

UM ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES SOBRE A DISTRIBUIÇÃO
DE FREQUÊNCIA DE CROMATINA SEXUAL EM POPULAÇÕES NORMAIS

Dorly de Freitas Buchi

Tese de Mestrado apresenta
da a Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Genéti
ca Humana da Universidade
Federal do Paraná.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Antônio Marçallo

Ao Everson

e aos meus pais
pelo apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

- ao Dr. F. A. Marçallo pela orientação;
- aos colegas do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, em especial à Vera L. P. de Moura pelas sugestões e à Zulmira Lacava pelo auxílio durante a coloração das lâminas;
- à Tanya Mara Bauab pelo auxílio durante a coleta dos dados de Brasília;
- ao Dr. H. Krieger e ao Prof. Pedro Cabello pelas sugestões durante a análise estatística;
- aos colegas do Laboratório de Morfologia da UnB por terem facilitado a análise das lâminas;
- ao Dr. Reginaldo H. Albuquerque do Laboratório de Endocrinologia da UnB por ter facilitado o acesso à bibliografia;
- meus estudos na UFPR e UnB foram financiados pelo CNPq; a esta organização meus agradecimentos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	6
1a. Metabolismo celular e cromatina sexual	7
1b. Maturação sexual	10
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3a. Características das populações	17
4. RESULTADOS	21
4a. Resultados demográficos	21
4b. Resultado da análise das lâminas	23
4c. Análise estatística	26
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	37

1. INTRODUÇÃO

Estudando células nervosas de gatos, Barr e Bertram (Barr, 1949) perceberam um dimorfismo sexual : nos núcleos das células femininas havia um grânulo de massa cromatínica adjacente ao nucléolo, que não estava presente nos núcleos das células masculinas. Este grânulo, até então conhecido por "satélite nucleolar", passou a ser chamado de "cromatina sexual" ou "corpúsculo de Barr". No presente trabalho nos referiremos a este grânulo por cromatina sexual ou simplesmente cromatina, ambos com o mesmo significado.

Este dimorfismo sexual existe nas células somáticas de vários animais, inclusive na espécie humana e variações ocorrem na forma, localização e frequência conforme a espécie e o tipo de célula estudado (Moore, 1966). Através de métodos autoradiográficos (German, 1962) ficou comprovado que a cromatina

sexual se devia a um dos cromossomos X se encontrar condensado durante a interfase. Lyon (1961) propôs que o X heterocromático das fêmeas, que originaria a cromatina sexual nas células somáticas, seria geneticamente inativo, que esta inativação ocorreria na fase embriogênica e que a escolha do X (de origem materna ou paterna), para ser inativado, seria ao acaso. A cromatina sexual, originada da inativação do cromossomo X, explicaria a compensação de dose nos mamíferos para os genes ligados a este cromossomo. Atualmente sabemos que a hipótese de Lyon estava em parte correta, pois há evidências da inativação de alguns genes ligados ao cromossomo X, como é o caso do locus para a enzima G6PD (Beutler, 1962). Fizemos uma ressalva quanto a total veracidade dessa hipótese, pois, também há evidências de que a inativação não ocorreria em todo o cromossomo. O antígeno produzido pelo locus Xg, situado no cromossomo X, é geralmente citado como exemplo de um gene que não sofre inativação (Gorman, 1963).

1a. Metabolismo celular e cromatina sexual

Com seu trabalho em neurônios de gatos, Barr e Bertram (Barr, 1961) concluíram que a posição do satélite nucleolar (atual cromatina sexual) variava com o estado fisiológico da célula. Através de uma série de experimentos perceberam que a cromatina sexual mudava de posição após um estímulo elétrico prolongado. Concluíram que este movimento seria um reflexo da exigência de uma atividade mais intensa do metabolismo do núcleo. A partir daí fácil foi imaginar que substâncias que alterassem o metabolismo deveriam também permitir uma melhor visualização ou não dessa massa cromatínica.

Muitos estudos foram feitos tentando demonstrar va-

riações durante o ciclo menstrual, variações por ação de antibióticos, hormônios sexuais, idade do indivíduo, etc. Entre estes estudos gostaríamos de salientar os seguintes: - Sohval e col. (1961) obtiveram dados indicadores de que fatores externos poderiam influenciar a cromatina sexual. Fazendo análises em células da mucosa bucal de mulheres, após a administração de antibióticos, observaram uma sensível redução no tamanho da cromatina sexual.

- Dokumov e Spasov (1967), administrando hormônios sexuais a diversas mulheres, observaram que os esteróides naturais (progesterona e testosterona) reduziam a incidência de cromatina enquanto que com diethylstilbestrol dipropionato (estrogênio sintético) aumentava significativamente a frequência de cromatina sexual em células da mucosa bucal. Portanto parecia que os hormônios naturais e sintéticos afetavam a frequência da cromatina sexual.

Sabemos que a menstruação está sob a influência dos hormônios hipofisários e ovarianos, cujos níveis sofrem flutuações conforme podemos observar na (Fig. 1). É evidente que outros fatores também influenciam o fluxo menstrual, como por exemplo, o estado nutricional ou o estado psicológico do indivíduo. Se acreditarmos que os hormônios sexuais alterem o metabolismo celular e que desta maneira possam atuar sobre a cromatina sexual, poderemos, então, supor que a frequência de cromatina em mulheres normais varie durante o ciclo menstrual, de acordo com as flutuações destes hormônios.

- Del Campo e cols. (1968) encontraram variações na frequência em células da mucosa bucal, mas concluíram que seus dados eram insuficientes para estabelecer uma influência hormonal, embora sugerissem que "fatores extra genéticos estão envolvidos na de-

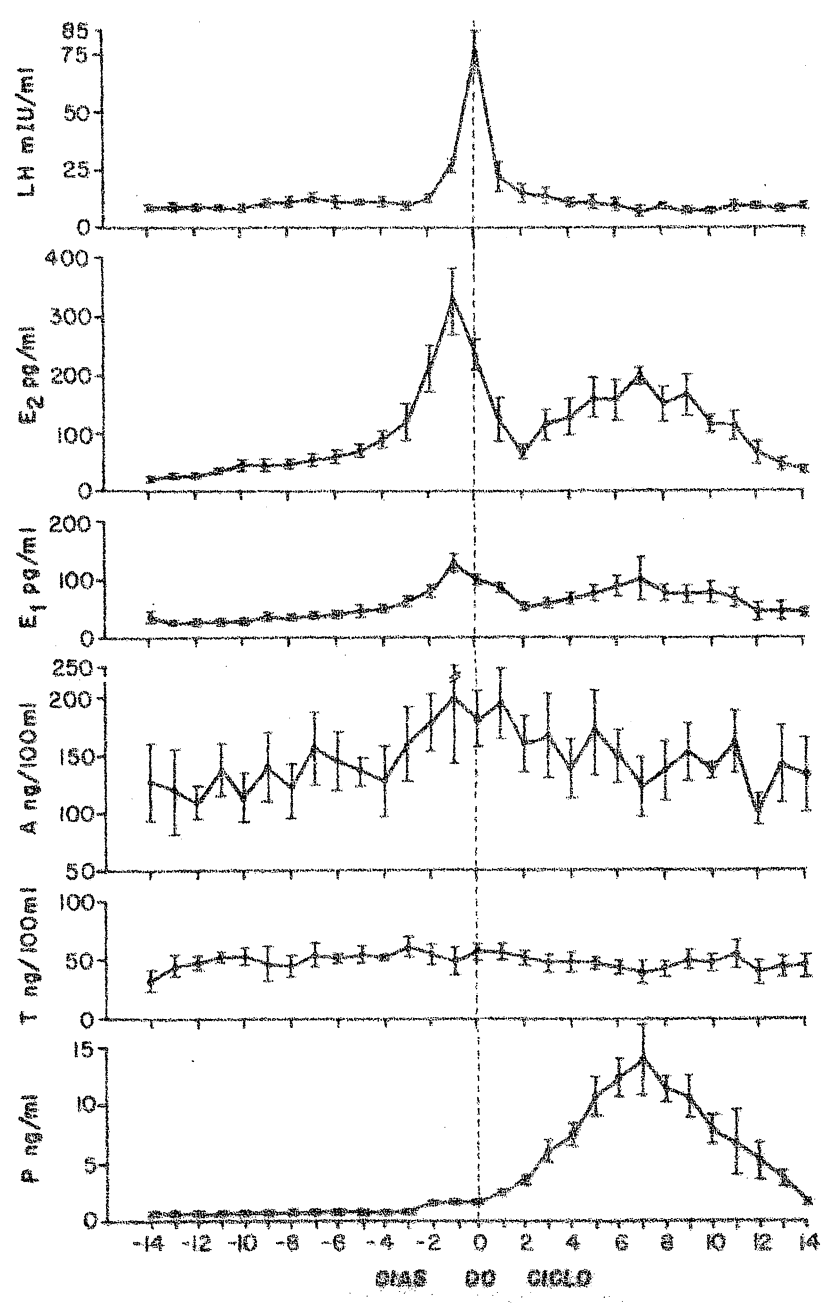


Fig. 1 - Flutuações hormonais durante o ciclo menstrual (extraído de Kim, 1974). P = progesterona; T = testosterona; A = androsterona; E₁ = estrona; E₂ = estradiol; LH = hormônio luteinizante.

terminação do sexo genético nas células somáticas".

- Dolan (1968) analisando células da mucosa bucal de mulheres não encontrou diferenças significantes entre as frequências durante o ciclo menstrual, concluindo que as variações encontradas não se deviam a um hormônio particular.

- Dokumov e Spasov (1968) encontraram uma maior frequência de cromatina sexual durante a fase proliferativa que durante a fase luteal e que a maior incidência coincide com o tempo de ovulação. Concluem que a ausência de correlação entre o índice eosinofílico e a frequência de cromatina sexual seja devido a um balanceamento entre os vários hormônios que regulam o ciclo menstrual.

- Cavalli e cols. (1970), apesar de não terem encontrado diferenças significantes entre as frequências nos diversos dias do ciclo menstrual, concluíram que os dados sugeriam que os hormônios sexuais podem causar flutuações na incidência de cromatina sexual de mulheres normais.

Ib. Maturação sexual

Durante a infância ambos os sexos secretam quantidades pequenas e constantes de estrógenos. A medida que se aproximam da puberdade, a excreção urinária de estrona, estradiol e estriol aumenta progressivamente nas mulheres, enquanto que nos homens aumenta a quantidade de testosterona (Gupta, 1975). Na (Fig. 2) podemos observar claramente a relação entre estes hormônios durante a puberdade. Depois da ocorrência da menarca, a concentração de estrógenos no plasma atinge o nível adulto; a partir deste estágio os níveis tem apenas uma pequena variação dentro do ciclo menstrual.

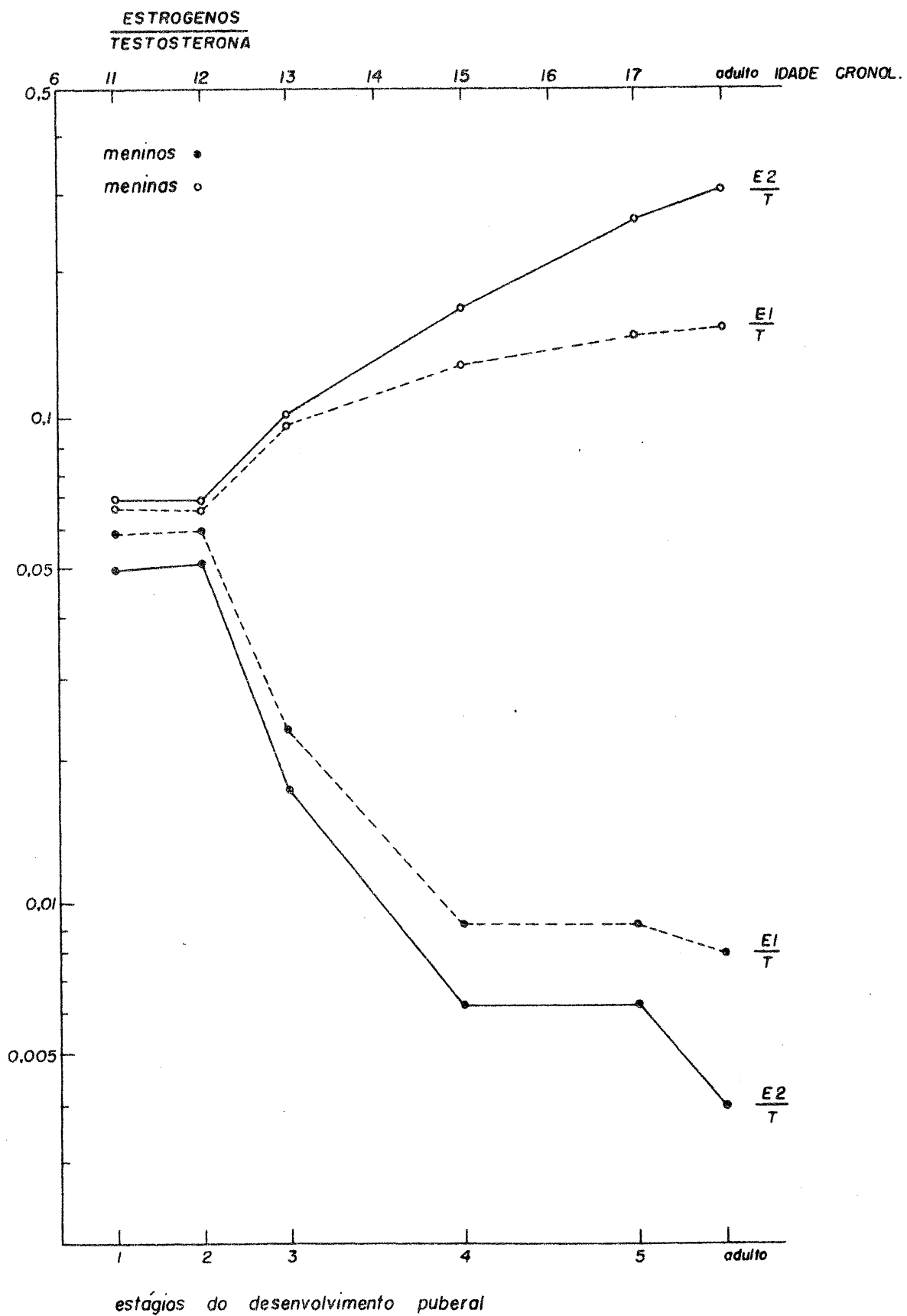


Fig. 2 - Relação entre estrogênio e testosterona para meninos e meninas durante a puberdade (modificado, de Gupta, 1974).

A idade em que ocorre a menarca varia individualmente e entre as populações. Bjolén e Bentzon (1968) concluíram que a raça e a nutrição devem influenciar na determinação da idade em que ocorre a menarca e que uma nutrição rica em proteínas acelera o desenvolvimento puberal. Aw e Tye (1970) em Singapura, Carfagna e cols, (1972) em Nápoles e Shakir (1971) em Bagdad encontraram médias de idade para a ocorrência da menarca estatisticamente diferentes entre os grupos de alto e baixo nível sócio-econômico, concordando, portanto com Bjolén (1968).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

O presente trabalho foi planejado com a finalidade de comprovar trabalhos desenvolvidos anteriormente no laboratório de Genética da UFPR (Waldrigues, 1972 e Marçallo, 1972 e 1974), como também comprovar algumas idéias existentes na literatura sobre a influência dos hormônios sexuais na distribuição da frequência de cromatina sexual.

Como já foi visto, durante a puberdade ocorrem alterações no metabolismo celular em virtude das grandes transições nas funções endócrinas. Estas mudanças, devido a uma maior produção de hormônios sexuais, talvez possam ser percebidas através de análises da cromatina sexual. Explicaria os resultados encontrados por Marçallo (1972 e 1974) e Waldrigues (1972), resultados estes que permitiram a formulação da hipótese de que haveria três padrões de frequência de cromatina: um padrão infantil, um

puberal ou de transição e um padrão adulto de cromatina sexual.

Além disso, achamos interessante comparar duas populações diferentes quanto ao grupo étnico e padrão nutricional, pois podemos imaginar que estes fatores também possam estar influenciando a distribuição da frequência de cromatina.

Portanto resolvemos coletar uma amostra onde estivessem incluídos indivíduos de diversas idades, para estudarmos a distribuição de frequências de cromatina sexual e se realmente podemos perceber, através desta análise, a influência dos hormônios sexuais durante a puberdade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados esfregaços de células de mucosa bucal de indivíduos normais do sexo feminino, de diversas idades em duas populações diferentes. Foi coletada uma lâmina por indivíduo, utilizando apenas a terceira raspagem; as duas primeiras eram desprezadas. Estas lâminas foram fixadas e coradas de acordo com a metodologia de Barr (1965).

A técnica usada para a fixação foi a seguinte:

- a) Logo após o esfregaço colocamos a lâmina em álcool etílico 95% durante 15 a 30 minutos;
- b) Passamos então para o álcool etílico absoluto por 3 minutos;
- c) Secamos ao ar.

A técnica usada para a coloração foi a seguinte:

- a) Álcool etílico 70% durante 5 minutos;

- b) Passamos pela água destilada duas vezes, durante 5 minutos cada;
- c) Coramos pela carbolfucsina por 5 a 10 minutos;
- d) Colocamos no álcool etílico 95% por 1 minuto e depois no álcool etílico absoluto por mais um minuto;
- e) Finalmente passamos pelo xilol.

As lâminas foram analisadas sem montar, uma vez que assim já obtínhamos uma boa visualização do material e economizávamos tempo.

O método de preparação da carbolfucsina utilizada na coloração foi o seguinte:

a) Primeiramente preparamos a solução de fucsina básica:

- fucsina 3 g;
- álcool etílico 70% 100 ml;
- b) Depois preparamos a carbol fucsina:
 - solução de fucsina básica 10 ml;
 - fenol 5% em água 90 ml;
 - ácido acético glacial 10 ml;
 - formoldeído 37% 10 ml;

Deixávamos esta solução descansar em frasco escuro por 24 horas para, então, filtrar e usar.

Depois de fixadas e coradas, as lâminas foram analisadas com filtro verde-amarelo e com objetiva de imersão; a análise foi feita cegamente, isto é, sem identificar uma lâmina com um indivíduo especificamente. Foram contados em torno de 100 núcleos por lâmina e só eram incluídos na amostragem os que apresentassem bordos regulares, membrana intacta e sem grumos cromatínicos, isto é, com coloração homogênea. Destes núcleos

são eram computados como positivos os que apresentassem a cromatina sexual periférica; os que apresentassem a cromatina em outras posições eram excluídos da amostragem.

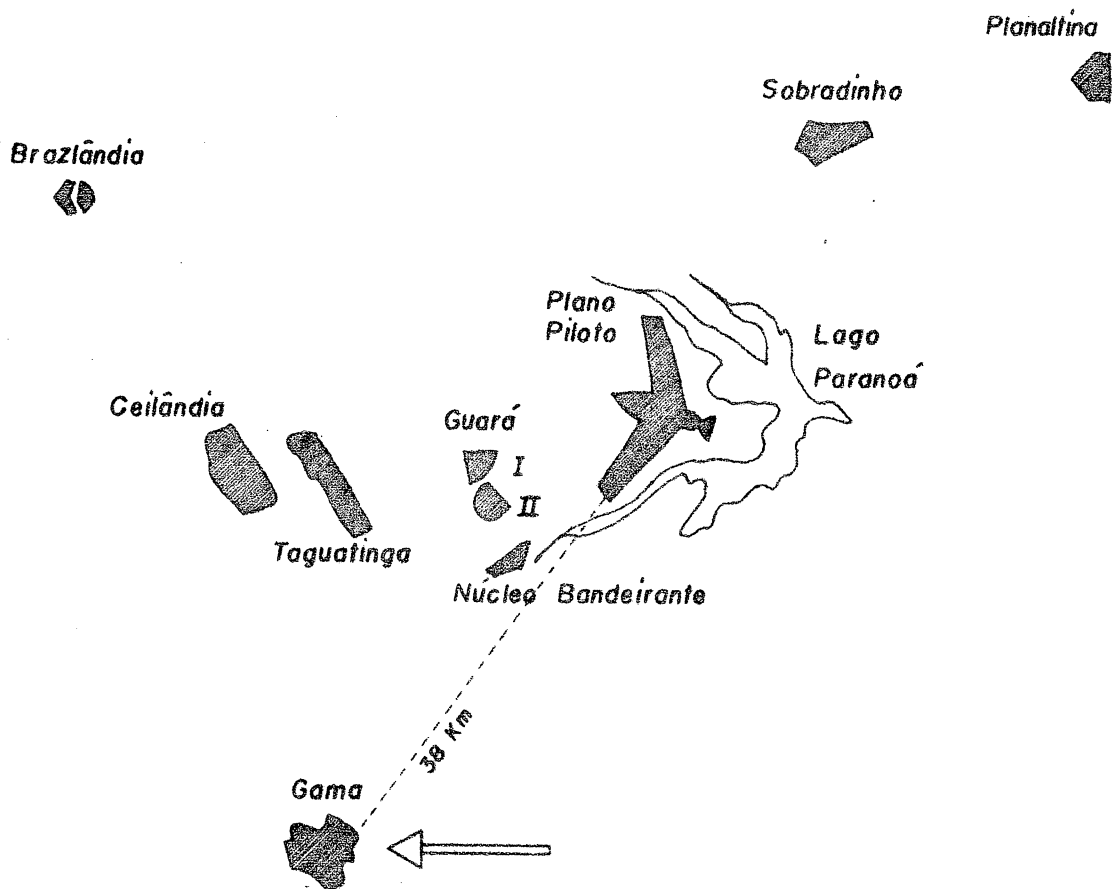
3a. Caracterização das populações

Para estudar o que nos propusemos utilizamos esfregos de duas populações brasileiras diferentes:

- a) Uma população de mulheres normais de Curitiba, Pr;
- b) Uma população de mulheres normais de Brasília, DF.

A amostra de Curitiba é constituída principalmente por indivíduos caucasóides descendentes de italianos, libaneses e poleneses. Vivem numa região de clima temperado, com temperatura média anual de 16,20C e tem um bom padrão nutricional (Marçallo, 1974).

A cidade de Brasília é constituída por um setor chamado "plano piloto", cujas avenidas e edifícios estão distribuídos de maneira a dar-lhe um aspecto de avião (vista aérea) e por cidades afastadas deste setor central, que são chamadas "cidades satélites". Estas cidades variam de nível sócio-econômico, mas de maneira geral o nível é mais baixo que o do plano piloto. A amostra de Brasília foi coletada no Gama que é uma das cidades satélites (ver localização na (Fig. 3). Esta amostra é constituída principalmente por nordestinos, mineiros e goianos. Populações estas que se caracterizam por serem uma mistura tri-híbrida: brancos, negros e índios. O Gama é uma das cidades com nível sócio-econômico intermediário entre o plano piloto e algumas das outras cidades satélites, mas em relação à amostra de Curitiba o nível pode ser considerado baixo. A população tem um padrão nutricional de médio a ruim e o clima é ameno e seco, com



(§) Anuário de Brasília 1974/75.

Fig. 3 - Esquema ilustrativo de Brasília, indicando a posição das cidades satélites em relação ao plano piloto (§).

temperatura média anual de 20,49C. A umidade relativa varia entre 50 e 70% e a região se caracteriza por ter duas estações anuais: um verão chuvoso e um inverno seco, quando a umidade relativa pode chegar a 13%.*

Da amostra de Curitiba selecionamos ao acaso 10 (dez) indivíduos por idade, de 7 a 20 anos, sendo que alguns dos grupos etários ficaram com número menor. A distribuição das lâminas por idade se encontra na Tabela 3. Em torno de 96% da amostra é branca e 4% é mulato claro. Estes dados da população de Curitiba foram coletados e analisados por Waldrigues (1972) e Marçalho (1972 e 1974).

A amostra do Gama, Brasília, foi coletada num colégio misto, em torno de 10 (dez) indivíduos por idade, de 7 a 20 anos, totalizando 140 lâminas. Deste total 6 (seis) lâminas se perderam por motivos técnicos, mas os dados gerais sobre os indivíduos foram mantidos. Na Tabela 3 encontra-se a distribuição das lâminas dentro dos diversos grupos etários. Cada menina foi entrevistada para obtermos dados sobre o estado de origem (poucas nasceram em Brasília) e sobre a ocorrência ou não da menarca. Nesta ocasião as meninas foram examinadas pela doutoranda Tanya Mara Bauab para ser determinado o padrão nutricional e serem classificadas dentro de um dos grupos étnicos. Esta classificação foi feita baseada na pigmentação da pele, pigmentação e tipo de cabelo, conformação do nariz e lábios. Na Tabela 1 encontramos os resultados deste exame e a (Fig. 4) nos mostra a distribuição da ocorrência ou não da menarca dentro das diversas idades.

* Diagnóstico do Espaço Cultural do D.F. - Codeplan, 1971.

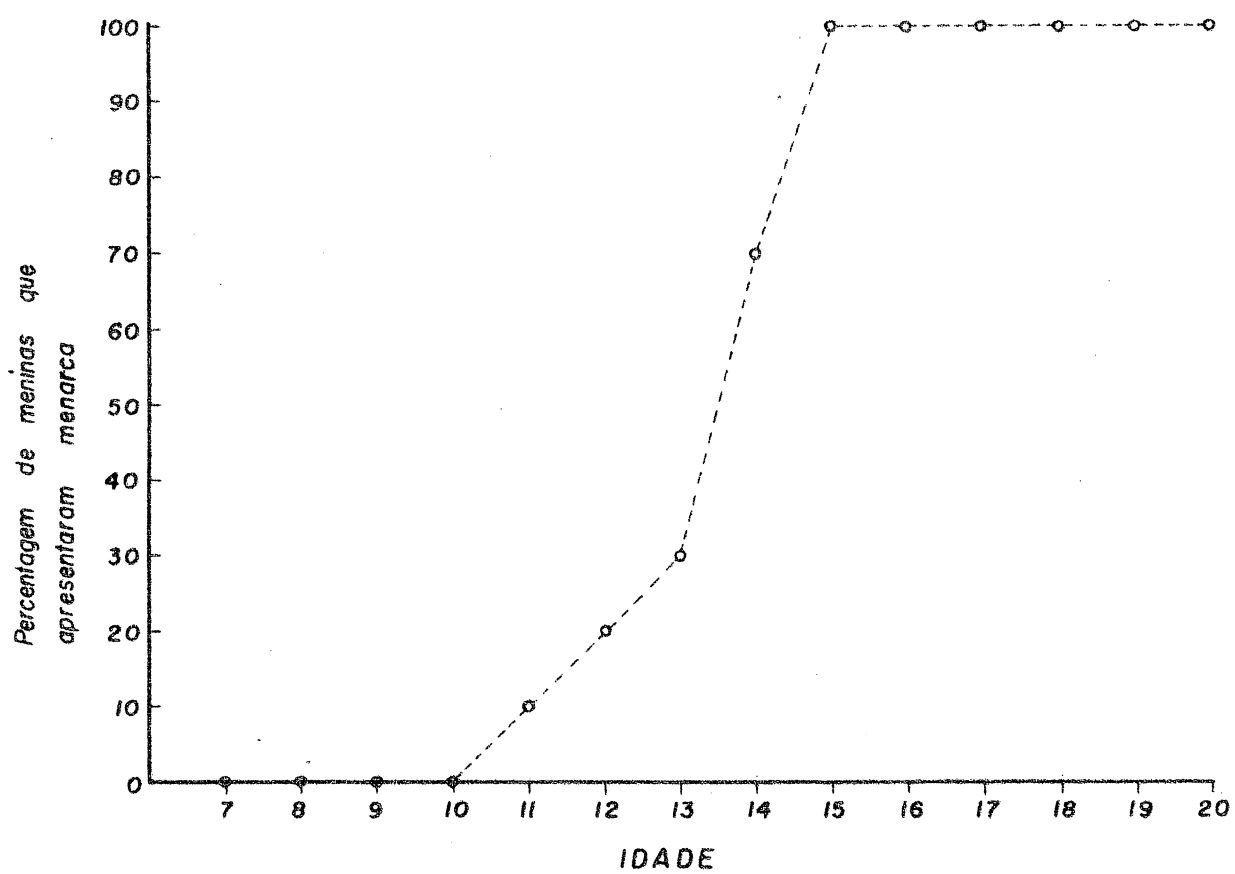


Fig. 4 - Distribuição da ocorrência ou não da menarca dentro dos diversos grupos etários (dados da amostra do Gama).

4. RESULTADOS

4a. Resultados demográficos

Na Tabela 1 encontramos os resultados quanto ao grupo étnico e padrão nutricional. Comparando com Curitiba, onde 96% da amostra é branca, o total de apenas 40% encontrado no Gama, mostra como as duas populações são diferentes quanto ao grupo étnico. Os mulatos (brancos x negros) são encontrados quase na mesma proporção, totalizado em torno de 39%. Os mestiços (brancos x índios) são em menor número, mas ainda assim, seu total, em torno de 21%, não pode ser considerado desprezível. Estes resultados nos mostram que a população de Curitiba é bem mais homogênea que a do Gama em relação ao grupo étnico. As duas populações também podem ser consideradas diferentes quanto ao padrão nutricional, pois enquanto que a população de Curitiba tem um bom padrão, apenas 30% da população do Gama foi classifi

Tabela 1 - Distribuição dos indivíduos da amostra do Gama conforme o padrão nutricional e o grupo étnico.

Grupo étnico	Padrão nutricional			Total		
	bom	médio	ruim	n	%	
Branco	19	29	8	56	40,0	
Mestiço claro	7	14	1	22	15,7	
Mestiço escuro	1	4	3	8	5,7	
Mulato claro	7	17	5	29	20,7	
Mulato médio	6	7	4	17	12,2	
Mulato escuro	2	4	2	8	5,7	
Total	n	42	75	23	140	-
	%	30,0	53,6	16,4	-	100,0

cada como tendo um bom padrão de nutrição.

O Gama é uma das cidades dormitório do pessoal que forma o que conhecemos por "mão de obra não especializada"; é habitada por indivíduos que em sua maioria imigrou para esta região nos últimos quinze anos, ou seja, desde a fundação de Brasília. Estes imigrantes tem por origem os diversos estados do Brasil, mas a maioria veio do Nordeste (em torno de 56%), de Minas Gerais ou Goiás. Os dados sobre os estados de origem da população do Gama se encontram sumarizados na Tabela 2.

4b. Resultado da análise das lâminas

Das 140 lâminas de Brasília, 6 (seis) se perderam por motivos técnicos, o que reduziu o número para 134. Somando com as 129 lâminas de Curitiba, ficamos com uma população de 263 indivíduos. A distribuição das frequências médias de cromatina sexual encontradas nos diversos grupos etários se encontra sumariada na Tabela 3. Como podemos notar, as frequências médias de núcleos cromatino positivo encontradas na população de Brasília são menores que as de Curitiba. Achamos que isso se deva ao fato de o analisador das lâminas de Curitiba e Brasília não serem a mesma pessoa. O critério para a escolha de núcleo como positivo ou negativo pode ser ligeiramente mais rigoroso para um analisador que para outro. Um dado importante é que em ambos os locais a frequência de cromatina sexual tende a diminuir até chegar aos primeiros estágios da puberdade e então tende a subir novamente.

Tabela 2 - Distribuição dos indivíduos (n) da amostra do Gama conforme os Estados de origem.

Região Norte		Nordeste		Sudeste		Sul		Centro Oeste		Outros	
Estado	n	Estado	n	Estado	n	Estado	n	Estado	n		n
Amazonas	2	Alagoas	1	Espírito Santo	1	Sta.Catarina	2	Distrito Federal	3	Portugal	1
Pará	1	Bahia	16	Minas Gerais	25			Goiás	16	?	1
		Ceará	16	Rio de Janeiro	3			Mato Grosso	4		
		Maranhão	13	São Paulo	3						
		Paraíba	4								
		Pernambuco	5								
		Piauí	15								
		Rio Gde.do Norte	7								
		Sergipe	1								
Total	3		78		32		2		23		2
%	2,14		55,71		22,86		1,43		16,43		1,43

Tabela 3 - Distribuição das lâminas e das frequências médias de cromatina sexual de acordo com as idades.

Idade	Curitiba			Brasília			Total
	n	%	ângulo(§)	n	%	ângulo(§)	
7	10	30,6	33,57	10	25,9	30,60	20
8	10	31,1	33,88	9	25,9	30,62	19
9	10	30,7	33,62	10	24,2	29,46	20
10	10	25,9	30,58	10	24,6	29,76	20
11	10	23,5	29,02	10	22,6	28,35	20
12	10	25,3	30,19	11	23,4	28,96	21
13	10	25,8	30,51	10	24,5	29,65	20
14	10	25,8	32,48	10	28,1	32,04	20
15	4	33,7	35,47	10	28,2	32,06	14
16	9	30,1	33,26	9	24,8	29,89	18
17	6	35,5	36,56	8	25,9	30,57	14
18	10	36,9	37,43	10	26,3	30,83	20
19	10	32,4	34,67	11	23,8	29,29	21
20	10	32,3	34,60	6	25,4	30,29	16
Total	129			134			263

(§) Ângulos correspondentes às percentagens.

4c. Análise estatística

A análise estatística foi feita num computador IBM 1130, utilizando programa REGD escrito em Fortram IV, por sugestão do Dr. H. Krieger e Prof. Pedro Cabello. Como tínhamos algumas informações a mais sobre a população de Brasília que sobre a de Curitiba (ex.: raça, menarca, nutrição), a análise foi feita em duas partes: uma análise de regressão múltipla com os dados de Curitiba e Brasília em conjunto, utilizando as variáveis comuns para ambos os locais; na segunda parte fizemos uma análise de regressão múltipla utilizando apenas as informações sobre a amostra de Brasília.

Primeiramente as freqüências de cromatina sexual foram transformadas em ângulos correspondentes às percentagens, $\text{âng.} = \arcsen \sqrt{\text{percent.}}$ (Snedecor, 1959).

Depois de feitas as transformações, fizemos a primeira parte da análise, na qual, como já foi explicado, utilizamos os dados das populações de Brasília e Curitiba em conjunto, onde pudemos usar apenas 4 (quatro) variáveis: local, idade, freqüência e ângulo. As regressões foram feitas sobre ângulos e sobre percentagens, os resultados sendo significantes tanto em um como no outro caso, isto é, local e idade seriam fatores que estariam influenciando a freqüência de cromatina sexual. Os resultados desta análise se encontram sumarizados na Tabela 4. Nesta tabela vemos que os resultados permitem a construção de equações. A partir da equação

$$Y = 37,214439 - 1,499107x + 0,065567x^2 \quad (1)$$

obtida da Tabela 4, construímos uma curva que se acha representada na (Fig. 5). Esta curva nos mostra a distribuição das freqüências esperadas de cromatina sexual de acordo com a idade, levan-

Tabela 4 - Resultados das regressões com os dados de Brasília e Curitiba.

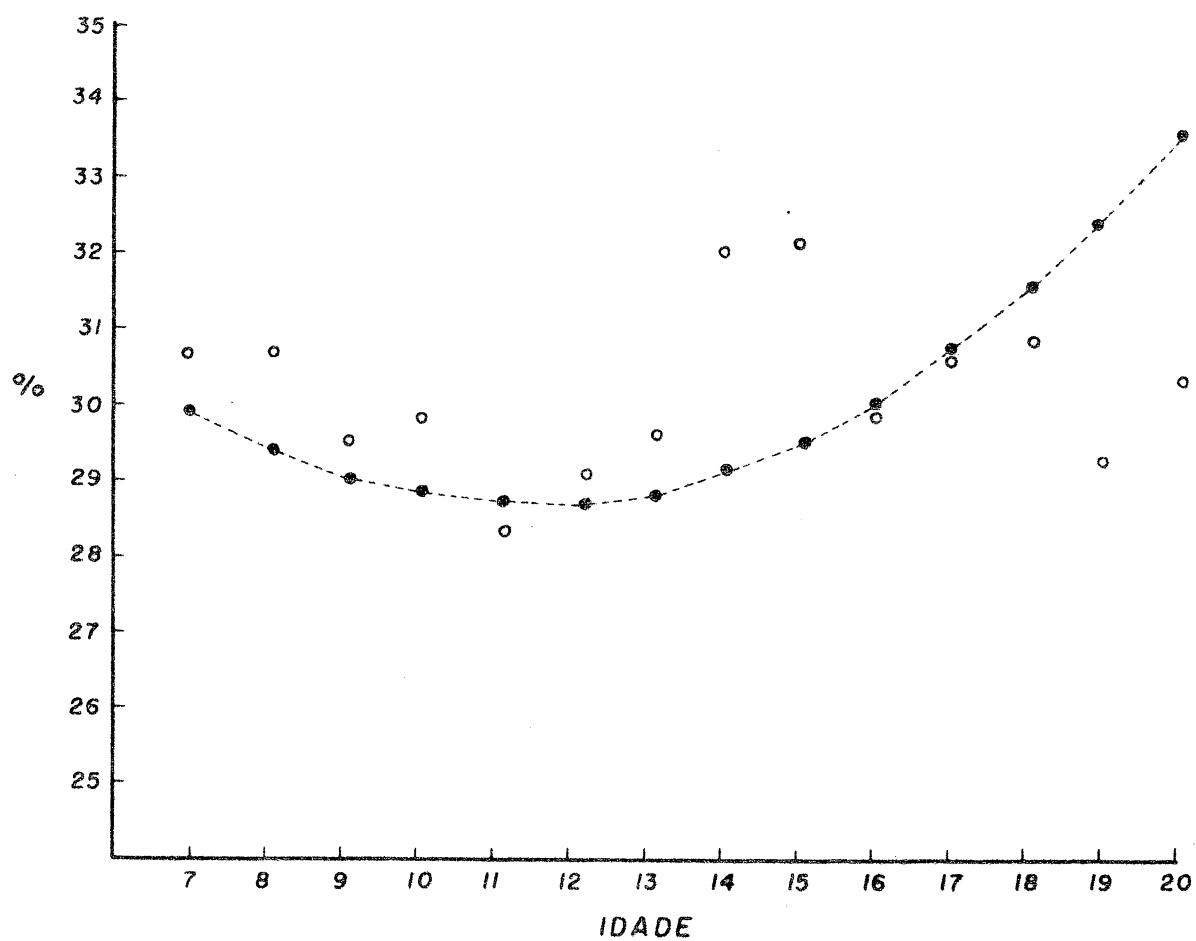
Regressões sobre frequências		
		a = 37,214439
	Coef. regressão	Desvio padrão
Local	-4,419822	$\pm 0,769507^{**}$
Idade	-1,499107	$\pm 0,727919^*$
Idade ²	0,065567	$\pm 0,026783^*$
		a = 36,380272
Idade	-1,730027	$\pm 0,770226^*$
Idade ²	0,074128	$\pm 0,028339^*$
Regressões sobre ângulos		
		a = 37,704864
Local	-2,874719	$\pm 0,495432^{**}$
Idade	-0,953454	$\pm 0,468656^*$
Idade ²	0,041556	$\pm 0,17243^*$
		a = 37,162284
Idade	-1,103645	$\pm 0,496470^*$
Idade ²	0,047125	$\pm 0,018266^*$

a = intersepto

Níveis de significância: * 5%

** 1%

Idade² = variável idade ao quadrado.



- Dados resultantes da equação (1)
- o Ângulos correspondentes às percentagens de cromatina em Brasília.

Fig. 5 - Distribuição das freqüências esperadas de cromatina sexual de acordo com a idade e ângulos correspondentes às percentagens encontradas no Gama.

do em conta a idade, o local e idade ao quadrado. No gráfico colocamos também os ângulos correspondentes às percentagens encontradas em Brasília.

Pretendendo encontrar a idade em que a frequência de cromatina é a mais baixa e o ponto em que a curva muda de direção, derivamos a equação (1), o que resultou, $x = 11,4$. Portanto a partir 11,4 anos a curva da distribuição da frequência de cromatina tende a subir.

Como explicamos anteriormente, na segunda parte do trabalho usamos apenas os dados de Brasília e pudemos utilizar um número maior de variáveis, mas a amostra reduziu seu tamanho pela metade. Idade, frequência, ângulo, padrão nutricional, grupo étnico e menarca foram as variáveis usadas, novamente regressando sobre as frequências e ângulos. Para fazer as regressões utilizamos as variáveis isoladas e em conjunto, mas nenhuma resultou significativa.

5. DISCUSSÃO

A puberdade é o tempo em que ocorrem grandes mudanças nas funções do sistema endócrino. O hipotálamo e a hipófi-se, que até então controlavam outras funções, passam a controlar também a secreção de hormônios sexuais e a maturação dos órgãos sexuais. Na (Fig. 6) temos um gráfico representativo destas mudanças, as quais ocorrem dentro de um pequeno período de tempo.

Na mesma figura podemos notar que no estágio puberal B1 não ocorrem mudanças bruscas quanto aos níveis de esteróides no plasma. Há apenas um ligeiro aumento de peso do útero e do ovário, devido ao próprio crescimento do indivíduo. Já no estágio B2, além de um aumento significativo do útero e do ovário, há também uma elevação acentuada dos níveis de estradiol e dihidrotestosterona no plasma e o aparecimento dos pelos pubianos. Um dado importante é que este estágio B2 corresponde exatamente

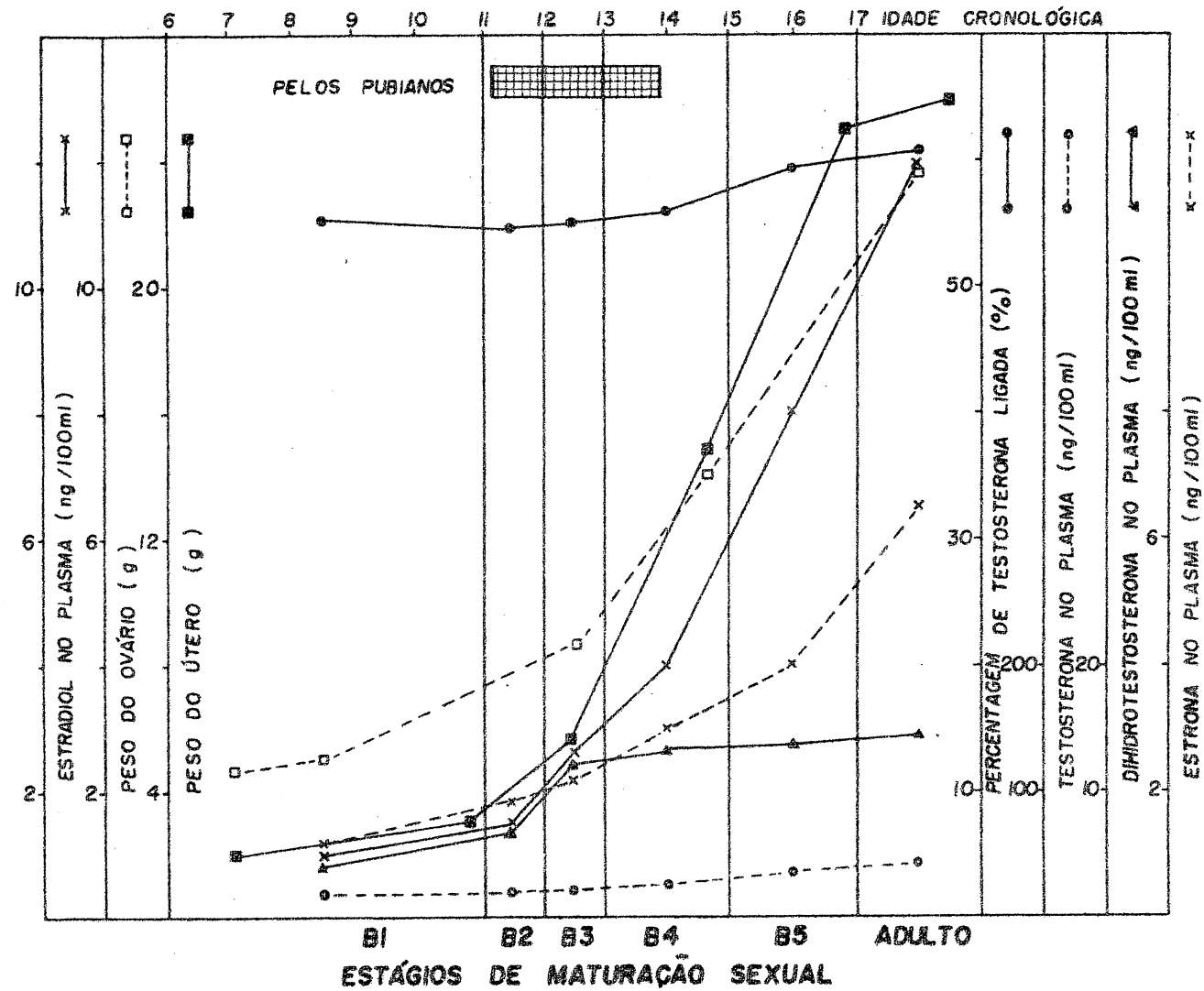


Fig. 6 - Alterações que ocorrem durante os estágios puberais (extraído de Gupta, 1975).

às idades entre 11 e 12 anos, idades em que encontramos em ambas as amostras uma menor frequência de cromatina sexual. Quando derivamos a equação (1), encontramos $x = 11,4$, idade em que ocorre, teoricamente, a menor frequência de cromatina e idade em que ocorre a mudança de direção da curva que foi vista na (Fig. 5). Nos estágios seguintes, B3, B4 e B5, os órgãos reprodutivos, útero e ovário, continuam a aumentar de peso até atingir o estágio adulto, o mesmo fenômeno acontecendo com os estrôgenos, cujos níveis plasmáticos, também, continuam a se elevar até a fase adulta. Já o nível da testosterona, tanto a forma encontrada livre no plasma (que se supõe ser a forma ativa do hormônio), quanto a ligada a proteínas, permanecem sem grandes alterações durante os estágios puberais.

De acordo com Gupta (1975), a menarca deverá ocorrer 1,5 ano após o início da elevação brusca do nível de estradiol, característica do estágio B2. O estágio provável da ocorrência da menarca será, portanto, no final do B3 ou início de B4.

A baixa frequência de cromatina sexual exatamente na idade em que começa a haver a maturação sexual do indivíduo, significa que encontramos uma percentagem menor de cromatina periférica. Pode ser que o cromossomo X formador da cromatina sexual esteja simplesmente desespiralizado em sua maior parte ou que tenha mudado de posição, trocado a posição periférica por outra qualquer. Esta segunda hipótese, de que a cromatina sexual tenha mudado de posição, também explicaria a menor frequência, pois os núcleos que apresentam a cromatina em outra posição que não a periférica, não foram computados. Estaria de acordo com Barr e Bertram (1949) pois significaria que a cromatina sexual se movimenta de acordo com uma maior ou menor atividade do metabolismo nuclear. Isto tudo é muito importante, pois pode signi-

ficar que ambos os cromossomos X da mulher são solicitados na época da maturação sexual.

O fato de idade ter sido uma das variáveis significantes na regressão é mais um dado a favor da influência dos hormônios sexuais sobre a cromatina sexual, pois com a idade especificamos um certo grau de maturação do indivíduo. A curva que vimos na (Fig. 5) também não rejeita a hipótese de Marçallo (1972 e 1974) de que deve haver três padrões de frequência de cromatina sexual: padrão infantil, puberal ou de transição e adulto. Em ambas as amostras encontramos uma frequência mais alta na infância e na fase adulta que na puberal. Podemos concluir também que a curva não pode subir indefinidamente, que provavelmente atinge um platô. As idades dos indivíduos de ambas as amostras permitem que percebamos apenas o declínio seguido por um aumento da frequência de cromatina sexual, exatamente o período de transição entre dois platôs: o correspondente à fase infantil e o correspondente à fase adulta.

A significância da variável local nos sugere que outros fatores também estão influenciando a distribuição da frequência de cromatina, pois na nossa amostragem, local significa clima, origem, tipo de alimentação e outros parâmetros não mensuráveis, diferentes para as duas regiões; a dificuldade está em separar os fatores.

O fato de não termos encontrado significância nas regressões feitas sobre as frequências encontradas em Brasília, talvez possa ser explicado, em parte, por termos reduzido o tamanho da amostra e os dados tenham sido insuficientes para demonstrar uma influência significativa. A variável grupo étnico, por exemplo, alcançou um valor de "t" relativamente alto ($t = 1,7$), assim como menarca ($t = 1,3$); se tivéssemos uma população maior,

talvez encontrássemos um valor significativo. Os nossos dados sugerem que além de idade (maturação sexual) outros fatores devem estar influenciando a distribuição de frequência de cromatina sexual.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho nos permitem chegar as seguintes conclusões:

- a) A distribuição de freqüência de cromatina sexual varia com a idade;
- b) A alteração ocorrida no metabolismo celular por ação dos hormônios sexuais, durante a maturação sexual do indivíduo, parece afetar, de algum modo, a cromatina sexual;
- c) No início da puberdade, entre 11 e 12 anos, encontramos uma menor freqüência de cromatina sexual;
- d) Os nossos resultados nos sugerem que os dois cromossomos X da mulher parecem ser solicitados durante a maturação sexual;
- e) Concluimos, ainda, que muito falta ser investigado sobre a maturação sexual feminina e a atividade dos cromossomos sexuais;
- f) Que o cromossomo X, formador da cromatina sexual, não seja simplesmente um cromossomo inativado, mas que, talvez, tenha

grande importância durante algumas fases do desenvolvimento feminino, quando então, participa mais ativamente do metabolismo nuclear.

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aw, E. and C. Y. Tye, 1970. Age of menarche of a group of Singapore girls. Human Biol., 42:329.
- Bai, K. I. and B. Vijayalakshmi, 1973. Sexual maturation of Indian girls in Andhra Pradesh (South India). Human Biol., 45:695.
- Barr, M. L., 1965. Sex chromatin techniques. Human chromosome methodology. Jorge J. Yunis, N.Y.
- Barr, M. L. and E. G. Bertram, 1949. A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature, 163:676.
- Beutler, E., M. Yeh and V. F. Fairbanks, 1962. The normal human female as a mosaic of X chromosome activity: studies using the gene G6PD deficiency as marker. Proc. Nat. Acad. Sci., 48:9.

- Bjölén, K. and M. W. Bentzon, 1968. The influence of climate on age at menarche: a historical review and a modern hypothesis. Human Biol., 40:69.
- Carfagna, M., E. Figurelli, G. Matarese and S. Matarese, 1972. Menarcheal age of school girls in the District of Naples, Italy, in 1969-70. Human Biol., 44:117.
- Cavalli, I. J., A. Waldrigues, Norma Stueber and F. A. Marçallo, 1970. Sex chromatin and menstrual cycle. Lancet, ii:832.
- Del Campo, M. S. B. and O. G. Ramirez, 1965. Fluctuations of the sex chromatin during the menstrual cycle. Acta Cytologica, 9:251.
- Dokumov, S. I. and S. A. Spasov, 1967. Sex chromatin pattern and menstrual cycle. Acta Cytologica, 12:131.
- Dokumov, S. I. and S. A. Spasov, 1967. Sex chromatin and sex hormones. Amer. J. Obst. and Gynec., 97:714.
- Dolan, S. B. E., 1968. Sex chromatin incidence and the human menstrual cycle. Acta Cytologica, 12:128.
- German, J. L., 1962. DNA - synthesis in human chromosomes. Trans. N.Y. Acad. Sci., 24:395.
- Gorman, J. G., J. Di Re, A. M. Treacy and A. Cahan, 1963. The application of Xga antiserum to the question of red cell mosaicism in female heterozygotes. J. Lab. Clin. Med., 61:642.
- Gupta, D., A. Attanasia and S. Raaf, 1974. Plasmaestrogen and androgen concentration in children during adolescence. J. Clin. Endocrinol. Metab., 40:636.

- Gupta, D., 1975. Clinics in endocrinology and metabolism. W. B. Saunders Company Ltd, vol. 4.
- Kim, M. H., H. Hosseinian and C. Dupon, 1974. Plasma levels of estrogens, androgens and progesterone during normal and dehamethasone treated cycles. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:706.
- Lyon, M. F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature, 190:372.
- Marçallo, F. A., 1972. Citogenética do cromossomo X. Tese de Mestrado. Série "Pós-Graduação em Genética" no. 2. Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.
- Marçallo, F. A., 1974. Cromatina sexual: estudo de sua distribuição de freqüências em populações normais. Tese de Livre Docência. Série "Pós-Graduação em Genética" no. 6. Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.
- Moore, K. L., 1966. Sex chromatin patterns in various animals. - in The sex chromatin. W. B. Saunders Company, London.
- Shakir, A., 1971. The age at menarche in girls attending schools in Baghdad. Human Biol., 43:265.
- Snedecor, G. W., 1959. Statistical methods. The Iowa State College Press, U.S.A.
- Sohval, A. R. and W. G. B. Casselman, 1961. Alterations in size of nuclear sex chromatin mass induced by antibiotics. Lancet, ii:139.
- Waldrigues, A., 1972. Cromatina sexual. Tese de Mestrado em Genética Humana. Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.