares anucleados, pertencentes à linhagem eritrocitária. Contêm no seu interior uma estrutura granulosa ou filamentosa, que se cora quando submetida à coloração por corantes vitais. Quando o elemento deixa de revelar a presença desta substância grânulo-filamentosa, significa que alcançou a completa maturação e passa a denominar-se eritrócito. Os reticulócitos mais imaturos contêm substância grânulo-filamentosa em abundância, enquanto os mais maduros possuem escasso retículo ou somente raros grânulos.

De acordo com a quantidade, aspecto e distribuição da substância grânulo-filamentosa, os reticulócitos apresentam quatro tipos ¹⁴:

a) Pseudonucleado: a substância encontra-se condensada no centro da célula, imitando o núcleo de um eritroblasto (fotomicrografia 1).

b) Retículo completo: a substância distribui-se por todo o citoplasma do reticulócito formando uma rede (fotomicrografia 2).

c) Retículo parcial ou incompleto: a substância encontra-se em menor quantidade e a rede ocupa parte do reticulócito (fotomicrografia 3),

d) Ponteadado granuloso: pequenos grânulos da substância situam-se na periferia do reticulócito (fotomicrografia 4).

A coloração vital do reticulócito, revelam-se agregados de material que se apresentam de cor azul-intenso, dispostos em grânulos e filamentos reticulares. O material que assim é revelado constitui-se de ribossomos, mitocôndrias³ e outras organelas citoplasmáticas¹⁷.

Chamam-se estruturas vitais aquelas que estando no interior das células, não apresentam alterações notáveis no seu aspecto e nas suas funções, pelo menos por uma hora, quando submetidas a um corante dito vital. Por coloração vital, entende-se a que preserva as estruturas vitais, ou seja: àquela que se obtém sobre um animal vivo e também "in vitro" sobre células ou tecidos separados do organismo. Designa-se corante vital aquele

empregado nas colorações vitais ².

Para a coloração dos reticulócitos podem ser empregados os seguintes corantes: Vermelho Neutro, Verde Janus, Azul de Cresil Brilhante, "Acridine Orange", Azul do Nilo (sulfato) e "New Methylen Blue"(NMB) ³, existindo diferentes métodos de coloração vital empregando estes corantes.

O reticulócito vem sendo estudado, utilizando-se, como corante vital, o Azul de Cresil Brilhante, podendo-se afirmar que se trata do corante mais divulgado para esse fim ^{1, 8, 11, 13, 18}. BRECHER ⁶ divulgou método de contagem de reticulócitos em que emprega o NMB como corante. Embora nos pareça apresentar melhor resultado visual, temos a impressão de que este método não vem sendo adotado em maior escala, na rotina laboratorial, apesar de ter merecido divulgação por parte de vários autores ^{8, 12, 13, 18}.

Este fato estimulou o nosso interesse em relação ao assunto agora apresentado.

2. PROPOSIÇÃO

No presente trabalho o autor se propõe a:

- 2.1 Realizar uma comparação dos métodos de contagem de reticulócitos no sangue, utilizando dois corantes vitais: o Azul de Cresil Brilhante e o "New Methylen Blue" (NMB).
- 2.2 Estabelecer uma modificação na técnica de contagem de reticulócitos que emprega o NMB, o que permitiria torná-la de mais fácil execução em rotina laboratorial.
- 2.3 Determinar a contagem de reticulócitos em indivíduos considerados normais e em pacientes portadores de hemopatias, empregando-se o NMB como corante e adotando a técnica modificada, para que possamos avaliar a aplicabilidade do método.

3. EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES E RESULTADOS

Com a finalidade de se estabelecerem as condições mais adequadas, para a modificação do método de BRECHER ⁶ várias experiências foram realizadas preliminarmente, adotando-se diversas variáveis, a saber:

- a) tipos de solução: alcoólica e aquosa;
- b) concentração do corante;
- c) tempo de coloração;
- d) tipo de contagem: em câmara contaglôbulos, em lâminas de extensão de sangue em preparações a fresco.

3.1 Solução Metanólica do "New Methylen Blue" (NMB)

O corante foi empregado nas concentrações de 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1% em solução metanólica. Colocando-se o corante e o sangue em contacto em um tubo capilar, foi o mesmo deixado em repouso por 10 minutos, após os quais foram feitas extensões em lâminas, conforme preconizado por BRECHER ⁶.

a) Realizaram-se leituras de preparações contra-coradas pelo corante de Leishman.

b) Realizaram-se leituras de preparações contra-coradas por uma solução metanólica de eosina a 2 e a 5%.

c) Realizaram-se leituras de preparações sem contra-coloração.

d) Os tempos de coloração para as leituras em a, b e c foram de 1; 2; 5; 10 e 15 minutos.

3.2 Solução aquosa do NMB - preparação em lâmina

Empregou-se uma solução aquosa de NMB a 0,5% segundo BRECHER⁶ com as seguintes variações:

3.2.1 Utilizou-se na contra-coloração uma solução metanólica de eritrosina nas seguintes concentrações:

a) 0,01% com tempo de coloração de 1; 5 e 10 minutos;

b) 0,02% com tempo de coloração de 1; 5 e 10 minutos;

c) 0,2% com tempos de coloração de 1 e 5 minutos.

3.2.2 Extensões em lâmina, colocando-se a solução corrente sobre a preparação:

- a) em extensões não fixadas;
- b) em lâminas fixadas previamente por:
 - Metanol a 90; 80; 70; 60 e 50%
 - Etanol a 90; 80; 70; 60 e 50%.

3.3 Solução aquosa do NMB - preparação "a fresco"

Empregaram-se soluções aquosas a 0,3; 0,2 e 0,1%, misturando-se uma gota de cada solução com uma gota de sangue, sobre uma lâmina. As misturas foram cobertas com lamínulas e a preparação foi lutada. Para cada uma das diluições, as leituras foram efetuadas após 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos.

3.4 Solução salina do NMB - contagem em câmara conta-glóbulos

Com a finalidade de se obter diretamente o número de reticulócitos por mm^3 de sangue, foram empregadas soluções salinas do NMB, em diferentes concentrações. Empregou-se a câmara conta-glóbulos de Neubauer, sendo as leituras efetuadas nos retículos destinados habitualmente à contagem de leucócitos.

a) Empregou-se a técnica de BRECHER⁶ para o contacto entre o sangue e corante, este último preparado nas concentrações de 0,1 e 0,05%, em salina; 0,02 ml de sangue foram diluídos em 4 ml do corante (diluição 1/200).

b) 0,02 ml de sangue foram diluídos em 4 ml da solução salina do NMB, nas concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,15 e 0,25% (diluições de 1/200).

c) Nos itens a e b, após a câmara ter sido preenchida, foi mantida em repouso por 10 minutos, em "câmara úmida".

d) Para a solução salina do NMB a 0,2%, foram empregadas diluições sanguíneas a 1/200 e 1/400, permanecendo o sangue 15 minutos em contacto com o corante e, após o preenchimento da câmara, 15 minutos em repouso em "câmara úmida".

e) Para a solução salina do NMB a 0,3%, foram empregadas diluições a 1/100 e 1/200, com o tempo de contacto de 25 minutos para sangue e o corante e o tempo de 5 minutos para o repouso em "câmara úmida".

3.5 Solução aquosa do NMB segundo o método de BRECHER⁶,
com modificação da técnica

A modificação introduzida na técnica de BRECHER, para a coloração de reticulócitos, constituiu em substituir-se o tubo capilar onde é feito o contacto do sangue com o corante, por um tubo de vidro de 12x75mm, no interior do qual esse contacto é realizado. Foram efetuadas contagens de reticulócitos em lâminas contra-coradas com o corante de Leishman e em lâminas não coradas.

3.6 Da análise das experiências descritas, pudemos concluir que as melhores condições para a visualização e contagem dos reticulócitos, empregando-se o NMB como corante, foram:

a) o corante, em solução metanólica, estava na concentração de 0,5%, ficando o mesmo em contacto com o sangue em um tubo capilar, em repouso por 10 minutos, após os quais foram feitas extensões em lâminas, conforme preconizado por BRECHER⁶. As leituras foram realizadas em lâminas contra-coradas pelo corante de Leishman. Nas concentrações de 0,1 a 0,3%, os eritrócitos estavam profundamente alterados.

b) Solução aquosa do NMB a 0,3; 0,2 e a 0,1%, misturando-se uma gota de cada uma destas soluções com uma gota de sangue, sobre uma lâmina. As misturas foram cobertas com lamínulas e a preparação lutada. Para cada uma das diluições, as leituras foram efetuadas após 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos. Todas as preparações permitiram a visualização dos reticulócitos, exceção feita quando se empregou a solução a 0,1% com o tempo de 15 minutos.

c) Solução aquosa de NMB, segundo o método de BRECHER ⁶, com modificação da técnica original, que consistiu na substituição do tubo capilar, onde é feito o contacto do sangue com o corante, por um tubo de vidro de 12 x 75 mm, no interior do qual esse contacto é realizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Grupo Controle

Este grupo foi constituído por elementos pertencentes ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Desta coletividade, composta por 90 pessoas, foram escolhidos, por sorteio, 14 indivíduos do sexo masculino, cujas idades variaram de 21 a 38 anos e 13 do sexo feminino, entre 19 e 31 anos de idade. Submetidos à anamnese, informaram não serem portadores de nenhuma doença de que tivessem conhecimento; negaram qualquer sintomatologia clínica e o uso de medicamentos. Adotamos ainda, como critérios de normalidade, que as determinações hematimétricas estivessem dentro dos seguintes limites:

Eritrócitos 3,9 a $6,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue.

Concentração de Hemoglobina...11,5 a 18,0 g%.

Volume Hematócrito.....35 a 54%,

conforme estabelecido por DACIE e LEWIS ⁷.

Nos elementos do sexo feminino, o sangue foi colhido na segunda metade do ciclo menstrual (QUADRO I).

4.1.2 Grupo Patológico

Este grupo foi constituído por 42 pacientes portadores de hemopatias, em diferentes estados evolutivos, que se encontravam em observação, hospitalizados ou em ambulatório, sob os cuidados de um Hematologista Clínico. Deste grupo, 16 eram do sexo masculino e 26 do sexo feminino, com as idades variando de 1 ano e 4 meses a 61 anos e de 2 anos e 6 meses a 80 anos, respectivamente (QUADRO II).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de Material

O material foi obtido por punção da veia da dobra do cotovelo. O garrote era retirado do braço do paciente imediatamente após a punção venosa, antes de se iniciar a aspiração do sangue. O sangue venoso coletado, cerca de 3 ml, era transferido para frascos contendo 5,0 mg de Etileno diaminotetracetato dissódico (EDTA), agitando-se delicadamente o frasco.

Do sangue coletado foram feitas extensões, em duplicata, para cada um dos métodos utilizados. Observou-se um período máximo de 30 minutos, decorridos entre a coleta e a coloração vital dos reticulócitos.

4.2.2 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o Azul de Cresil Brilhante

A contagem de reticulócitos pela técnica que emprega o Azul de Cresil Brilhante, foi realizada seguindo-se o descrito em VARELA¹⁵. De cada paciente prepararam-se duas extensões de sangue, sendo que uma delas foi submetida à contra-coloração pelo corante de Leishman.

O número de reticulócitos foi avaliado microscopicamente, com objetiva de imersão, em aumento final de 1000x, sendo examinados cerca de 2000 eritrócitos e a contagem obtida expressa em reticulócitos por 100 eritrócitos e por mm³ de sangue.

4.2.3 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o "New Methylen Blue" - Método de BRECHER⁶

A contagem de reticulócitos pelo "New Methylen Blue", foi realizada segundo a técnica de BRECHER⁶. De cada paciente, uma lâmina foi submetida à contra-coloração pelo corante de Leishman e a outra não.

O número de reticulócitos foi avaliado microscópicamente, com objetiva de imersão e em aumento de 1000 x, examinando-se cerca de 2000 eritrócitos, e a contagem obtida, expressa em reticulócitos por 100 eritrócitos e por mm³ de sangue.

4.2.4 Contagem de reticulócitos no sangue utilizando-se como corante o "New Methylen Blue" - Método de BRECHER modificado

A contagem de reticulócitos utilizando-se o corante "New Methylen Blue", foi também realizada pelo Método de Brecher modificado, conforme descrito em 3.5. De cada paciente, uma lâmina foi submetida à contra-coloração pelo corante de Leishman e a outra não o foi.

O número de reticulócitos foi avaliado microscopicamente, com objetiva de imersão e em aumento de 1000 x, examinando-se cerca de 2000 eritrócitos e a contagem obtida, expressa em reticulócitos por 100 eritrócitos e por mm^3 de sangue.

4.2.5 Métodos Gerais

Concomitantemente à contagem de reticulócitos, foram executadas técnicas complementares, a saber:

- Contagem Global de Eritrócitos¹⁹
- Determinação do Volume Hematócrito¹⁹
- Determinação da Concentração de Hemoglobina²⁰.

4.2.6 Métodos Estatísticos

Foram utilizados métodos estatísticos habituais para o cálculo da média e do desvio padrão¹⁰.

Para a análise estatística comparativa dos métodos de contagem de reticulócitos, empregou-se o "teste não paramétrico" de WILCOXON-WILCOX¹⁶. Este consiste em se atribuir a cada valor da contagem de reticulócitos (por mm³ de sangue) uma ordem de grandeza, dando-se a ordem 1 para o valor mais baixo e assim progressivamente para os valores diferentes. No caso de valores iguais, damos a ordem intermediária imediatamente superior à última empregada. Os valores assim obtidos, são colocados em uma sequência horizontal. A seguir são somadas as ordens em cada coluna (cada método) e calculam-se as diferenças entre as somas das ordens. Aplicando-se a fórmula

$$D = 4,47 \sqrt{n \times k(k+1)/12},$$

onde

D= a diferença máxima permitida;

n= número de casos totais (linhas);

k= número de métodos (colunas),

calculamos a diferença máxima permitida, acima da qual o resultado achado torna-se significativo.

Quando os resultados ultrapassam o valor tabelado, indicam existência de diferenças significativas entre os métodos.

QUADRO I

Idade, sexo, cor, contagem de Eritrócitos, concentração de Hemoglobina e determinação do Volume Hematócrito, dos elementos percentes ao Grupo Controle.

Nº	Nome	Idade (anos)	Sexo	Cor	Eritrócitos /mm ³ x 10 ⁵	Hemoglobina (g%)	Hematócrito (%)
101	FJFT	22	M	branca	5,0	14,7	43
102	NMV	21	F	amarela	4,7	13,0	41
103	AMV	21	M	branca	5,2	15,4	47
104	AJV	20	F	branca	4,7	13,0	41
105	AHS	22	F	branca	4,6	13,9	42
106	DRM	33	M	branca	5,1	14,2	43
107	RSSC	22	F	branca	4,6	13,9	42
108	LCP	36	M	branca	5,7	17,0	50
109	MBM	26	F	branca	4,3	13,0	40
110	AAMO	38	M	branca	5,6	16,2	50
111	FAA	28	M	branca	4,4	13,8	40
112	MRF	25	M	amarela	5,4	15,6	50
113	PIL	25	M	branca	5,2	15,0	48
114	JMFS	31	F	branca	4,5	13,0	41
115	NS	24	F	preta	4,8	13,8	44
116	RMBJ	20	M	branca	5,2	15,4	48
117	AFM	38	M	branca	5,0	14,6	45
118	MHH	24	M	amarela	5,3	16,2	49
119	OAS	36	M	branca	5,0	15,0	44
120	AMS	19	F	parda	4,4	12,2	39
121	YI	28	F	amarela	4,4	13,6	42
122	AAT	23	F	branca	4,7	14,5	42
123	MFB	24	F	branca	4,7	14,9	43
124	JRLN	21	M	branca	5,9	18,0	54
125	VLZ	23	F	branca	4,3	13,0	39
126	VOV	21	F	branca	4,7	13,8	42
127	LROR	25	M	branca	5,2	16,2	47

M= Masculino

F= Feminino

QUADRO II

Idade, sexo, cor, contagem de Eritrócitos, concentração de Hemoglobina e determinação do Volume Hematócrito, dos elementos pertencentes ao Grupo Patológico

Nº	Nome	Idade (anos)	Sexo	Cor	Eritrócitos /mm ³ x 10 ⁵	Hemoglobina (g%)	Hematócrito (%)
001	JCM	26	M	branca	5,0	15,7	46
002	CSP	25	F	branca	4,6	14,6	42
003	MTS	34	F	branca	4,9	15,2	44
004	JCS	49	F	parda	3,5	9,7	31
005	MAS	2	M	branca	2,7	7,0	21
006	RFN	21	M	parda	3,7	11,9	36
007	WCS	1,4	M	branca	3,8	7,6	30
008	PC	42	M	parda	6,2	19,0	58
009	EAK	80	F	branca	3,0	9,0	28
010	AGR	2,6	F	branca	4,4	12,4	39
011	JCB	27	M	branca	4,6	13,9	40
012	AM	50	F	branca	3,7	8,7	33
013	MSC	71	F	branca	4,1	11,2	35
014	AZ	57	F	branca	4,9	14,1	44
015	OB	44	M	parda	4,8	11,9	40
016	JM	32	F	branca	5,0	15,2	47
016'	JM	32	F	branca	4,5	13,0	42
017	MSC	23	M	branca	4,2	11,9	38
018	LC	28	F	branca	4,5	13,0	40
019	NR	24	M	branca	6,0	18,4	56
020	NAA	51	F	branca	3,4	7,6	30
021	OSF	42	F	preta	3,9	11,9	35
022	HF	14	M	preta	4,8	14,1	42
023	LB	59	M	branca	3,4	7,6	30
023'	LB	59	M	branca	3,6	7,6	30
024	MDAT	5	F	branca	4,5	11,1	37
025	RBO	25	M	parda	3,9	11,9	35

Continua

Continuação do Quadro II

Nº	Nome	Idade (anos)	Sexo	Cor	Eritrócitos /mm ³ x 10 ⁵	Hemoglobina (g%)	Hematócrito (%)
026	VLFF	34	F	parda	2,4	7,6	22
027	CS	18	F	branca	4,3	11,4	35
028	MRC	56	F	branca	3,0	6,5	22
029	AG	37	F	branca	3,0	9,2	28
030	SRC	7	F	branca	3,4	8,4	27
030	SRC	7	F	branca	2,5	7,0	20
031	AP	59	F	branca	4,6	14,1	43
032	FHF	58	M	branca	5,4	16,8	48
033	AHJ	53	M	branca	3,4	10,8	32
034	DJC	61	M	branca	4,1	12,5	37
035	BSL	45	F	branca	4,6	13,0	40
036	JM	60	M	branca	4,8	13,9	41
037	MGP	20	F	preta	4,5	11,9	40
038	AS	69	F	branca	3,0	7,6	27
039	EAS	44	F	parda	3,8	10,8	34
040	JBO	55	F	branca	3,0	7,6	26
041	BB	69	F	branca	4,0	11,3	37
042	RCS	15	F	preta	1,8	4,9	16

M = Masculino

F = Feminino

5. RESULTADOS

5.1 GRUPO CONTROLE: contagem de reticulócitos

Os resultados das contagens de reticulócitos no sangue pelos métodos do Azul de Cresil Brilhante e do "New Methylen Blue" original e modificado encontram-se na Tabela I.

5.2 GRUPO PATOLÓGICO: contagem de reticulócitos

Os resultados das contagens de reticulócitos no sangue pelos métodos do Azul de Cresil Brilhante e do "New Methylene Blue" original e modificado encontram-se na Tabela II.

5.3 GRUPO CONTROLE: Análise Estatística

A aplicação do "teste não paramétrico" de WILCOXON-WILCOX¹⁶ aos resultados obtidos no Grupo Controle, encontram-se nas Tabelas III e IV.

5.4 GRUPO PATOLÓGICO: Análise Estatística

A aplicação do "teste não paramétrico" de WILCOXON-WILCOX¹⁶ aos resultados obtidos para este grupo, encontram-se nas Tabelas V e VI.

5.5 GRUPO PATOLÓGICO

As contagens dos reticulócitos, por mm³ de sangue, dos componentes do Grupo Patológico, distribuídos segundo os resultados abaixo, dentro dos limites e acima da faixa de normalidade obtida para o método do NMB-modificado, encontram-se nas Tabelas VII, VIII e IX.

TABELA I

Contagens dos reticulócitos (expressos em % e por cm^3 de sangue), no grupo controle, empregando-se os corantes Azul de Cresil Brilhante e "New Methylen Blue" (métodos original e modificado), realizadas em extensões contra-coradas pelo corante de Leishman e em extensões sem coloração.

Nº	Azul do Cresil Brilhante		"New Methylen Blue" método original				"New Methylen Blue" método modificado			
	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas	Lâminas não contra-coradas
	%	/mm ³ *	%	/mm ³ *	%	/mm ³ *	%	/mm ³ *	%	/mm ³ *
101	0,2	10,0	1,6	80,0	1,8	90,0	1,5	75,0	1,6	80,0
102	0,4	18,8	1,5	70,5	1,5	70,5	1,3	61,1	1,1	51,7
103	0,1	5,2	0,6	31,2	1,4	72,8	0,9	46,8	1,0	5,2
104	0,0	0,0	0,7	32,9	1,0	47,0	1,0	47,0	0,8	37,6
105	0,2	9,2	0,9	41,4	0,5	23,0	0,9	41,4	1,0	46,0
106	0,2	10,2	0,7	35,7	1,4	71,4	0,8	40,8	1,2	61,2
107	0,4	18,4	1,0	46,0	1,3	59,8	1,1	50,6	1,4	64,4
108	0,0	0,0	0,5	28,5	1,4	79,8	0,6	45,6	1,3	74,1
109	0,0	0,0	0,7	30,1	1,3	55,9	1,2	51,6	1,2	51,6
110	0,5	28,0	1,4	78,4	1,2	67,2	1,1	61,6	1,7	95,2
111	0,1	4,4	0,6	26,4	1,3	57,2	1,5	66,0	1,2	52,8
112	0,0	0,0	0,7	37,8	2,2	118,8	1,2	64,8	1,7	91,8
113	0,2	10,4	0,6	31,2	0,6	31,2	0,8	41,6	1,5	78,0
114	0,4	18,0	0,9	40,5	0,8	36,0	1,0	45,0	1,2	54,0
115	0,2	9,6	0,6	28,0	0,8	36,4	1,3	62,4	1,3	62,4
116	0,8	41,6	1,1	57,2	1,8	93,6	1,3	67,6	2,1	109,2
117	0,0	0,0	0,6	30,0	1,3	65,0	0,9	45,0	1,2	60,0
118	0,9	26,5	0,8	42,4	1,3	68,9	1,0	53,0	1,0	53,0
119	0,2	10,0	1,2	60,0	1,1	55,0	1,3	65,0	0,8	40,0
120	0,2	8,8	1,6	70,4	0,5	22,0	1,5	66,0	0,9	39,6
121	0,1	4,4	1,5	66,0	1,4	61,6	1,5	66,0	1,6	70,4
122	0,0	0,0	0,5	23,5	0,0	0,0	1,3	61,1	0,0	0,0
123	0,0	0,0	1,0	47,0	0,0	0,0	1,6	75,2	0,2	9,4
124	0,0	0,0	0,9	53,1	0,3	17,7	1,1	64,9	0,2	11,8
125	0,0	0,0	0,5	21,5	0,1	4,3	1,0	43,0	0,2	8,6
126	0,0	0,0	0,9	42,3	0,1	4,7	1,2	56,4	0,2	9,4
127	0,0	0,0	0,4	20,8	0,1	5,2	1,0	52,0	0,1	5,2
	A		B		C		D		E	
$\bar{X}$	0,2	8,6	0,9	43,4	1,0	48,8	1,1	56,1	1,0	50,7
S	0,2	10,6	0,4	17,7	0,6	31,7	0,2	10,6	0,6	29,0
S X	0,04	2,0	0,1	3,4	0,1	6,1	0,1	2,0	0,1	5,6

$\bar{X}$ = Média

S = Desvio padrão

S X = Desvio padrão da média

A, B, C, D, E e F = Colunas correspondentes às contagens de reticulócitos por cm^3 de sangue, para os respectivos métodos

* = $\times 10^3$

TABELA 11

Contagens dos reticulócitos (expressas em % e por mm^3 de sangue), no grupo patológico, empregando-se as corantes Azul de Cresil Brilhante e "New Methylen Blue" (método original e modificado), realizadas em extensões contra-coradas pelo corante de Leishman e em extensões sem coloração.

Nº	Azul de Cresil Brilhante				" New Methylen Blue " método original				" New Methylen Blue " método modificado			
	Lâminas não contra-coradas		Lâminas contra-coradas		Lâminas não contra-coradas		Lâminas contra-coradas		Lâminas não contra-coradas		Lâminas contra-coradas	
	%	/mm ³	%	/cm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/cm ³
001	0,5	25,0	0,8	40,0	1,6	80,0	1,9	95,0	1,7	85,0	1,5	75,0
002	0,0	0,0	0,3	13,8	1,1	50,6	1,2	55,2	0,7	32,2	0,7	32,2
003	0,2	9,8	0,6	29,4	1,0	49,0	1,0	49,0	1,7	83,3	0,9	44,1
004	0,0	0,0	1,0	35,0	1,4	49,0	1,1	38,5	1,1	38,5	1,1	38,5
005	0,0	0,0	0,1	2,7	0,5	13,5	0,4	10,8	0,4	10,8	0,2	5,4
006	0,1	3,7	0,2	7,4	0,2	7,4	0,1	3,7	0,0	0,0	0,1	3,7
007	0,2	7,6	0,9	34,2	5,4	205,2	4,7	178,6	4,8	182,4	4,5	171,0
008	0,2	12,4	0,3	18,6	0,5	51,0	0,9	55,8	0,7	43,3	0,7	43,3
009	0,2	6,0	0,8	24,0	0,0	0,0	1,7	51,0	0,0	0,0	1,6	48,0
010	0,0	0,0	0,4	17,6	0,0	0,0	0,3	13,2	0,0	0,0	0,3	13,2
011	0,0	0,0	0,9	33,3	0,0	0,0	1,3	48,1	0,0	0,0	1,6	59,2
012	0,0	0,0	0,7	28,7	0,0	0,0	0,9	36,9	0,0	0,0	1,4	57,4
013	0,0	0,0	1,6	78,4	1,2	58,8	1,4	68,6	1,2	58,8	1,3	63,7
014	0,0	0,0	0,9	43,2	0,6	28,8	0,7	33,6	0,6	28,8	0,8	38,4
015	0,0	0,0	0,3	15,0	0,2	10,0	0,4	20,0	0,3	15,0	0,2	10,0
015'	0,6	27,0	2,6	117,0	4,5	202,5	3,9	175,5	5,0	225,0	5,1	229,5
016	0,0	0,0	3,3	138,6	0,0	0,0	3,5	147,0	0,0	0,0	5,0	210,0
017	0,0	0,0	0,2	9,0	0,0	0,0	0,5	22,5	0,0	0,0	0,4	18,0
018	0,0	0,0	0,4	24,0	0,7	42,0	0,7	42,0	0,3	18,0	0,5	30,0
019	0,0	0,0	0,2	68,0	0,0	0,0	1,1	37,4	0,0	0,0	1,2	40,8
020	0,1	3,9	0,2	7,8	0,2	7,8	0,4	15,6	0,1	3,9	0,4	15,6
021	0,0	0,0	0,6	28,8	0,0	0,0	1,1	52,8	0,0	0,0	1,0	4,8
022	0,1	3,4	0,3	10,2	0,4	13,6	1,0	34,0	0,3	10,2	1,1	37,4
022'	0,0	0,0	1,3	46,8	2,2	79,2	2,7	97,2	2,5	90,0	1,8	64,8
023	0,0	0,0	1,0	45,0	1,4	63,0	1,4	63,0	0,6	27,0	1,6	72,0
024	0,0	0,0	2,2	85,8	8,8	343,2	8,8	343,0	10,0	390,0	11,0	429,0
025	0,1	2,4	13,0	312,0	10,0	240,0	14,0	336,0	6,0	144,0	6,8	163,2
026	0,0	0,0	1,0	43,0	0,7	30,1	0,9	38,7	0,6	25,8	0,5	21,5
027	0,1	3,0	1,0	30,0	0,9	27,0	2,0	60,0	0,8	24,0	1,7	51,0
028	1,1	33,0	2,5	75,0	4,1	123,0	3,6	108,0	3,5	105,0	3,3	114,0
029	0,4	13,6	2,1	71,4	4,0	136,0	3,6	122,4	3,2	108,8	3,5	119,0
029'	3,0	75,0	3,3	82,5	3,9	97,5	3,5	87,5	3,8	95,0	4,1	102,5
030	0,8	36,8	0,6	27,6	2,5	115,0	2,9	133,4	2,0	92,0	2,7	124,2
031	0,5	27,0	0,9	48,6	2,0	108,0	1,8	97,2	1,8	97,2	1,3	70,2
032	0,4	13,6	2,2	74,8	3,3	112,2	4,0	136,0	3,1	105,4	3,8	129,2
033	0,3	12,3	1,2	49,2	1,6	65,6	1,3	53,3	1,8	73,8	1,7	69,7
034	0,0	0,0	0,5	23,0	0,5	23,0	1,1	50,6	0,5	23,0	0,9	41,4
035	0,0	0,0	0,9	43,2	1,3	62,4	1,2	57,6	1,2	57,6	1,5	72,0
036	0,0	0,0	0,6	27,0	0,2	9,0	0,9	40,5	0,1	45,0	1,1	49,5
037	0,0	0,0	3,5	105,0	3,0	90,0	3,6	108,0	3,4	102,0	3,4	102,0
038	0,1	3,8	1,2	45,6	1,6	60,8	1,4	53,2	1,4	53,2	1,0	38,0
039	0,0	0,0	1,1	33,0	1,7	51,0	2,7	81,0	1,4	42,0	3,0	90,0
040	0,0	0,0	1,7	68,0	2,0	80,0	2,3	92,0	2,5	100,0	2,8	112,0
041	1,0	18,0	3,5	63,0	20,0	360,0	22,0	396,0	20,0	360,0	25,0	450,0

* = $\times 10^3$ G

H

I

K

L

M

G, H, I, K, L e M = Colunas correspondentes às contagens de reticulócitos por mm^3 de sangue, para os respectivos métodos.

TABELA III. Valores obtidos pela aplicação do "teste não paramétrico" de Wilcoxon-Wilcox, aos resultados das contagens de reticulócitos (expressas por mm^3 de sangue) no Grupo Controle.

	A	B	C	D	E	F
101	1	3,5	5	2	3,5	6
102	1	4,5	4,5	3	2	6
103	1	2	6	3	4,5	4,5
104	1	2	4,5	4,5	3	6
105	1	3,5	2	3,5	5	6
106	1	2	6	3	5	4
107	1	2	5	3,5	6	3,5
108	1	2	6	3	5	4
109	1	2	6	4,5	4,5	3
110	1	4,5	3	2	6	4,5
111	1	2	4	6	3	5
112	1	2	3,5	3	4	6
113	1	2,5	2,5	5	6	4
114	1	4	3,5	5	6	2,5
115	1	2	3,5	5,5	5,5	3,5
116	1	2	5	3	6	4
117	1	2	5	3	4	6
118	1	2	5	3,5	3,5	6
119	1	5	4	6	2	3
120	1	6	2	5	3	4
121	1	3,5	2	3,5	5	6
122	1	4	2	6	2	5
123	1,5	4	1,5	6	3	5
124	1	5	3	6	2	4
125	1	4	2	5	3	6
126	1	4	2	6	3	5
127	1	2,5	4	5	2,5	6
	28,5	84,5	103	114,5	108,0	128,5

A,B,C,D,E e F, correspondem às colunas encontradas na TABELA I.

TABELA IV

Valores obtidos após o cálculo das diferenças no Grupo Controle, entre as somas das ordens de cada método

		B	C	E	D	F
		84,5	103,0	108,0	114,5	128,5
A	28,5	56,0*	74,5*	79,5*	86,0*	100,0*
B	84,5		18,5	23,5	30,0	44,0*
C	103,0			5,0	11,5	25,5
E	108,0				6,5	20,5
D	114,5					14,0

A,B,C,D,E e F correspondem às colunas dos valores da contagem de reticulócitos (expressos por mm³ de sangue) em lâminas contra-coradas pelo corante de Leishman.

* = Valores obtidos, superiores à diferença máxima permitida (43,4).

TABELA V

Valores obtidos pela aplicação do "teste não paramétrico" de WILCOXON-WILCOX¹⁶, aos resultados das contagens de reticulócitos (expressas por mm³ de sangue) no Grupo Patológico.

	G	H	I	K	L	M
001	1	2	4	6	5	3
002	1	2	5	6	3,5	3,5
003	1	2	4,5	4,5	6	3
004	1	2	6	4	4	4
005	1	2	6	4,5	4,5	3
006	3	5,5	5,5	3	1	3
007	1	2	6	4	5	3
008	1	2	3	6	4,5	4,5
009	3	4	1,5	6	1,5	5
010	2	6	2	4,5	2	4,5
011	2	4	2	5	2	6
012	2	4	2	5	2	6
013	1	6	2,5	5	2,5	4
014	1	6	2,5	4	2,5	5
015A	1	4,5	2,5	6	4,5	2,5
015B	1	2	4	3	5	6
016	2	4	2	5	2	6
017	2	4	2	6	2	5
018	1	3	5,5	5,5	2	4
019	2	6	2	4	2	5
020	1,5	3,5	3,5	5,5	1,5	5,5
021	2	5	2	6	2	4
022A	1	2,5	4	5	2,5	6
022B	1	2	4	6	5	3
023	1	3	4,5	4,5	2	6
024	1	2	3,5	3,5	5	6

Continua

Continuação da Tabela V

	G	H	I	K	L	M
025	1	5	4	6	2	3
026	1	6	4	5	3	2
027	1	4	3	6	2	5
028	1	2	6	4	3	5
029A	1	2	6	5	3	4
029B	1	2	5	3	4	6
030	2	1	4	6	3	5
031	1	2	6	4,5	4,5	3
032	1	2	4	6	3	5
033	1	2	4	3	6	5
034	1	3	3	6	3	5
035	1	2	5	3,5	3,5	6
036	1	3	2	4	5	6
037	1	6	2	5	3,5	3,5
038	1	3	6	4,5	4,5	2
039	1	2	4	5	3	6
040	1	2	3	4	5	6
041	1	2	3,5	5	3,5	6
	56,5	142	166,5	213	146	200

G,H,I,K,L e M, correspondem às colunas encontradas na
Tabela II

TABELA VI

Valores obtidos após o cálculo das diferenças no Grupo Patológico, entre as somas das ordens de cada método

	H	L	I	M	K
	142,0	146,0	166,5	200,0	213,0
G 56,5	85,5*	89,5*	110,0*	143,5*	156,5*
H 142,0		4,0	24,5	58,0*	71,0*
L 146,0			20,5	54,0	67,0*
I 166,5				33,5	46,5
M 200,5					13,0

G,H,I,K,L e M correspondem às colunas dos valores da contagem de reticulócitos (expressos por mm³ de sangue) em lâminas contra-coradas pelo corante de Leishman.

*= Valores superiores à diferença máxima permitida(55,5)

TABELA VII

Grupo Patológico - Valores das contagens de reticulócitos por mm^3 de sangue, situados abaixo da faixa de normalidade, para o método do NMB - modificado, em lâminas contra-coradas.

Método Pacientes	NMB - modificado	NMB - original	Azul de Cresil Brilhante
	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$
002	32,2	55,2	13,8
003	44,1	49,0	29,4
004	38,5	38,5	35,0
005	5,4	10,8	2,7
006	3,7	3,7	7,4
008	43,3	55,8	18,6
009	48,0	51,0	24,0
010	13,2	13,2	17,6
014	38,4	33,6	43,2
015A	10,0	20,0	15,0
017	18,0	22,5	9,0
018	30,0	42,0	24,0
019	40,8	37,4	68,0
020	15,6	15,6	7,8
021	4,8	52,8	28,8
022A	37,4	34,0	10,2
026	21,5	38,7	43,0
027	51,0	60,0	30,0
034	41,4	50,6	23,0
036	49,5	40,5	27,0
038	38,0	53,2	45,6
$\bar{X}$	29,7	37,0	24,9
S	15,9	16,7	15,8

$\bar{X}$ = Média

S = Desvio padrão

TABELA VIII

Grupo Patológico - Valores das contagens de reticulócitos por mm^3 de sangue, situados dentro dos limites da faixa de normalidade para o método de NMB - modificado, em lâminas contra-coradas

Método	NMB - modificado	NMB - original	Azul de Cresil Brilhante
Pacientes	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$
011	52,9	48,1	33,3
012	57,4	26,9	28,7
013	63,7	68,6	78,4
$\bar{X}$	58,0	51,2	46,8
S	1,8	9,2	15,8

$\bar{X}$ = Média

S = Desvio padrão

TABELA IX

Grupo Patológico - Valores das contagens de reticulócitos por mm^3 de sangue, situados acima da faixa de normalidade, para o método do NMB - modificado, em lâminas contra-coradas.

Método	NMB - modificado	NMB - original	Azul de Cresil Brilhante
Pacientes	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$	Reticulócitos $\times 10^3$
001	75,0	95,0	40,0
007	171,0	178,6	34,2
015B	229,5	175,5	117,0
016	210,0	147,0	138,6
022B	64,8	97,2	46,8
023	72,0	63,0	45,0
024	429,0	343,0	85,8
025	163,2	336,0	312,0
028	114,0	108,0	75,0
029A	119,0	122,4	71,4
029B	102,5	87,5	82,5
030	124,2	133,4	27,6
031	70,2	97,2	48,6
032	129,2	136,0	74,8
033	69,7	53,3	49,2
035	72,0	57,6	43,2
037	102,0	108,0	105,0
039	90,0	81,0	33,0
040	112,0	92,0	68,0
041	450,0	396,0	63,0
$\bar{X}$	148,4	145,3	78,0
S	24,5	22,0	13,9

$\bar{X}$ = Média

S = Desvio padrão

6. DISCUSSÃO

A determinação do número de reticulócitos é de grande valia para o estudo das hemopatias, especialmente das anemias, não sendo importante diferenciá-los quanto a cada um de seus tipos.

Os corantes empregados na coloração do reticulócito são ditos "vitais", entendendo-se por corante vital quando o mesmo cora estrutura intra-celulares enquanto a célula permanece viva. Podemos dizer que este termo se refere tanto às colorações feitas "in vivo", quanto às feitas "in vitro", sendo esta última em células ou tecidos vivos, removidos do organismo. Deve-se diferenciar bem o significado de "coloração vital" de "coloração de células mortas", isto é, coloração de células prévia e irreversivelmente fixadas ⁵. O corante somente é considerado vital quando atua em quantidades muito pequenas ⁵. Quando os ribossomos são precipitados pelo corante, estes não são chamados vitais, sendo proposta por BESSIS ⁴ a denominação "coloração post-vital". O corante vital, portanto, deve evidenciar as estruturas ditas vitais, sem interferir com a viabilidade

da célula, pelo menos por uma hora. Algumas colorações vitais permitem sobrevida muito maior das células do que outras, existindo mesmo as que permitem uma sobrevida indefinida ⁵.

Ao estudarmos o comportamento do "New Methylen Blue", tivemos como um dos objetivos, obter um método em que fosse possível realizar em uma única etapa, a coloração dos reticulócitos; isto é: a coloração vital e contra-coloração (coloração por corante panótico). Foram efetuadas várias experiências tentando-se diversos procedimentos.

BRECHER⁶ preconiza solução aquosa do NMB para coloração de reticulócitos. Tentamos o emprego de soluções metanólicas em diversas concentrações, pois poder-se-ia tentar, em caso positivo, uma mistura do NMB com o corante de Leishman, cuja solução é habitualmente metanólica. Os eritrócitos foram encontrados profundamente deformados. Embora os reticulócitos tivessem sido visualizados, o mesmo não foi alcançado com a mistura dos dois corantes. Isto se deve ao fato da coloração pelo corante de Leishman, exigir a fixação prévia, o que torna inviável a estrutura vital.

O emprego de soluções aquosas do NMB a 0,5%, com contra-colorações por soluções metanólicas e

etanólicas de eritrosina e de eosina, em diferentes concentrações, não permite a visualização dos retículos, admitindo-se que os mesmos tivessem sido mascarados pela eritrosina e pela eosina.

Quando a mesma solução aquosa do corante (NMB a 0,5%) era colocada sobre lâminas com extensões não fixadas, os retículos não eram corados, pois provavelmente não havia o necessário contacto íntimo entre a célula e o corante vital. Nas extensões fixadas pelo metanol e pelo etanol e nas lâminas em que se tentou uma fixação parcial, empregando-se diferentes concentrações dos fixadores, as estruturas não se coraram pois se tornaram inviáveis.

Nas preparações "a fresco" foi possível a visualização dos reticulócitos porque houve efetivo contacto entre o corante e a célula não fixada, pois ambos permaneciam sob lamínula lutada, por períodos de tempo superiores aos 10 minutos empregados na técnica de BRECHER⁶. Uma única exceção foi a da solução do NMB na concentração mais baixa (0,1%) e com o menor tempo de contacto empregado nesta série de experimentos (15 minutos).

A utilização de soluções salinas do NMB, para contagem em câmara, não trouxe resultados posi-

tivos, embora fossem empregadas diluições e diferentes tempos de contacto em "câmara úmida". Isto ocorreu pela impossibilidade de visualização do retículo, utilizando-se objetiva de 40x, rotineiramente adotada.

A modificação por nós introduzida na técnica de BRECHER⁶, teve como objetivo uma simplificação da mesma, de modo a torná-la mais rápida e menos trabalhosa na execução do exame. Esta modificação facilita o manuseio do material, ao mesmo tempo que permite maior contacto entre as células sanguíneas e a solução do co-rante vital. Constitui em substituir-se o capilar, utilizado na técnica⁶, por um tubo de vidro (conforme descrito em 3.5). Desta maneira, a retirada da mistura de dentro do tubo, tornou-se mais fácil. Eliminou-se a necessidade de se executar uma segunda homogeneização da mistura na lâmina, substituída por uma leve agitação do tubo.

Nas experiências preliminares, em que foi testada esta modificação, obtivemos condições ideais para a visualização e para a contagem dos reticulócitos. Isto ocorreu tanto nas preparações em lâminas contra-coradas, como naquelas sem contra-coloração.

A seleção dos elementos do grupo controle obedeceu ao critério estabelecido "a priori" para este trabalho, acrescida pela determinação dos valores hemau

timétricos. Nos elementos do sexo feminino, o sangue foi colhido na segunda metade do ciclo menstrual, para evitar-se a possibilidade de encontro de maior número de reticulócitos, reacional à perda sanguínea menstrual. Os resultados da contagem de reticulócitos por mm^3 de sangue do grupo controle, foram considerados, para o método do NMB-modificado, como referência para comparações com os do grupo patológico.

Na análise estatística, consideramos apenas os resultados expressos em "por mm^3 de sangue", que no nosso entender são biologicamente os mais significativos. A escolha do "teste não paramétrico" de WILCOXON-WILCOX¹⁶, se deveu às grandes diferenças encontradas entre os valores das contagens de reticulócitos, para os indivíduos do grupo patológico, o que deixava prever uma considerável variação dos métodos entre si. Isto iria acarretar erros consideráveis para as variâncias. O "teste não paramétrico" foi usado para verificar se as diferenças nas distribuições das ordens, variavam significativamente entre os métodos. As somas das ordens de cada método foram comparadas para estimar diferenças significativas entre as mesmas. Caso não existissem diferenças significativas, as somas seriam iguais ou próximas para as duas colunas. Os valores tabelados¹⁶ oferecerão os

limites máximos permitidos, para considerar eventuais diferenças como ao acaso e portanto não significativas.

A análise da tabela IV, referente ao grupo controle, revela que o método que emprega o Azul de Cresil Brilhante como corante, nas lâminas sem contra-coloração, é significativamente diferente dos demais, visto que apresentam valores que ultrapassam a diferença máxima permitida, segundo o "Teste não paramétrico". Quando se compara o método que emprega o Azul de Cresil Brilhante, em lâminas contra-coradas, a diferença significativa somente se manifesta em relação ao método do NMB-modificado, em lâminas contra-coradas.

Prosseguindo a análise estatística, a tabela VI, referente ao grupo patológico, nos indica que há diferença significativa entre o método do Azul de Cresil Brilhante, em lâminas sem contra-coloração e os demais. O Azul de Cresil Brilhante, em lâminas contra-coradas, apresenta resultados significativamente diferentes dos métodos do NMB-original e do NMB-modificado, ambos também em lâminas contra-coradas. Os métodos do NMB-original, em lâminas contra-coradas e NMB-modificado, em lâminas sem contra-coloração, apresentam diferença significativa.

Do exposto, conclui-se que o "teste não paramétrico" demonstra que as colorações onde se emprega o corante NMB, são superiores aos que empregam o Azul de Cresil Brilhante como corante vital. A conclusão alcançada neste trabalho confirma a observação de outros autores ^{6,7,21}. A análise estatística revelou, ainda, que em lâminas onde se efetuou contra-coloração pelo corante de Leishman, ofereceram melhores resultados do que as não contra-coradas.

Os métodos do NMB-original e do NMB-modificado, em lâminas submetidas à contra-coloração, não apresentaram diferenças significativas, embora este último tenha contribuído para facilitar a execução do exame, sem que haja prejuízo na qualidade dos resultados.

Com a finalidade de verificar se o comportamento da contagem de reticulócitos, mostrava diferenças para contagens abaixo, acima e dentro da faixa de normalidade, considerada esta para o método do NMB-modificado, o grupo patológico foi dividido em três sub-grupos, segundo este critério. Nos três grupos, a média dos valores referentes ao método do Azul de Cresil Brilhante, é inferior à dos outros dois métodos. Para o método do NMB-original, em média, os valores são ligeiramente superiores aos do método do NMB-modificado, no grupo com va-

lores abaixo da normalidade. Nos outros dois grupos, o método do NMB-modificado, apresenta em média, valores superiores aos do método do NMB-original. Podemos concluir que, para valores de reticulócitos abaixo do limite máximo de normalidade, os métodos do NMB-original e modificado, apresentam idêntico comportamento; em relação ao método do Azul de Cresil Brilhante, apresentam comportamento superior. O mesmo se conclui e com maior evidência para as contagens de reticulócitos situados acima do limite máximo de normalidade.

A avaliação qualitativa do aspecto visual dos reticulócitos, demonstra uma melhor e mais fácil identificação dos mesmos, quando se emprega o NMB com contra-coloração (fotomicrografias números 5, 6, 9 e 10), do que quando do emprego do NMB sem contra-coloração (fotomicrografias números 7, 8, 11 e 12) ou o Azul de Cresil Brilhante, com contra-coloração (fotomicrografias números 13 e 14).

Em lâminas onde se empregou o Azul de Cresil Brilhante como corante vital, porém sem contra-coloração, embora fossem visualizados os reticulócitos ao microscópio, com bastante dificuldade, não obtivemos, mesmo que precariamente, uma imagem que possibilitasse um registro fotomicrográfico.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 As contagens realizadas pelos métodos que empregam o NMB como corante, apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas com as que empregam o Azul de Cresil Brilhante.
- 7.2 A análise estatística demonstrou que a contagem de reticulócitos corados pelo NMB e realizada em preparações contra-coradas pelo corante de Leishman, apresentou resultados significativamente melhores do que a realizada em preparações sem contra-coloração.
- 7.3 As contagens realizadas pelo método do NMB, segundo a técnica original, quando comparadas com as realizadas pelo método empregando a modificação proposta, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.
- 7.4 A modificação proposta no método de contagem de reticulócitos, empregando o corante NMB, contribuiu para facilitar a execução do exame.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALMEIDA, T.V. - Estudo dos elementos figurados do sangue. In: MOURA, R.A.A., coord. Técnicas de laboratório. Rio de Janeiro, Atheneu, 1977. p. 474-5.
 2. BESSIS, M. - Cellules du sang normal et pathologique. Paris, Masson, 1972. p. 72-3.
 3. ——— - ———. Paris, Masson, 1972. p.266-70.
 4. BESSIS, M. - Living blood cells and their ultrastuture. Berlin, Springer-Verlag, 1973. p. 128.
 5. ——— - ———. Berlin, Springer-Verlag, 1973. p. 681.
 6. BRECHER, G. - New Methylen blue as a reticulocyte stain. Amer. J. clin. Path., Baltimore, 19:895-6, 1949.
 7. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. - Hematologia practica. 2 ed. Barcelona, Toray, 1973. p. 11.
 8. ——— - ———. 2 ed. Barcelona, Toray, 1973. p. 28-9.
 9. DEISS, A. & KURT, D. - Circulating reticulocytes in normal adults as determined by the new methylen blue method. Amer. J. clin. Path., Baltimore, 53: 481-2, 1970.
 10. GRANER, E.A. - Como aprender estatística. São Paulo, Melhoramentos, 1952. p. 35-91.
-

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com o World Medical Periodicals, 3.ed., New York, 1961.

11. LEAVELL, B.S. & THORUP, C.A. Fundamentals of clinical hematology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1960. p. 447-8.
12. MIALE, J.B. Laboratory medicine: hematology. 2. ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1962. p. 808-9.
13. PLATT, W.R. Atlas de hematologia en color. Barcelona, Editorial Jims, 1972. p. 175-7.
14. VARELA, M.H. Fundamentos de hematologia. 9. ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1965. p. 110-1.
15. ———— - ————. 9. ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1965. p. 426-7.
16. WICOXON, F. & WILCOX, R.A. Some approximate statistical procedures. New York, Lederle Laboratories, 1966. p. 11-2.
17. WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R. W. Hematologia. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1976. p. 58.
18. ———— - ————. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1976. p. 1104-5.
19. WINTROBE, M.M.; LEE, G.R.; BOGGS, D.R.; BITHELL, T.C.; ATHENS, J.W.; FOERSTER, J. Clinical hematology. 7. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974. p. 12-23.
20. ———— - ————. 7. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974. p. 113-15.
21. ———— - ————. 7. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1974, p. 119.

9. APÊNDICE

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 1
Reticulócito pseudonucleado

Método do NMB-modificado; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 2
Retículo completo

Método do NMB-original; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 3
Reticulo parcial ou incompleto

Método do NMB-modificado; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 4
Ponteado granuloso

Método do NMB-original; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 5

Método do NMB-modificado; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 6

Método do NMB-modificado; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 7

Método do NMB-modificado; sem contra-coloração (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 8

Método do NMB-modificado; sem contra-coloração (1000x)

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 9

Método do NMB-original; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 10

Método do NMB-original; contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 11

Método do NMB-original; sem contra-coloração (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 12

Método do NMB-original; sem contra-coloração (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 13

Método do Azul de Cresil Brilhante; com contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).

FOTOMICROGRAFIA NÚMERO 14

Método do Azul de Cresil Brilhante; com contra-coloração pelo corante de Leishman (1000x).