

Aplicação da Laranja de Acridina. Método Auxiliar Comparativo em Estudos de Fluorescência

M. R. Q. KASTNER

*Doutor em Ciências da Saúde
Pesquisador do Ministério da Saúde – INCa
Bolsista Pesquisador do CNPq*

A. M. S. SCHETTINO

*Médica do Setor de Pesquisa Aplicada – INCa
Ex-Residente do INCa*

RESUMO

Foi realizado um estudo por microscopia de fluorescência de biópsias de pacientes portadores de neoplasia maligna de mama, utilizando-se como técnica de coloração o método da laranja de acridina em cortes criostáticos.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que as células malignas são identificadas facilmente e de modo rápido e portanto, este método pode ser de grande utilidade para o especialista experiente em morfologia celular.

Por outro lado, o estudo da coloração e da fluorescência da estrutura celular pode dar melhor indicação das modificações sofridas pelos ácidos nucleicos nas células tumorais.

Conclui-se, que este método é muito importante para caracterizar a percentagem de células cancerosas que podem também apresentar fluorescência devido à presença de marcadores biológicos específicos do câncer.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico das neoplasias malignas se faz com os métodos habituais da técnica histológica. O patologista experimentado, possui um conhecimento da patologia da célula cancerosa que, mesmo sem o uso de colorações especiais, poderá detectar sinais evidentes de atipias celulares que o levarão a um diagnóstico seguro. O importante, pois, não é o método empregado, mas sim os conhecimentos de patologia celular por parte de quem executa esses exames.

Entretanto, a necessidade de estabelecer uma técnica especial que permita uma melhor diferenciação entre células benignas e malignas, já foi sentida pela maioria dos patologistas. Principalmente nos casos mais difíceis e naqueles

Trabalho realizado no Setor de Pesquisa Aplicada, Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Câncer – R.J. – MS.

em que interessa confirmar, qualitativa e quantitativamente a presença ou ausência de determinados elementos que poderão ter um valor significativo, se presentes nas células tumorais.

Nesse sentido, e levando-se em conta que os tumores malignos apresentam índices rápidos de proliferação celular, surgiram novas técnicas, algumas delas baseadas na determinação dos ácidos nucleicos.

A microscopia de fluorescência com a laranja de acridina (AO), constitui um desses métodos usados na determinação cito e histoquímica dos ácidos nucleicos. Este fluorocromo, devido a sua propriedade metacromática, quando aplicado entre determinados limites de pH, demonstra qualitativa e quantitativamente o ácido ribonucleico (RNA). Assim, após coloração pela AO, as células que contêm grande quantidade de RNA apresentam pela fluorescência um citoplasma alaranjado-brilhante ou vermelho-flamejante; quando contêm pouco RNA é pardo-alaranjado e, finalmente, quando privadas de RNA o citoplasma aparece pardo-amarelado. Por outro lado, os núcleos, quando em elevada atividade funcional, apresentam-se, pelo seu maior conteúdo em DNA, amarelos ou ligeiramente esverdeados, e, nos momentos de menor atividade, tendem para o esverdeado.

Neste trabalho, apresentamos a aplicação da microscopia de fluorescência pela AO em tecido tumoral de mama; estudamos a especificidade histoquímica deste fluorocromo e a sua utilidade na identificação de células neoplásicas, quando da determinação dos receptores de estrogênio e progesterona (ER e PgR) em corte criostáticos. O estudo da pre-

sença destes receptores assim como o exame histopatológico das biópsias, já foi descrito em trabalho anterior.³

MATERIAL E MÉTODOS

De biópsias de tecido mamário de pacientes com câncer de mama, foram feitos cortes criostáticos de 5 a 6 μ , aos quais aplicamos as seguintes técnicas:

a) Coloração pela hematoxilina-eosina (HE) para diagnóstico histopatológico;

b) Coloração com AO para estudo da fluorescência das células tumorais;

c) Tratamento com estradiol e progesterona marcados com fluorocromos para o estudo dos receptores hormonais.

Para a coloração com AO, a técnica utilizada obedeceu ao seguinte esquema:

1. Fixar em álcool-éter (2:1) durante 10 minutos.

2. Passar em água destilada.

3. Imersão rápida em ácido acético a 1%.

4. Passar em água destilada.

5. Corar com a solução de AO (0.01% em pH 6) durante 3 minutos.

6. Diferenciar em CaCl_2 (1/10 M) durante meio minuto.

7. Lavar e montar a lâmina em tampão pH 6.

Para a leitura, utilizou-se microscópio de fluorescência por epi-iluminação, equipado com lâmpada de mercúrio e filtros de excitação e barreira para AO. O exame foi realizado, de forma criteriosa independentemente pelos autores, analisando a morfologia celular e nuclear, a relação núcleo-citoplasma, a presença de nucléolos e a intensidade e variedade de coloração e fluorescência.

As preparações obtidas por essa técnica só se conservam

intactas por cerca de meia a uma hora; no entanto, podem ser mantidas em tampão por período longo. Além disso, desmontadas e descoradas em álcool a 50%, podem ser novamente coradas pela AO ou pelos métodos convencionais (HE), com resultados satisfatórios. Uma documentação fotográfica de um mesmo campo, corado primeiro pela AO e depois pela HE, permite ter um mesmo detalhe citológico ou histológico documentado pelas duas técnicas.

RESULTADOS

Nos fragmentos de mama examinados observamos áreas normais com alterações benignas e malignas. Os achados foram:

Ductos e lóbulos normais

Os casos por nós examinados, exibiam poucas áreas benignas normais, porém nestas o revestimento epitelial, por estar constituído de células bem preservadas, com características morfológicas uniformes, mostravam citoplasma pardo-amarelado, pouco brilhante e núcleos esverdeados.

Áreas com alterações benignas

Os ductos com epitélio hiperplásico, apresentavam um citoplasma ligeiramente alaranjado e os núcleos amarelo-esverdeados.

Quando se notava uma área de transição, de epitélio hiperplásico para maligno, a fluorescência acompanhava nitidamente esta transformação.

Áreas malignas

Nestas áreas, ocorreram alterações na intensidade de coloração e na fluorescência, ge-

ralmente associadas às alterações citológicas, sendo que quanto maiores e mais bizarras as formas, maior intensidade de coloração de fluorescência. Assim, as células malignas exibiam um citoplasma variando do laranja-intenso ao vermelho-flamejante. Os núcleos, amarelados, na grande maioria das vezes exibiam um ou mais nucléolos volumosos, de formas bizarras e vermelho-flamejantes (Fig. 1 e 2).

DISCUSSÃO

As células dos tumores malignos apresentam caracteres biológicos intrínsecos, tanto morfológicos como funcionais, e mesmo físico-químicos. Este conjunto de variações ou alterações essenciais, tem uma importância muito grande para o diagnóstico histopatológico.

Uma vez que não há uma característica que seja patognomônica de células neoplásicas malignas, o diagnóstico morfológico só pode ser estabelecido com base em um conjunto de alterações encontradas muito raramente, ou excepcionalmente, nos outros processos patológicos. Assim, certas reações tintoriais, desenvolvidas no decorrer de pesquisas cito e histoquímicas, apresentam-se como novos elementos úteis para o reconhecimento das células neoplásicas.

Entre estas, encontra-se o fluorocromo laranja de acridina, cuja importância fundamental está na propriedade de servir como corante de grande especificidade para os ácidos nucleicos, quando se trabalha dentro de certos limites de pH.

A AO, usada em concentrações baixas (0.01 a 0.05%), com pH aproximadamente de 3 a 8, e em equilíbrio iônico constante, permite a identificação simultânea do RNA e

do DNA. Utilizando soluções ácidas, o DNA nuclear fluoresce em verde-amarelado, e o citoplasma das células com grande quantidade de RNA apresenta uma cor pardo-amarelada. Com soluções mais alcalinas, o DNA fluoresce em verde e o RNA em vermelho-flamejante. Uma vez que a fluorescência nuclear não varia muito, e que a citoplasmática é mais sensível, a diferenciação ótima, o que se consegue utilizando um pH entre 5 e 6.

Segundo Schummenfeld,^{5,6} a diferença de comportamento do DNA e RNA se deve à diferente polimerização dos ácidos nucleicos. O DNA nuclear, por ser um polímero de cadeia longa, fluoresce em verde ortocromático, e o RNA citoplasmático e nucleolar, por ter uma menor polimerização, fica mais a AO e dá cores metacromáticas-avermelhadas. Isto explicaria porque as células com pouco RNA, aparecem pardo-avermelhadas, e as com RNA abundante fluorescem em vermelho-flamejante.

Entretanto, novos conhecimentos sobre os ácidos nucleicos, e sobre a síntese das nucleoproteínas, evidenciaram a presença de um marcante aumento de DNA, e uma estrutura específica da cromatina nas células neoplásicas, permitindo assim uma melhor caracterização destas células malignas. Assim, este aumento de fluorescência nuclear poderá representar um aumento real do DNA¹ ou ser devido, a ser o DNA das células tumorais mais sensível a AO, que o das células normais.²

Mais recentemente, foram desenvolvidos novos métodos citofluorométricos, que permitem uma determinação quantitativa do DNA. Olszewski e col,⁴ analisam por este método físico-químico, o DNA em

células tumorais de pacientes com câncer de mama, e assinalam, a presença de uma hiperploídia mensurável em 92% das pacientes. Por outro lado confirmam a existência de uma correlação entre a quantidade de DNA, a diferenciação histológica do tumor, e a presença dos receptores de estrogênio.

O método por nós empregado é simples e rápido, permitindo uma discriminação cromática muito nítida entre o complexo ácido-desoxirribonucleico-laranja de acridina, cuja fluorescência varia de verde ao amarelo-brilhante; e o complexo ácido-ribonucleico-laranja de acridina, que varia entre laranja ao vermelho-flamejante.

A variação de coloração se correlaciona com a quantidade de DNA e RNA presente nas células. Por isto os ductos normais mostram células de coloração e intensidade de fluorescência uniforme, as áreas neoplásicas benignas, apresentam variações pouco intensas e as malignas, modificações acentuadas.

O infiltrado inflamatório, quando presente, é facilmente distinguível. Os linfócitos apresentam-se como nucléolos esverdeados com RNA citoplasmático em crescente. Os granulócitos, apesar de tonalidade ligeiramente alaranjada, devido ao seu pequeno teor de polímero metacromático, mostram núcleos verde-amarelados de morfologia característica. Finalmente, os plasmócitos são pouco fluorescentes e sem brilho; além disto, sua morfologia é perfeitamente identificável.

De acordo com o que acabamos de assinalar, conclui-se que o método de fluorescência pela AO, pode ser considerado um método cito e histoquímico

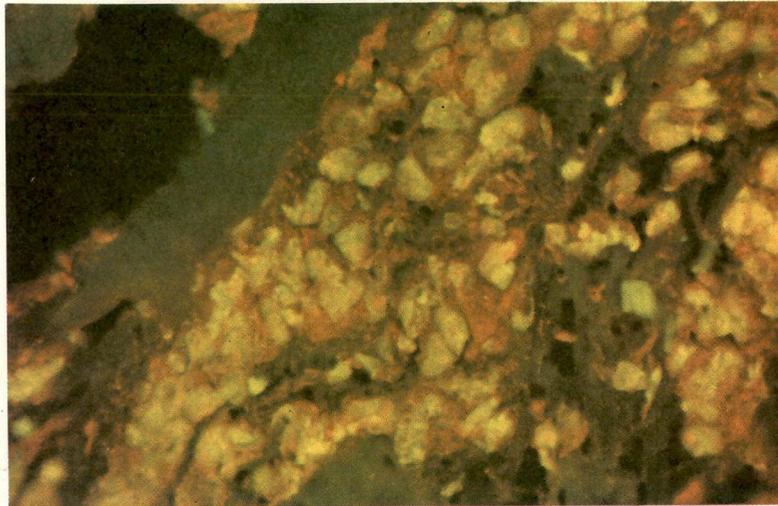


Fig. 1 — Células tumorais malignas com citoplasma vermelho-flamejante.

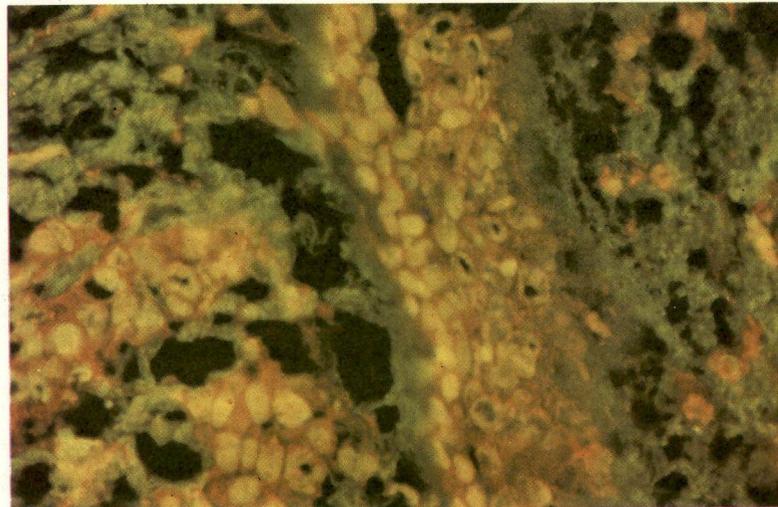


Fig. 2 — Células tumorais malignas com citoplasma e nucléolos vermelho-flamejantes, e núcleos amarelo-esverdeados.

co, que permite apreciar detalhes citológicos que caracterizam a benignidade ou malignidade celular e que, no estudo dos receptores hormonais a comparação de método de fluorescência entre si torna mais fácil o cálculo do percentual de células receptor-positivas e negativas.

SUMMARY

This study concerns application of acridine orange by fluorescence microscopy in frozen sections of tissue from malignant human breast biopsies.

The obtained data, have shown that since cancer cells are quickly and easily distinguished by AO fluorescence, this method can be

useful as a rapid and accurate screening technique, when the specialist has cumulative experience and good judgment of some morphological criteria.

In addition, the color shades obtained by AO may give more detail in respect to metachromatic color differentiation of DNA and RNA in normal and abnormal cellular elements.

This method may be relevant to characterize the percentage of cancer cells which exhibit cellular fluorescence induced by biological markers of cancer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GILL, J.E.; HORAN, P.K.; WHEELLESS JR., L.L. — *Cytofluorometric and Cytochemical comparison of normal and abnormal human cells.* J. Cell. Biol., 70:100a, 1976.
2. GILL, J.E.; WHEELLESS, JR., L.L.; HANNA-MADDEN, C.; MARISA, R.J.; HORAN, P.K. — *A comparison of Acridine Orange and Feulgen cytochemistry of human tumor cell nuclei.* Cancer Research, 38:1983-1898, 1978.
3. KASTNER, M.R.Q.; SCHETTINO, A.M.S.; GUERRA, S.O.; CASTRO, O.F. — *Determinação de Receptores Hormonais em Câncer de Mama: Método histoquímico.* Rev. Bras. de Cancerologia 29 (3):32-39, 1983.
4. OLSZEWSKI, W.; DARZYNKIEWICZ, Z.; ROSEN, P.; SCHWARTZ, M.K.; MELAMED, M.R. — *Flow Cytometry of Breast Carcinoma. Relation of DNA Ploidy Level to Histology and Estrogen Receptor.* Cancer, 48:980-984, 1981.
5. SCHÜMMELFEDER, N. — *Zur histochemischen Bedeutung der Fluoreszenz-Metachromasie des Acridinorange.* Acta histochem, Suppl i:148-151, 1958.
6. SCHÜMMELFEDER, N.; WESSEL, W.; NESSEL, E. — *Die Wirkung von 3,6-Diaminoacridin auf Wachstum und Zellteilung in Ehrlich-Ascitestumor.* Z. Krebsforsch., 63:129-141, 1959.

Agradecimento:

Agradecemos a Thereza Leone secretária do nosso Serviço, a colaboração prestada.