

C R O M A T I N A S E X U A L

Aldo Waldrigues,

Monografia apresentada à Comissão de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Genética Humana.

Fundação Universidade Estadual de Londrina

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO	1
2. HISTÓRICO	7
3. ORIGEM DA CROMATINA SEXUAL	9
3.1 - Heterocromatina e eucromatina.	9
3.2 - Evidências de que o corpúsculo da cromatina se xual é formado por um único cromossomo X . . .	12
3.2.1 - Evidências citológicas em núcleos pro- fásicos e interfásicos	13
3.2.2 - Evidências autoradiográficas	14
3.2.3 - Evidências clínicas	17
3.3 - Desenvolvimento dos cromossomos sexuais em cé- lulas germinativas	18
3.4 - Época em que, pela primeira vez, aparece o cor- púsculo da cromatina sexual.	20
3.5 - Proporção X-autossomos	22
4. PADRÕES DE CROMATINA SEXUAL EM ANIMAIS	27
4.1 - Em primatas	28
4.2 - Em carnívoros.	29
4.3 - Em artiodáctilos	32
4.4 - Em perissodáctilos	33
4.5 - Em insetívoros	35
4.6 - Em quirópteros	35
4.7 - Em desdentados	35
4.8 - Em marsupiais.	35
4.9 - Em lagomorfos.	36
4.10- Em roedores.	38
4.11- Em aves	42
4.12- Em répteis	42
4.13- Em anfíbios.	42
4.14- Em insetos	42
4.15- Em crustáceos.	43
4.16- Em moluscos pulmonados	43
5. LYONIZAÇÃO DO CROMOSSOMO X	44
5.1 - Introdução	44
5.2 - Hipótese de Lyon	45
5.3 - Presença de um cromossomo X inativo	46
5.3.1 - Expressão gênica em heterozigotos. . .	46
5.3.2 - Compensação de dose	56
5.3.3 - Ação alternada dos cromossomos X . . .	58

5.4 - Identidade do X inativo com o corpúsculo da cromatina sexual	61
5.5 - Mecanismos de Inativação	63
5.6 - Função dos cromossomos X inativos.	65
6. ALGUNS ASPECTOS DA FREQUÊNCIA DA CROMATINA SEXUAL NA ESPÉCIE HUMANA	67
6.1 - Determinação pré-natal do sexo	68
6.2 - Em recém-natos	68
6.3 - No ciclo menstrual	70
6.4 - Incidência de cromatina sexual e volume nuclear	71
6.5 - Em gestantes.	73
6.6 - Por idade	73
6.7 - Ação de drogas	75
6.8 - Em queimaduras	75
6.9 - Em indivíduos do sexo masculino.	75
6.10- Em indivíduos com anormalidades mentais.	77
6.11- Em mola hidatiforme	78
6.12- Em tumores	78
6.12.1 - Em hiperplasias e tumores somáticos benígnos	78
6.12.2 - Em tumores malignos	78
6.12.2.1 - Cancer de mama	78
6.12.2.2 - Cancer de colo de útero.	80
6.12.2.3 - Outros tumores	83
7. CONCLUSÕES	85
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	87

I N T R O D U Ç Ã O

Nas palavras abaixo, dirigidas ao Dr. Murray L. Barr pelo Dr. C.T. Bissel da "University of Toronto", quando do recebimento por parte deste de um título honorário em Dezembro de 1964, citadas em Thompson e Thompson (1970), encontramos uma noção da importância da cromatina sexual:

"Não foi senão em 1949, em uma famosa publicação da qual o Dr. Barr era co-autor, que cada Adão e cada Eva receberam suas roupagens científicas identificadoras. Como é tão comum em um acontecimento científico, a descoberta veio de uma reanálise do que parecia ser óbvio, a detecção de uma variação pequena mas significativa no que parecia ser uma sequência invariável. A descoberta do Dr. Barr e seu colega era tão crucial, e ao mesmo tempo tão inesperada, que, a glória com a qual ela foi recebida, foi tocada inicialmente com incredulidade e acanhamento.

O Dr. Barr me perdoará se, tendo conhecimento científico, eu tiver dado uma descrição de leigo sobre sua famosa descoberta. É, abreviadamente, um método para determinar a diferença entre as células do corpo de um homem e de uma mulher. Não tem, presentemente, nenhum significado para a compreensão da mística feminina, mas um leigo pode especular esperançosamente. Sabíamos que as células do corpo contêm dois cromossomos sexuais, cujos efeitos podem ser descritos por uma expressão algébrica

$$X + Y = M$$

$$2X = F$$

Desde que os cromossomos X são maiores do que o cromossomo Y, parece lógico que os dois cromossomos X possam constituir uma massa suficientemente grande para ser vista como uma pontuação, agora conhecida como corpúsculo de Barr, enquanto a combinação XY não seria suficientemente grande para ser visível. Mas a ciência raramente se orienta por tal simplificação. O assunto se

mostrou complicado, e acredita-se agora que, quando uma célula tem dois cromossomos X, um deles se espiraliza e fica inativo, enquanto o outro funciona. O que se espiraliza torna-se suficientemente denso para ser visto. Desde que as células somáticas do homem têm apenas um cromossomo X, ele não se espiraliza e não se torna inativo. Ele deve permanecer distendido e funcionando, e quando distendido permanece invisível".

Apesar de fazer parte da Genética Humana, somente nesta última década é que houve grande interesse pelo estudo da cromatina sexual, tendo este, alcançado um desenvolvimento verdadeiramente fabuloso. Veja-se, por exemplo, a revisão de Mittwoch(1964)

Overzier, em 1963, segundo Mittwoch (1964), estimou que cerca de 2 a 3 pessoas em 1000 têm um desenvolvimento anormal do sexo. O exame da cromatina sexual fornece uma ajuda simples e freqüentemente indispensável na diagnose de tais casos. Além disso, pela sua facilidade, se torna possível analisar grandes populações e delas obter estimativas destas anormalidades. Em termos teóricos, a origem da cromatina sexual e sua relação com os cromossomos X dão margens a especulações, que muitas vezes estimulam projetos de pesquisa, tal como sobre o modo de funcionamento do cromossomo X, não só na determinação do sexo, mas também, de uma maneira geral.

Usualmente observada em interfase, mas há a possibilidade de o ser no início de prófase (Fig.I.1), porém, não nos últimos estágios da mitose.

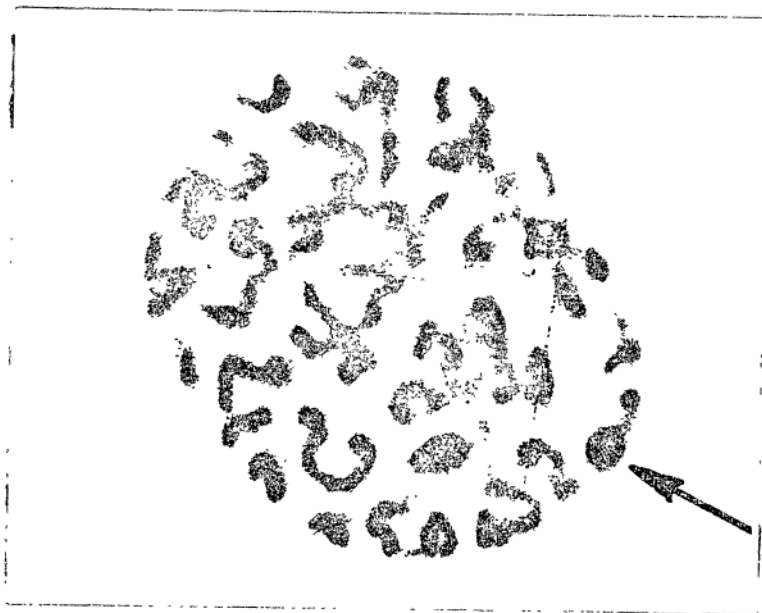


FIG. I.1 - Núcleo de fibroblasto mostrando a permanência do corpúsculo de Barr em prófase.

Obs.: Cortesia da Dra. U.Mittwoch.

Salvo em algumas espécies (Gambás e alguns roedores) a cromatina sexual é raramente visualizada no núcleo das células de machos normais; logo, a presença do corpúsculo de Barr no núcleo celular interfásico é uma característica citológica de fêmeas dos mamíferos (Moore,1966).

Denominada de "satélite nucleolar", pela sua íntima relação com o nucléolo dos neurônios em gatos, por Barr e Bertram, em seu trabalho original em 1949, posteriormente se percebeu ser imprópria, essa denominação, pois que, em muitas células, a cromatina sexual está justaposta internamente à superfície da membrana nuclear (Barr,1951;Graham e Barr, 1952; Moore e Barr,1954) e não como "satélite nucleolar" (FIG.I.2).

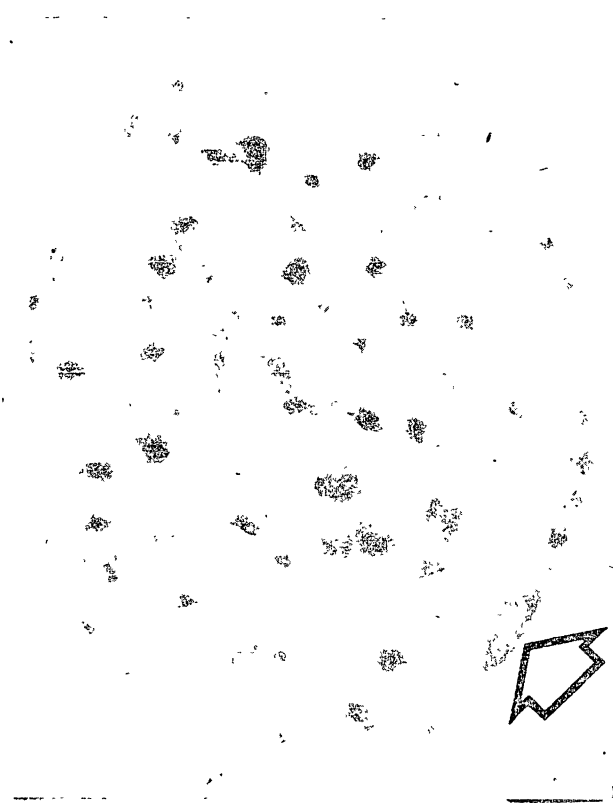


FIG. I.2 - Núcleo interfásico de célula do epitélio bucal feminino mostrando, o corpúsculo de Barr, justaposto à superfície interna da membrana nuclear.

Segundo Moore (1966), o termo "Cromatina sexual" foi pela primeira vez usado por Wilson, em 1925, para se referir a uma pequena e hipotética porção do cromossomo X que formava, presumivelmente, um "diferenciador sexual", relacionado à herança ligada ao sexo.

Presentemente, o termo "cromatina sexual" se refere a um corpúsculo de fácil visualização nos núcleos interfásicos das células somáticas (Fig.I.2).

Pode também, este corpúsculo cromatínico ser denominado de corpúsculo de Barr em honra de seu descobridor. Esta denominação, no entanto, não é muito utilizada por não ser informativa, nem descritiva. Outra nomenclatura empregada por Moore (1962) "Cromatina-X" é informativa e indicativa, havendo nela a omissão da palavra "sexo", o que nos parece importante em vários aspectos, mas é pouco usada.

Ocasionalmente ainda recebe a denominação de "cromatina sexual feminina", também inadequada por não ser característica deste sexo, pois, há seres normais do sexo masculino que apresentam a cromatina sexual com características semelhantes às da fêmea. No entanto, a nomenclatura mais utilizada é "cromatina sexual" para de marcar tais corpúsculos cromatínicos.

Nos leucócitos polimorfonucleares, a cromatina sexual está contida num apêndice nuclear (Fig. I.3), sendo constituída por uma dilatação ligada ao núcleo por um delgado filamento, sendo comumente denominada de baqueta ou "drumstick" em inglês.

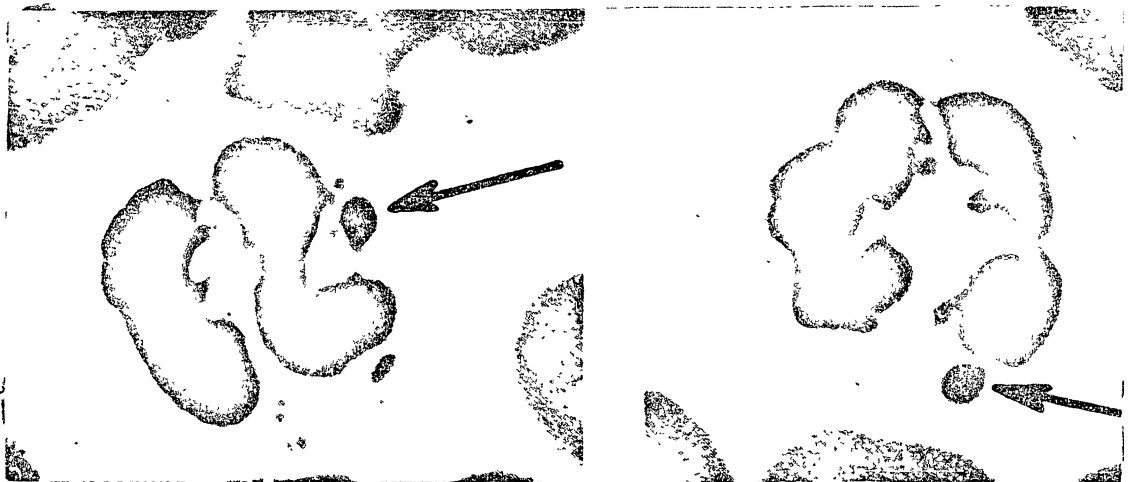


FIG. I.3 - Neutrófilos polimorfonucleares femininos mostrando baqueta. (May-Grünwald-Giemsa).

Para a morfologia do corpúsculo de Barr deve-se fazer uma separação, se em células vivas ou em células fixadas e coradas.

Muitos autores identificaram a cromatina sexual em células vivas (James, 1960; Klinger, 1957; Silva-Inzunza, 1957), mas, quem realmente fez descrições pormenorizadas foram DeMars (1962), e, principalmente, Schwarzacher (1963). Esses dois últimos autores notaram a

presença de corpúsculos intranucleares em células femininas e a ausência destes em células masculinas. Tais corpúsculos têm de $1\mu\text{m}$ a $2\mu\text{m}$ de diâmetro, aparecendo, algumas vezes, como um fio dobrado de $0,5\mu\text{m}$ a $1\mu\text{m}$ de espessura e de cerca de $3\mu\text{m}$ a $5\mu\text{m}$ de comprimento. Ambos autores voltaram a examinar as mesmas células após fixação e coloração e notaram que esta massa densa era Feulgen positiva, tendo agora características da cromatina sexual. Observou Schwarzacher que as massas claras, um tanto quanto difusas, após a fixação e coloração se tornavam nítidas, fato confirmado por Höslí (1963).

Tal verificação em células "*in vivo*" veio demonstrar que o corpúsculo da cromatina sexual não era artefato de técnica, mas sim, de existência real.

Células femininas, fixadas e coradas, revelam que o corpúsculo de Barr é plano-convexo, justaposto à superfície interna da membrana nuclear. No entanto, exames mais acurados, tanto em técnica, quanto em condições propícias, indicam ser a forma em "V" ou em "U", com o vértice voltado em direção ao centro do núcleo (Moore, 1966; Klinger, 1962). A membrana nuclear parece se moldar à parte aberta do "V" ou "U", sugerindo uma possível conexão entre ela e o corpúsculo da cromatina sexual.

Após estas, a forma mais frequente em estruturas fixadas é a bipartida, descrita pela primeira vez por Crouch e Barr (1953), a qual poderá ser uma forma alternativa do "V", na qual os seus braços se encontram separados. Nas células vivas esta forma se mostra a menos freqüente. Além disso, há formas em fios dobrados, lembrando as letras "S" e "W", menos freqüentes.

Quando não adjacente à membrana nuclear, a cromatina sexual é, na grande maioria das vezes, esférica, como podemos observar na figura II.1, descrita por Barr e Bertram em 1949. Mais acuradamente, e, em algumas preparações, nota-se que estas esferas podem ser separadas em duas porções ou em algumas lâminas justapostas.

Seu tamanho parece ser constante nas células diploides de mamíferos. Em vários tecidos sua medida é de cerca de $0,8\mu\text{m}$ a $1,1\mu\text{m}$ com uma variação de $0,7\mu\text{m} \times 1,00\mu\text{m}$ a $1,0\mu\text{m} \times 1,4\mu\text{m}$ (James, 1964; Moore e Barr, 1955). Fazem exceção a esta constância as espécies portadoras de cromossomos X de tamanho incomum. Núcleos masculinos também podem apresentar cromatina sexual, quando a espécie tiver o cromossomo Y grande, ou em espécies com determinação sexual devida a mecanismos diferentes do XX-XY.

Pode ser visualizada, como vimos, junto ao nucléolo,

como descreveram os seus descobridores (Fig. II.1), em neurônios, porém, mais comumente, é encontrada justaposta à membrana nuclear, internamente, sendo denominada de cromatina marginal ou periférica (Fig. I.2). Também pode ser encontrada livre no nucleoplasma, sendo denominada cromatina sexual central ou submarginal (Fig. II.1).

H I S T Ó R I C O

Apesar do histórico da cromatina sexual relatar sempre Barr e Bertram como seus descobridores, foi Cajal, em 1909, segundo Moore (1966), quem primeiro descreveu e desenhou uma massa paranucleolar em células do cão, do gato e do homem, que hoje, provavelmente, denominamos de cromatina sexual. Portanto, Barr e Bertram não descobriram, propriamente, o corpúsculo da cromatina sexual, e sim que estas massas paranucleolares estavam correlacionadas ao sexo, fato não verificado por Cajal e outros citologistas de sua época. Em 1939 e 1940, Barr publicou trabalhos sobre a morfologia da sinapse na corda espinal de gatos, com o propósito de verificar as mudanças nas sinapses após prolongada atividade, demonstrando seu interesse pela estrutura e função dos neurônios.

A IIª Guerra Mundial paralisou suas atividades de pesquisa, mas não o fez esquecer-se de suas idéias. Logo após a guerra retornou às mesmas, primeiramente na "McGill University" e, posteriormente, na "University of Western Ontario". Sem êxito, procurou por algum tempo um método para, controladamente, estudar o efeito da estimulação sobre os neurônios.

Ao realizar uma revisão bibliográfica sobre estimulação de axônios, fluíram-lhe várias idéias. Após diversos ensaios em nervos periféricos, que podiam ser estimulados unilateralmente, escolheu o hipoglosso, não só por sua acessibilidade até o ângulo da mandíbula, mas também, pelo núcleo hipoglossal (das células controle e experimental) estar lado a lado na medula oblonga.

Em 1947, E.G. Bertram, graduado em Ciências pela "University of Western Ontario" foi aceito para pós-graduação em Anatomia. Dr. Barr, juntamente com Bertram, começou a verificar as mudanças estruturais em células nervosas após intensa atividade. Montaram aparelhos e técnicas para estimular o hipoglosso. Cora-

vam o material com cresil-violeta com o qual obtinham excelente coloração nuclear.

Quando as primeiras secções nucleares do hipoglosso foram examinadas, o dimorfismo sexual, nos núcleos das células de mamíferos, foi verificado; Bertram notou que havia mudanças cromatolíticas no lado estimulado. Se estas alterações foram ocasionadas pela atividade do neurônio ou por uma forma moderada de reação do axônio, ou ambas as possibilidades, nunca foi determinado. Também, notou que os núcleos dos axônios estavam estumescidos e que havia uma discreta massa de cromatina (massa paranucleolare de Cajal) e uma diferença na sua posição entre núcleos de neurônios cromatolíticos e de neurônios controles.

Após estes dados preliminares, Barr e Bertram continuaram sua pesquisa. Foi medida a área do corpo celular e do núcleo do neurônio com auxílio de um planímetro. Verificou-se um pequeno aumento em ambas as áreas dos neurônios cromatolíticos. O tamanho do nucléolo e da massa paranucleolar foram calculados com ocular micrométrica. Notaram que o aumento do volume dos nucléolos das células experimentais coincidia com o restabelecimento da cromatólise.

Na massa paranucleolar de Cajal, notou-se também um aumento e, além disso, que ela se distanciava do nucléolo durante os últimos estágios da degeneração da substância de Nissl e nos primeiros estágios de restauração da mesma.

Intrigados com a aparente relação entre a massa paranucleolar e a restauração da substância de Nissl, decidiram delinear por menorizadamente o movimento da massa cromatínica em células alteradas de vários animais. Referiram-se à massa paranucleolar como "Satélite nucleolar" e registraram sua presença em grande número de células, tanto controles como experimentais.

Logo encontraram animais em que nos neurônios do hipoglosso não havia satélite nucleolar. Esta discrepância apresentava-se como verdadeiro mistério. Aventaram a hipótese de ter ocorrido uma falha na coloração. Tal não ocorrera, pois que os neurônios de ambas as espécies de animais haviam sido corados ao mesmo tempo e na mesma cuba de corante. Outras variáveis foram eliminadas, como diferença de fixação, condições experimentais, idade etc.

A investigação revelou que, todos os animais, cujos núcleos dos neurônios não contivessem satélite nucleolar, eram do sexo masculino.

Face à importância de tal descoberta, foi realizada u

ma intensa e extensa pesquisa em células nervosas (neurônios) de várias regiões, de vários machos e fêmeas de gatos. Tornou-se, desta maneira, óbvia a existência de um dimorfismo sexual em núcleos de células nervosas.

Passou-se daí à verificação da ocorrência de tal fato em neurônios humanos. Com permissão do Dr. Eric Linell, do Departamento de Patologia da Universidade de Toronto, e do Dr. Francis MacNaughton, do Instituto Neurológico de Montreal, Barr e Bertram estudaram seções de suas coleções neurológicas. Mesmo que essas não houvessem sido preparadas especificamente para o estudo de pormenores nucleares principalmente nas células ganglionares simpáticas, foi possível verificar um dimorfismo sexual comparável ao que havia sido verificado em gatos.

A primeira comunicação formal sobre o "satélite nucleolar" foi realizada pelo Dr. Barr no Congresso anual da "Royal Society of Canada" em Halifax, Nova Escócia, em maio de 1949. O trabalho foi apresentado pelo Dr. J.B. Collip, diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Western Ontario, naquela época. Ao mesmo tempo o clássico trabalho foi publicado na revista "Nature" (Londres) em 30 de abril de 1949, sob o título: "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nuclear satellite during accelerated nucleoprotein synthesis."

Ohno, Kaplan e Kinoshita (1959) num estudo em células profásicas de ratos, concluíram pela origem do corpúsculo da cromatina sexual ser de um único cromossomo X, posteriormente confirmada pelo uso da autoradiografia. Sabe-se também que indivíduos do sexo feminino com um cromossomo X deficiente apresentam um corpúsculo de cromatina sexual menor (Jacobs e cols., 1960 e 1961), e que mulheres com isocromossomo do braço longo do cromossomo X apresentam um corpúsculo de cromatina sexual maior do que o das portadoras de cromossomo X de tamanho normal (Fraccaro e cols., 1964), o que está de acordo com as conclusões de Ohno, Kaplan e Kinoshita (1959).



FIG. II.1 - Dimorfismo sexual em neurônios de gatos.

A-"Satélite nucleolar" adjacente ao nucléolo; B-Ausência do "Satélite nucleolar" em neurônios masculinos; C-"Satélite nucleolar" no nucleoplasma. A e C são células femininas. (Cortesia do Dr. M.L. Barr).

O R I G E M D A C R O M A T I N A S E X U A L

I - Heterocromatina e Eucromatina

Desde a demarcação por Henking, em 1891, (apud Moore, 1966), o cromossomo X tem sido um enigma, não só em Citogenética, mas também, na Genética de uma maneira geral, parecendo ter uma tendência de permacer condensado durante os períodos interfásicos e profásicos, enquanto com os autossomos tal não se verifica.

Montgomery, em 1904 e 1906, chamou a condensação precoce dos cromossomos do hemíptero Pyrrhocoris de heteropicnose, e Heitz, em 1928 e 1929, chamou as regiões que permanecem condensadas, formando, por conseguinte, cromocentros no núcleo interfásico de "heterocromatina"; e as regiões não condensadas, de "eucromatina" (apud Hamerton, 1971).

Feitz, em 1933, estudando o cromossomo X de Drosophila melanogaster, notou-o subdividido em duas porções: a porção proximal, incluindo o centrômero e a zona organizadora do nucléolo, sendo constituída de heterocromatina; e a porção distal, sendo constituída de eucromatina (apud Moore, 1966).

Na figura III.1, apresentamos, à esquerda, uma célula feminina, e à direita, uma masculina. As porções negras são heterocromáticas e as claras, eucromáticas. Nota-se também que a heterocromatina não está presente somente nos cromossomos sexuais, mas também, na região centromérica dos autossomos. Verifica-se também que, como já referimos, o cromossomo X é parcialmente heterocromático, enquanto o cromossomo Y é totalmente heterocromático. Como somente a porção heterocromática participa na formação dos cromocentros em núcleos interfásicos, pode-se notar que o cromocentro formado pelo cromossomo Y é maior do que o formado pelo cromossomo X, já que a porção heterocromática do X é menor que o cromossomo Y. Como ocorre o pareamento somático em Drosophila melanogaster, tanto em núcle

os masculinos quanto femininos, aparecem dois cromocentros grandes, lado a lado, junto ao nucléolo.

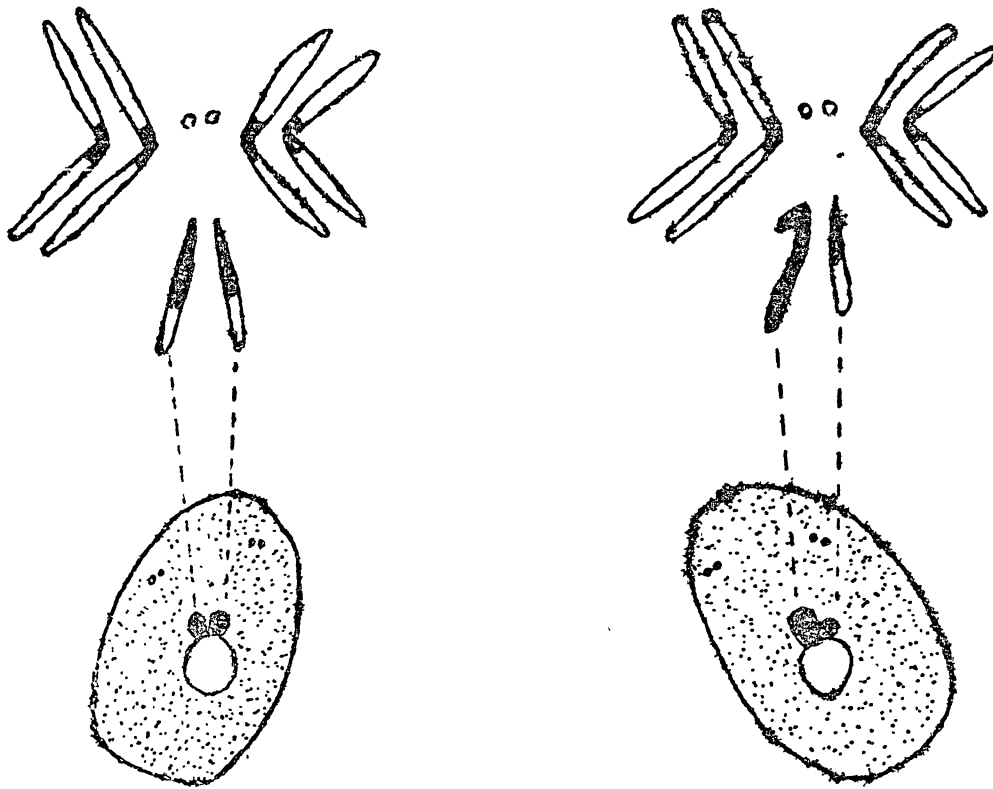


FIG. III.1- Diagrama da distribuição da eucromatina e da heterocromatina em D.melanogaster, segundo Heitz, em 1933 (Figura modificada).

Análises genéticas realizadas nesta espécie, através de Morgan, Miller, Stern e Sturtevant, entre outros, concluíram que as regiões heterocromáticas dos cromossomos X se apresentam vazias, sendo os genes ligados ao sexo encontrados, quase que totalmente, nas regiões eucromáticas (apud Moore, 1966).

Schultz, em 1947 e Hannah, em 1951, (segundo Pavan, 1966), admitiram que a heterocromatina teria funções genéticas, porém, diferentes das apresentadas pelas regiões eucromáticas. Para Mather, em 1943 e 1944, a heterocromatina seria composta por genes repetidos ou réplicas, que produzem efeitos similares, pequenos e complementares, diferentes do efeito mais nítido dos genes maiores, sendo os poligenes essenciais para uma ótima adaptação do indivíduo ao meio (apud de Robertis, Nowinski e Sáez, 1952).

A heterocromatina pode ser classificada em dois grupos, segundo Brown (1966):

a. Heterocromatina constitutiva: ocorre na

mesma porção dos dois cromossomos homólogos; exemplo: a heterocromatina dos cromossomos autossômicos bem como dos cromossomos sexuais de Drosophila melanogaster (Fig. III.1).

- b. Heterocromatina facultativa: ocorre somente em um dos dois cromossomos homólogos; exemplo: o cromossomo X inativo em heteropiconose positiva, formando o corpúsculo da cromatina sexual na espécie humana, (Fig. I.1 e I.2) bem como o grupo de cromossomos heterocromáticos, de origem paterna, nos machos do coccídeo Planococcus citri (Fig. III.2).

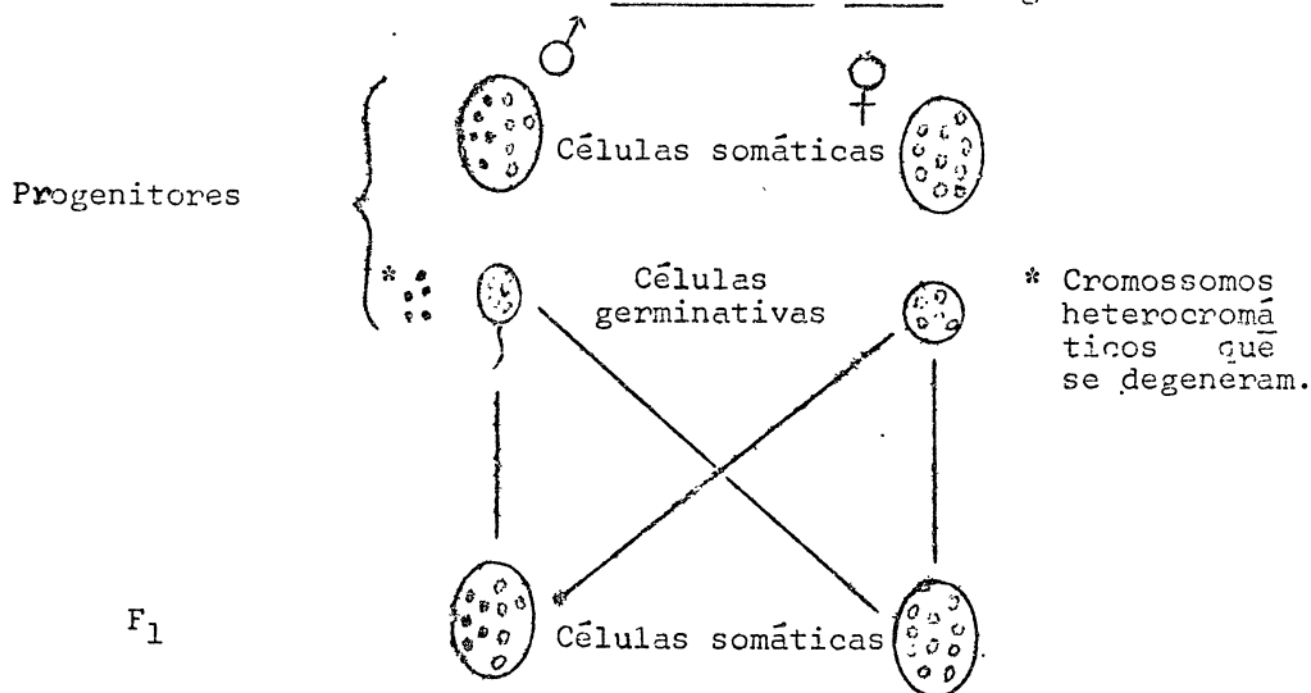


FIG. III.2 - Heterocromatina facultativa no coccídeo Planococcus citri.

No coccídeo Planococcus citri, o grupo de cromossomos paterno torna-se heterocromático nos machos, enquanto que, tanto o grupo paterno, quanto o materno, permanecem eucromáticos nas fêmeas. Durante a espermiogênese, o grupo paterno de cromossomos heterocromáticos se degenera. No homem, tanto o X materno, quanto o paterno, podem se tornar heterocromático, formando o corpúsculo da cromatina sexual nas células femininas.

A heterocromatina apresenta as seguintes características: condensação durante a interfase, geneticamente vazia, menor frequência de recombinação, desespiralização e replicação tardia de seu ADN.

Um dos problemas mais controvertidos e interessantes em organismos superiores, é o mecanismo pelo qual segmentos do genoma são geneticamente inativados. Segundo Comings (1967), Huang e Bonner, em 1962, e Barr e Beutler, em 1963, sugeriram que histonas reprimem a síntese do ARN dependente do ADN, e Allfrey, Littau e Mirsky (1963) e Littau e cols. (1965) sugeriram que histonas ricas ou moderadamente ricas em lisinas, ou em argininas, diferem na sua capacidade relativa de se unirem para formar ADN e para a inibição da síntese de ARN.

Destas observações, pode-se pensar que a atividade genética de um segmento de cromatina pode depender do tipo de histona com o qual está associado. Para testar isto, Comings (1967) fez eletroforese em gel de acrilamida de histonas ricas em lisina e moderadamente ricas em lisinas e em argininas. Criou três modelos: A) heterocromatina versus eucromatina; B) células metafásicas versus células interfásicas e C) linfócitos maduros versus linfócitos estimulados por fitohemaglutinina; nestes modelos, há uma diferença marcante em conteúdos de cromatina geneticamente ativa e geneticamente inativa. Em nenhum destes modelos houve uma diferença, nos padrões de histona, estatisticamente significativa. Comings concluiu que, embora as histonas possam atuar como um repressor generalizado, e ser componentes da cromatina, outros fatores, que não uma variação nos padrões histônicos, podem ser responsáveis pela repressão e derepressão de segmentos específicos do genoma.

II - Evidências de que o corpúsculo da cromatina sexual é formado por um único cromossomo X.

Quando da descrição por Barr e Bertram, em 1949, do corpúsculo da cromatina sexual, somente a fizeram como causadora de um dimorfismo sexual nos núcleos interfásicos dos mamíferos. Pela estrutura bipartida que às vezes apresenta o corpúsculo da cromatina sexual descrita por Klinger (1958), e segundo a teoria de Heitz, para cromossomos sexuais de Drosophila melanogaster, foi admitido ser o corpúsculo da cromatina sexual representado pela junção das regiões heterocromáticas de dois cromossomos X, sendo que, nas células somáticas masculinas haveria um corpúsculo cromatínico, cujo ta

manho seria a metade do corpúsculo cromatínico das células femininas, uma vez que nas células somáticas masculinas normais, de mamíferos, há somente um cromossomo X, enquanto, nas células femininas normais há dois. Esta noção de corpúsculo cromatínico masculino com a metade do tamanho em relação ao feminino foi facilmente eliminada pelo uso de métodos e técnicas laboratoriais mais refinadas.

Junker, em 1923 (apud Ohno, 1966), verificou que o conceito de "uma vez heterocromatina, sempre heterocromatina" não se aplicava aos cromossomos X de vários insetos, pois, em hermafroditas de Perla marginata ($2n = 22$) com X_1X_20 , na porção testicular do ovotestis, o X_1 e o X_2 aparecem heterocromáticos ao longo do seu comprimento total, em espermátocitos primários, bem como em todas as fases da prófase I da meiose, enquanto que se desenvolvem eucromaticamente os mesmos X_1 e X_2 na porção ovariana.

Há três tipos de evidências de ser um único cromossomo X que participa na formação do corpúsculo da cromatina sexual:

- 1º Evidências citológicas em núcleos profásicos e interfásicos.
- 2º Evidências autoradiográficas.
- 3º Evidências citológicas em indivíduos com múltiplos cromossomos sexuais.

1º Evidências citológicas em núcleos profásicos e interfásicos.

Ohno, Kaplan e Kinoshita (1959), observando núcleos interfásicos de ambos os sexos de Rattus norvegicus, verificaram a presença na fêmea e a ausência no macho, de um cromocentro. Na fêmea, havia um cromocentro em núcleos aparentemente diplóides e dois corpúsculos heteropicnóticos em núcleos aparentemente tetraplóides. Em machos, diplóides ou tetraplóides, não se visualizava este cromocentro.

Na figura III.3, observam-se os núcleos "a" de ratos machos; os "b" de fêmeas diplóides e os "c" de fêmeas tetraplóides. Os núcleos da fila 1 estão em interfase; da fila 2 em início de prófase; da fila 3, em estágio mais adiantado de prófase e os da fila 4, em metáfase. Observa-se na coluna "a", a inexistência de um cromocentro nas figuras 1a, 2a e 3a; na metáfase 4a, os cromossomos X e Y estão demarcados. Na figura 1b, um cromocentro aparece bem distinto. Nas figuras 2b e 2c, vêem-se um cromossomo heteropicnótico condensado ao longo do seu comprimento total, e, na placa metafásica da figura 4b, dois cromossomos X acrocêntricos. Na figura 1c, constata-se a presença de dois cromocentros em núcleos interfásicos; nas figuras 2c e 3c,

dois cromossomos heteropicnóticos, e na figura 4c, quatro cromossomos X acrocêntricos estão demarcados.

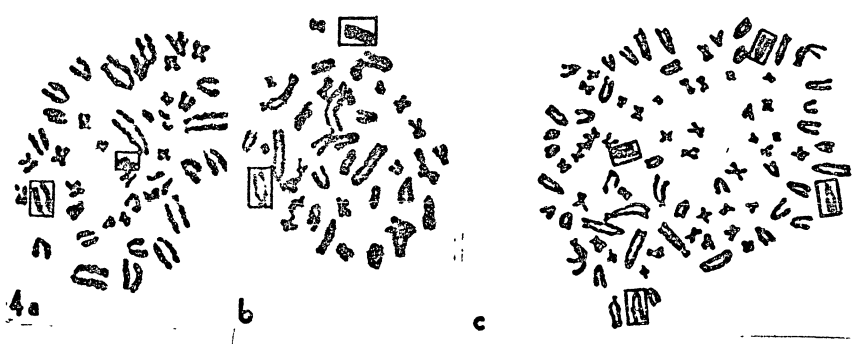
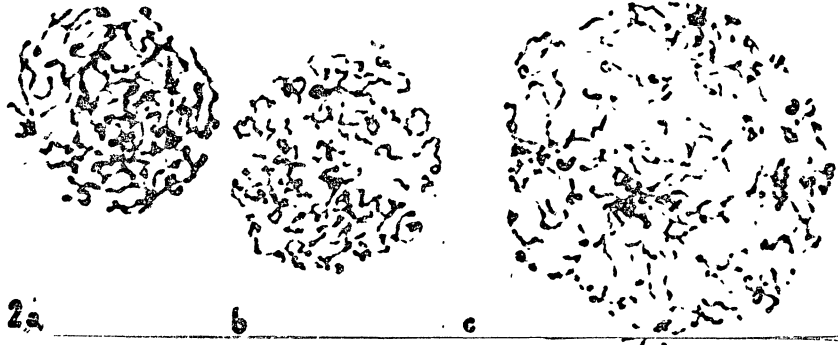
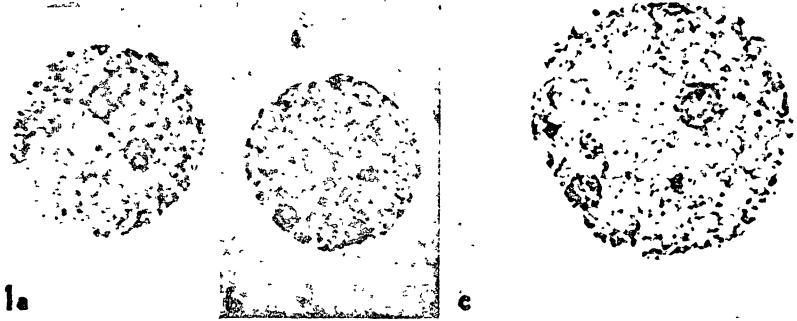
Segundo Hamerton (1971), Ohno e cols., em 1959 e 1960, sugeriram que a heteropicnose positiva do cromossomo X depende de sua origem, se materno ou paterno. Desde que a fêmea tem dois X, um materno e outro paterno, enquanto, o macho, um X de origem materna, o X heteropicnótico poderia ser o paterno, mas, mesmo antes da rejeição desta hipótese, Ohno e Hauschka (1960) sugeriram que mais provavelmente a heteropicnose se alternaria entre os dois X, dependendo da atividade celular. Stewart, em 1960, segundo Hamerton (1971), sugeriu que nos núcleos interfásicos, somente um X seria necessário, para o metabolismo e a fisiologia celular, em isopicnose, tal como um autossomo. Qualquer cromossomo X adicional seria supérfluo para o metabolismo; funcionalmente inerte; condensando-se, portanto corável; estando, usualmente, como um corpúsculo aderido à membrana nuclear.

Ohno e Makino (1961), estudando fetos humanos do quarto mês de gestação, aproximadamente, mostravam, pela primeira vez, na espécie humana, que o corpúsculo da cromatina sexual em núcleos interfásicos femininos seria provavelmente formado por um único cromossomo X condensado.

29 Evidências autoradiográficas.

A síntese de ADN na interfase pode ser estudada pela marcação de células com precursores radioativos de ADN, sendo mais usada a que é feita com timidina tritiada, seguida de autoradiografia. Isto, se possível, porque há pouco ou nenhum "turnover" de ADN na célula. A assincronia na síntese de ADN entre os diferentes cromossomos é comum em várias espécies. Taylor, em 1960, segundo Hamerton (1971), foi quem fez a primeira indicação de que um dos dois cromossomos X em fêmeas de mamíferos diferencia-se dos autossomos em relação à síntese de ADN. Notou uma diferença no padrão de marcação entre os dois X homólogos. Um mostra um padrão de síntese semelhante ao X das células masculinas, enquanto a replicação do outro X ocorre na última metade do período S. A replicação do X marcado e do braço longo do outro X continua após a replicação autossômica estar realizada (Fig. III.5).

Gilbert e cols., em 1962, estudaram a síntese de ADN em culturas, marcadas por timidina no fim do período S, de linfócitos de mulheres normais, e mostraram que um cromossomo completava a replicação muito tempo após os outros. A identificação deste cromos



somo com síntese de ADN tardia como um X, foi obtida em pacientes com aberrações numéricas do cromossomo X por Morishima e cols., em 1962, Rowley e cols., em 1963, Gianelli, em 1963, Atkin e Gustavson, em 1964, Muldal e Gustavson, em 1964, e Muldal e cols., em 1963, bem como, em pacientes com aberrações estruturais dos cromossomos X (deleções e isocromossomos) (apud Hamerton, 1971).

FIG. III.3 - Interfase, prófase e metáfase de células de Rattus norvegicus.

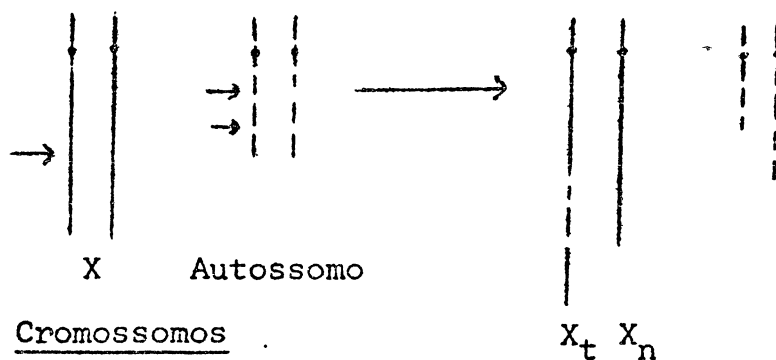
OBS.: Cortesia do Dr. S. Ohno.

Segundo Hamerton (1971), Ohno e Cattanach, em 1962, estudaram o desenvolvimento de uma translocação não recíproca autossomo-X no camundongo, sendo que cerca de um terço do autossomo que re

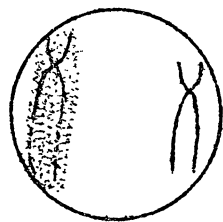
presenta o grupo I de ligação era inserido no cromossomo X de tal forma que o X translocado (X_t) era aproximadamente 20% maior do que o normal. Demonstraram que o segmento cromossômico inserido comportava-se como parte integrante do X, manifestando heteropicnose positiva quando o X assumia esta condição (Fig. III.4).

Cattanach, em 1961, havia mostrado que o segmento translocado incluía os loci "pink eye" e "chinchilla", e que, os camundongos de constituição cromossômica X_tX_n , heterozigotos para os caracteres acima, mostravam variações na cor da pelagem. Ohno e Cattanach (1962) demonstraram que nas regiões da pele em que havia fenótipo variado, as células continham o X_t condensado, enquanto onde aparecia o tipo de coloração selvagem, o X_t se apresentava em isopicnose e o X_n heteropicnótico. Portanto, pode-se postular a origem do corpúsculo da cromatina sexual através de um único cromossomo X (segundo Hamerton, 1971).

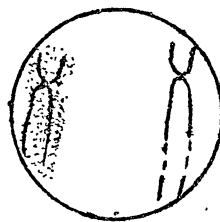
Nota-se, portanto, uma nítida relação entre o número de corpúsculos de Barr e o número de cromossomos X com replicação tardia.



. Células somáticas femininas



X_t heteropicnótico



X_n heteropicnótico

FIG. III.4 - Esquema da translocação não recíproca autossomo-X no camundongo.

3º Evidências clínicas.

Em indivíduos portadores de aneuploidias dos cromossomos X, a relação entre o número de cromossomos X presentes (B) e o número de corpúsculos de cromatina sexual (p) é: $p = (B - 1)$, isto

é, o número de corpúsculos de Barr é sempre menor em uma unidade do que o número de cromossomos X presentes; há portanto, uma nítida relação entre o número de cromossomos X e o de corpúsculos de Barr.



FIG. III.5 - Cromossomos metafásicos de mulheres, com inclusão de timidina tritiada e uso de autoradiografia. Admite-se que o cromossomo com replicação tardia, indicado pela seta, seja um dos cromossomos X.

Cortesia do Dr. S. Muldal.

Em indivíduos 47/XXX ou 48/XXX^Y, o número máximo de corpúsculos de Barr é dois; em um com 48/XXXX ou 49/XXXX^Y, há três; em um com 46/XX ou 47/XX^Y, há somente um; em um com 45/X0 ou 46/XY ou 46/XYY, a cromatina sexual é negativa.

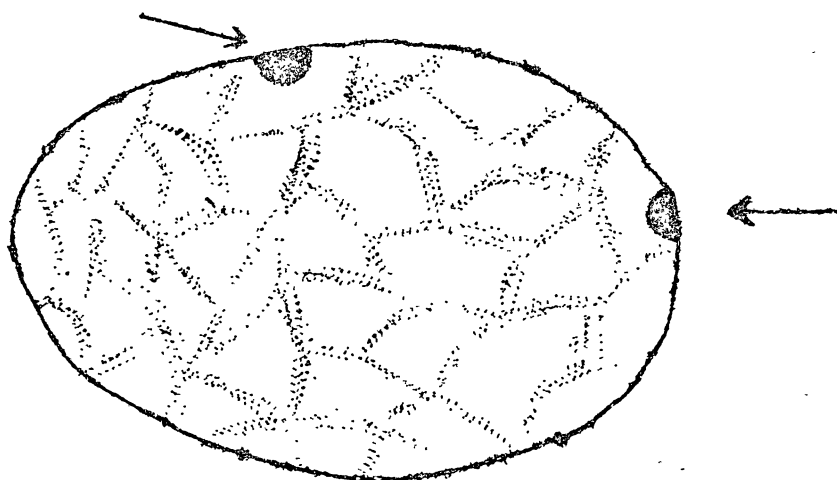


FIG. III.6 - Núcleo interfásico feminino com constituição cromossômica 47/XXX, onde se notam, claramente, dois corpúsculos de cromatina sexual.

Portanto, tanto em citologia de núcleos profásicos e interfásicos, como em autoradiografia e estudos de aneuploidias e aberrações estruturais dos cromossomos X, evidencia-se a origem do corpúsculo da cromatina sexual, a partir de um único cromossomo X em heteropiconose positiva.

DESENVOLVIMENTO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS EM CÉLULAS GERMINATIVAS

De acordo com Ohno, em 1958, em espermatócitos, o cromossomo X inteiro, bem como o Y, aparece excessivamente condensado do leptóteno até o final da meiose II (segundo Ohno, 1964_b), porém, em oócitos, tal não se verifica, permanecendo os dois cromossomos X alongados e não condensados, tal como os autossomos (Ohno e colaboradores 1961), (Fig. III.7).



FIG. III.7 - Cromossomos meióticos de Chinchilla laniger
Cortesia do Dr. S. Ohno

Na figura III.7-A aparece a forma assumida pelo bivalente XY, onde há clara heteropiconose positiva. Na figura III.7-B, a forma assumida pelo bivalente XX é quase completamente semelhante a dos bivalentes autossômicos.

Melander, em 1963, e Hansen-Melander e Melander, em 1963, acham que a condensação precoce do bivalente XY na meiose, com pareamento ponta a ponta, parece apresentar duas razões diferentes (apud Hamerton, 1971):

1º Nas células germinativas das gônadas do sexo heterogamético, o único X desenvolve uma adaptação evolucionária protegendo-se, então, de possíveis trocas gênicas. Esta proteção temporária seria dada pela heteropiconose positiva do bivalente XY;

2º Em células somáticas femininas, a heteropícnose de um X ou do Z, persiste por várias gerações celulares, sendo o resultado da inativação por ocasião da separação entre a linhagem germinativa e a somática.

Para Ohno (1964_b), a condensação precoce dos cromossomos sexuais, durante toda a meiose em células germinativas masculinas aparece para preconcluir o pareamento entre o X e o Y. Se quiasmas o corressem entre o X e o Y, a permuta genética poderia ser desastrosa pa ra o mecanismo de determinação sexual.

	Células germinativas		Células somáticas
	Mitose	Meiose	
♂			
♀			

FIG. III.8 - Padrão de desenvolvimento dos cromossomos sexuais, na porção germinativa e somática do macho e fêmea em mamíferos. (Seg. Ohno, 1964).

Na Figura III.8 a porção clara representa a eucromatina, enquanto a heterocromatina é representada em negro. O cromossomo Y permanece heterocromático. O X masculino somente na meiose se apresenta heterocromático. Um único cromossomo X, no sexo feminino, se apresenta heterocromático nas células somáticas.

ÉPOCA EM QUE, PELA PRIMEIRA VEZ, APARECE O CORPÚSCULO DA CROMATINA SEXUAL.

Estudos sobre o corpúsculo de Barr em embriões de mamíferos, em vários estágios de gestação, têm mostrado que núcleos femininos se tornam cromatino-sexual positivos ao se iniciar a diferenciação somática.

Austin e Amoroso (1957) selecionaram, entre 311 em briões de gatos, 70 cujo estágio variava desde duas células até o vi gésimo dia de gestação.

Encontraram:

- a. três embriões cujo estágio de desenvolvimento era anterior ao de mórula; em nenhum deles foi verificada a presença do corpúsculo da cromatina sexual.
- b. Vinte e seis embriões em estágio de mórula; nenhum era cromatino-sexual positivo.
- c. Doze blastócitos (6º - 14º dia de gestação), em que somente um blastócito, em estágio tardio, exibia o corpúsculo da cromatina sexual.
- d. Vinte e nove embriões implantados (15º ao 20º dia de gestação), 15 dos quais apresentavam o corpúsculo da cromatina sexual na maioria das células e 14 não os apresentavam.

TAB.III.1 - Idade do aparecimento do corpúsculo da cromatina sexual em embriões de gatos, segundo Austin e Amoroso (1957).

Número de Embriões	Estágio de desenvolvimento	Cromatina sexual	
		Positiva	Negativa
3	antes de mórula	-	3
26	mórula	-	26
12	blastócitos	1	11
29	implantados	15	14
70		16	54

Park (1957), fazendo um estudo em 33 embriões humanos e em 18 embriões de macacos, obteve resultados muito semelhantes aos de Austin e Amoroso. No caso de embriões humanos, aparece pela primeira vez o corpúsculo da cromatina sexual em trofoblastos no 12º dia de gestação, e, no embrião propriamente dito, no 16º dia de gestação. Em macacos, aparece no 10º dia em trofoblastos, e, no 19º dia de gestação, no embrião. Nunca, antes deste período, Park verificou o corpúsculo. Portanto, aparece primeiramente o corpúsculo de Barr em trofoblastos e mesoderma coriônica (10º e 12º dia) e, posteriormente, no embrião propriamente dito (19º e 16º dia).

Glenister (1956) examinou 22 embriões do sexo masculini

no e 12 embriões femininos, cujo comprimento variava entre 18 e 150 mm, da espécie humana. Entre os femininos, a frequência de núcleos cromatino-positivos encontrava-se entre 30% e 50%, enquanto que, nos masculinos, nunca a frequência foi superior a 10%. Encontrou também, em células do sinciciotrofoblasto, de um blastócito implantado, corpúsculo de cromatina sexual.

Axelson (1968), analisando 48 embriões de porcos, observou que o primeiro aparecimento do corpúsculo da cromatina sexual ocorria em blástulas de 45 células. Nenhum corpúsculo de Barr foi observado em 24 embriões com 4 a 20 células. A autora não obteve, no entanto, nenhum embrião com um número de 21 a 44 células.

TAB. III.2 - Idade do aparecimento do corpúsculo da cromatina sexual em embriões de porcos, segundo Axelson (1968)

Número de embriões	Número de células	Cromatina sexual	
		Positiva	Negativa
24	4 a 20	-	24
24	45 a 900	11	13
48		11	37

Ohno (1964_b) fez observações sobre o aparecimento do corpúsculo de Barr em embriões de camundongos, ratos e hamsters. Todos os embriões implantados, com constituição cromossômica XX, invariavelmente, continham um X condensado no início da prófase, bem como no núcleo telofásico.

Melander (1962) estudando, em coelhos, o aparecimento do corpúsculo da cromatina sexual, notou que começa a se evidenciar em alguns núcleos interfásicos de embriões, com aproximadamente 400 células e se desenvolve no 5º dia da embriogênese em mais de 90% das células interfásicas (Fig. III.9). A linha contínua indica a relação entre o grau de desenvolvimento e a percentagem de células interfásicas com cromatina sexual em 25 embriões. O corpúsculo da cromatina sexual começa a se evidenciar quando o embrião está composto de aproximadamente 400 células. No 5º dia de gestação, aumenta consideravelmente a frequência de núcleos cromatino-positivos, atingindo mais de 90% das células, pouco antes da implantação do embrião. A linha tracejada mostra a frequência de anáfases com tensão cromática durante o período de formação da cromatina sexual, a

qual aumenta até um máximo, quando o embrião está composto de aproximadamente 600 a 1000 células e decresce até zero, imediatamente antes da implantação do embrião (Dados de Melander, 1962).

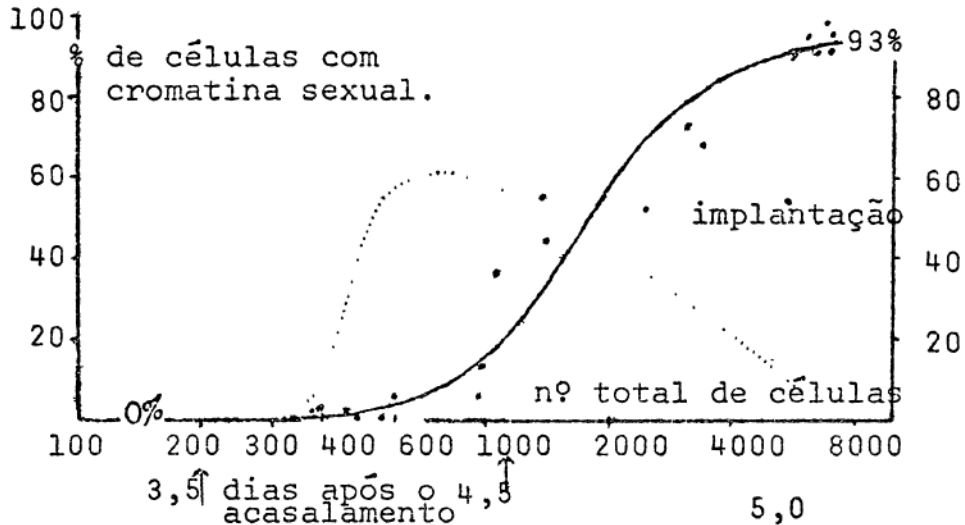


FIG. III.9 - Cromatina sexual em embriões de coelhos, segundo Melander (1962).

Portanto, aparentemente, o zigoto XX de mamíferos começa seu desenvolvimento com ambos os cromossomos X eucromáticos, para, na época da implantação um X permanecer eucromático e o outro, adquirir heteroploidose positiva.

PROPORÇÃO X-AUTOSSOMOS

Apesar da grande variação no número diplóide entre mamíferos placentários, a massa total de material cromossômico aí contido parece ser a mesma, bem como o desenvolvimento padrão do cromossomo X, de qualquer forma ou tamanho, é tal que, se condensado, todas as espécies contêm a mesma proporção de material eucromático no cromossomo X em relação aos autossomos (Ohno, Beçak e Beçak, 1964_a).

Estes autores determinaram a área total dos cromossomos (μ^2), a área do cromossomo X (μ^2) e a relação entre o X e o conjunto haplóide (X:AX) (Tabela III.3). Classificaram, de acordo com estes dados, o cromossomo X em três categorias:

- X tipo original, cuja relação X:AX é de aproximadamente 5%. Encontrado no homem, gato, cachorro, burro e gado, sendo que em cada núcleo de célula somática do

macho ou fêmea, há um cromossomo X em isopicnose (Fig. III.10).

b. X tipo duplicado, cuja relação X:AX é de aproximadamente 10%; encontrado no hamster.

Em 1962, Saksela e Moorhead, usando um fixador especial, sugeriram que, na fêmea do hamster, além de um X inteiro, há mais um braço do outro cromossomo X também condensado. No macho há um braço do X que também manifesta heteropicnose positiva. O X do hamster é duas vezes maior que o do tipo original, mas a quantidade de material eucromático presente no hamster, tanto no macho quanto na fêmea, bem como nas espécies com o X do tipo original é aproximadamente a mesma. Isto pode ser explicado porque, na fêmea do hamster, aparece um corpúsculo cromatínico maior e um menor, e no macho, um único cujo tamanho se iguala ao menor da fêmea, sendo originado pela heteropicnose positiva do cromossomo X (Seg. Ogno, Beçak e Beçak, 1964_a).

TAF. III.3 - Proporção X-autossomos em várias espécies de mamíferos, segundo Ohno, Beçak e Beçak, 1964_a.

Espécie	nº diplóide		Área total (μ^2)	X (μ^2)	X:AX (%)
Homem	(2n=46)	<u>Homo sapiens</u>	158,35	4,77	5,98
Bovino	(2n=60)	<u>Bos taurus</u>	165,73	4,65	5,60
Mula	(2n=63)	Híbrido	153,23	5,07 cavalo 4,17 burro	6,53 5,41
Gato	(2n=38)	<u>Felis domestica</u>	149,46	3,75	5,10
Cachorro	(2n=78)	<u>Canis familiaris</u>	160,36	4,11	5,07
Camundongo	(2n=40)	<u>Mus musculus</u>	145,14	4,56	6,45
Hamster	(2n=44)	<u>Mesocricetus auratus</u>	158,31	8,33	10,44
Rato	(2n=17/18)	<u>Microtus oregoni</u>	152,28	12,70	15,71

c. X tipo triplicado, cuja relação X:AX é de aproximadamente 15%; encontrado no Microtus oregoni. Núcleos interfásicos somáticos de ambos os sexos têm grandes cromocentros adjacentes à membrana nuclear. Desde que esta massa é quase que o cromossomo X

inteiro condensado, aproximadamente 2/3 do cromossomo X nas células somáticas de ambos os sexos apresentam-se em heteropiconose positiva, mantendo-se, desta maneira, proporção aproximadamente igual de material eucromático entre os sexos, bem como entre espécies com X do tipo original, duplicado e triplicado.

d. X tipo quadruplicado. Posteriormente, no Microtus agrestis, encontrou-se um cromossomo X que era aproximadamente 4 vezes maior do que o X do tipo original. Pela maneira com que se condensa nos núcleos interfásicos, mantém a relação aproximadamente igual de material eucromático para um conjunto diplóide de cromossomos.

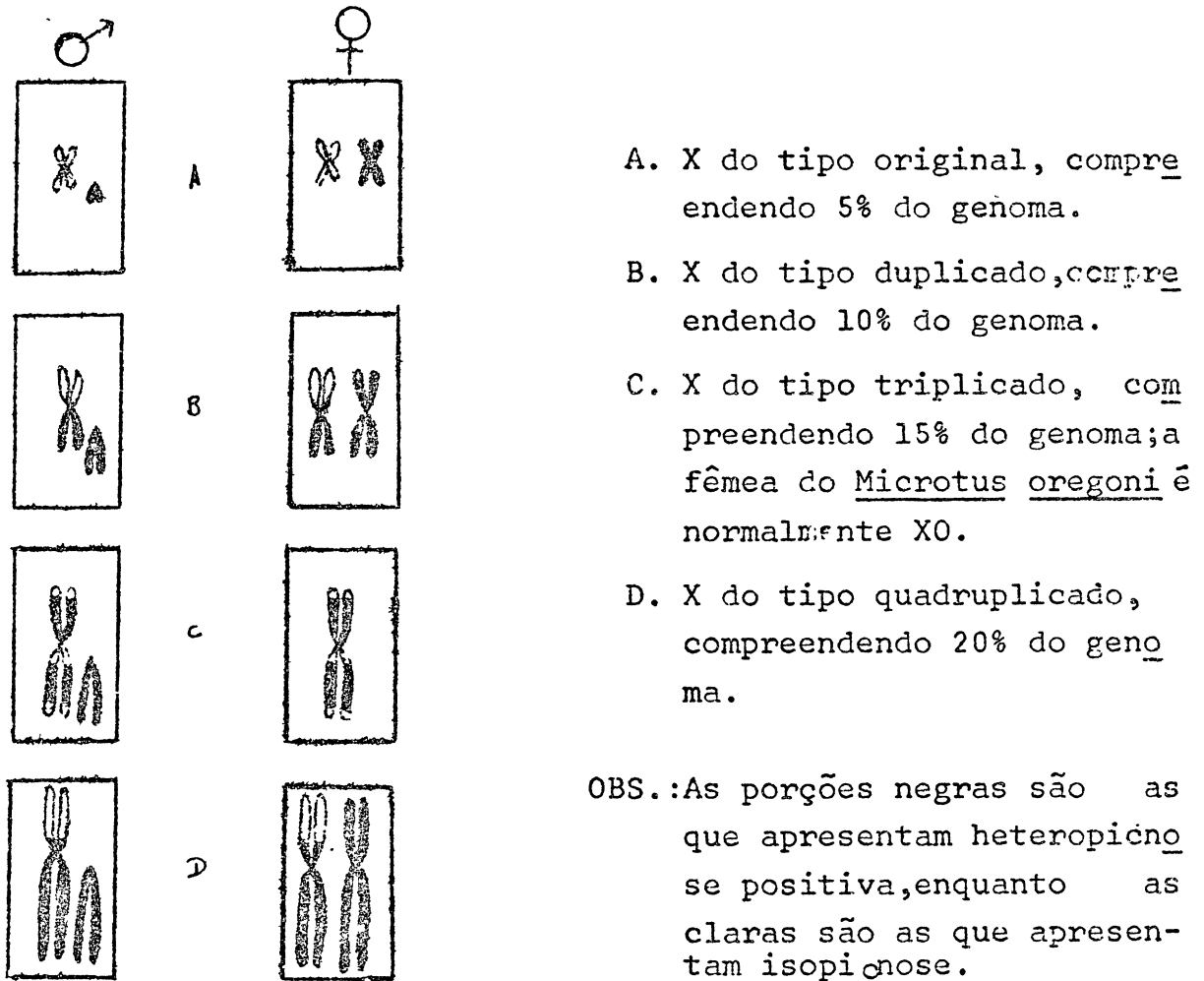


FIG. III.10 - Heteropiconose positiva, dos cromossomos sexuais, em várias espécies de animais.

Na figura III.10, nota-se o cromossomo Y em heteropiconose positiva.

Em estudos com indivíduos aneuplóides, tais como X0, XXY, XXX e XXXY, mostrou-se que os autossomos exercem algum contro-

le sobre o desenvolvimento individual de um X. Este controle autossômico parece realizar-se, no entanto, apenas e tão somente na época da implantação do embrião, quando a decisão para que um se torne isopícnótico e o outro heteropícnótico é realizada. Uma vez decidida, esta característica, torna-se fixa e irreversível (Ohno e cols., 1964_b).

Atkin, segundo Ohno e cols. (1964_b), realizou estudos exaustivos em tumores humanos aneuplóides, no sexo masculino, notando que, quando estes tumores não eram hiperplóides ou hipotetraplóides, os cromossomos X nunca formavam corpúsculos de cromatina sexual. Uma vez que o cromossomo X nas células somáticas de embriões masculinos normais permanece sempre eucromático, todos os cromossomos X nas células de tumores em homens com 2A+XXX_Y são incapazes de formar um corpúsculo de cromatina sexual, pois que se originaram de um único X isopícnótico. Este fato mostra claramente que o controle autossômico é, em parte, responsável pela diferenciação entre os cromossomos X.

Pode-se calcular o número máximo de corpúsculos de cromatina sexual pela fórmula de Harnden (1961) (apud Beiguelmann, 1967)

$$B = X - \frac{P}{2}, \text{ onde}$$

B = número de corpúsculo de cromatina sexual,

X = número de cromossomos X presentes,

P = grau de ploidia.

Entretanto, esta fórmula não poderá ser utilizada quando o grau de ploidia for ímpar, pois que, em indivíduos triplóides XXY, deveria ser esperado meio corpúsculo de cromatina sexual, o que não ocorre.

Outra fórmula apresentada por Stewart e Sanderson (1961), para calcular a frequência de núcleos com um ou mais corpúsculos de cromatina sexual, em pessoas com cariótipo anormal, é:

$$1 = n^P + (1 - n)^{x-1},$$

onde n = proporção de núcleos cromatino-positivos (P),
(1 - n) = proporção de núcleos cromatino-negativos, x = número de cromossomos X presentes.

P A D R Õ E S D E C R O M A T I N A S E X U A L
E M A N I M A I S

A variação nos padrões cromatínicos, nos diversos animais, resulta sempre da expressão diferente de um mesmo fenômeno, a heteropicnose.

Em células humanas, o dimorfismo sexual nuclear, baseado no corpúsculo da cromatina sexual, foi e continua sendo intensa e extensivamente estudado, pois constitui a base para testes clínicos, importantes na ajuda do diagnóstico do desenvolvimento sexual. Este dimorfismo ocasionado pelo corpúsculo de Barr é semelhante em muitas espécies de animais, porém há variações nos padrões cromatínicos entre células de um mesmo indivíduo, de uma espécie para outra etc.

O corpúsculo da cromatina sexual descoberto por Barr e Bertram (1949), e demonstrado ser derivado de um único cromossomo X por Ohno, Kaplan e Kinosita (1959_a), é, muitas vezes, maior do que as massas cromatínicas originadas de autossomos.

Se, num núcleo, a cromatina autossômica está virtualmente ausente, como em muitos neurônios (Fig.II.1), ou delgada, como na mucosa bucal (Fig. I.2), o corpúsculo da cromatina sexual aparece nitidamente. A estes núcleos, Moore (1966) denominou "vesiculares". (Fig.IV.1). Porém, o inverso pode ocorrer, isto é, a cromatina autossômica ser grosseira, bastante condensada, como, por exemplo, nas porções contornadas dos túbulos renais e no fígado humano, dificultando em muito, quando não, tornando impossível a identificação do corpúsculo que se origina do cromossomo X.

Nas figuras IV.1-A (neurônio) e IV.1-B (célula da mucosa bucal), aparecem os núcleos vesiculares, onde se nota claramente o corpúsculo da cromatina sexual. Em IV.1-C (células foliculares do ovário de jaritataca) e IV.1-D (células do lobo anterior da pituitária de tatu), aparecem núcleos onde a cromatina autossômica está condensada e dificulta, em muito, a verificação do corpúsculo de Barr. Em IV.1-E (célula de fígado humano), com núcleos picnóticos, onde o alto grau de condensação cromatínica torna impossível o reconhecimento

to do corpúsculo da cromatina sexual.

Portanto, o dimorfismo sexual nuclear é claro em núcleos vesiculares, é difícil de ser observado em núcleos com cromatina condensada e não é reconhecível em núcleos picnóticos ou naqueles com muitos cromocentros grandes.

O dimorfismo sexual, baseado no corpúsculo da cromatina-X em núcleos interfásicos, foi intensamente revisto por Moore em 1966.

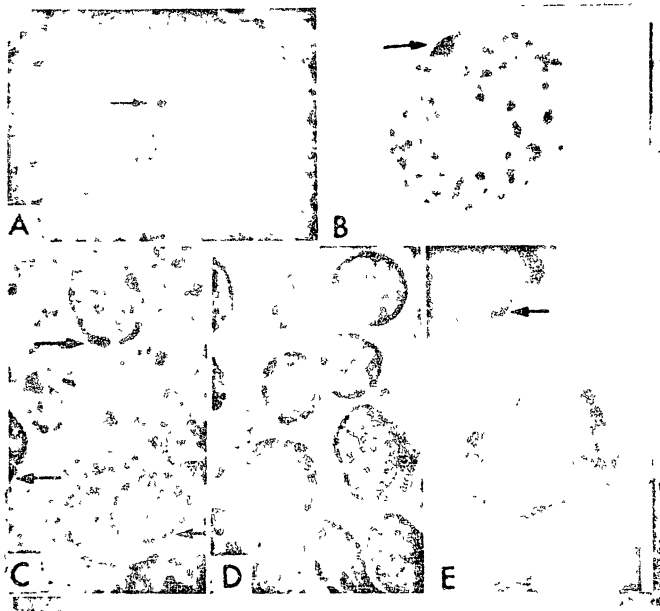


FIG. IV.1 - Núcleos celulares de vários animais
OBS.: Cortesia do Dr. K.L. Moore.

PADRÕES CROMATÍNICOS

I - EM PRIMATAS

a. Na Espécie Humana

O dimorfismo sexual nuclear na espécie humana foi observado em, praticamente, todas as células, com exceção das que apresentam núcleos picnóticos (Fig. IV.1-E).

Nos núcleos das células do córtex da adrenal, das cartilagens, da camada de Malpighi, na epiderme, dos neurônios, da mucosa bucal e dos músculos lisos, existem boas condições para a determinação do dimorfismo sexual nuclear.

b. Em Símios

b.1 Macacos (gorilas, gibões, chipanzés, orangotangos).

Klinger (1963) e Hamerton e cols. (1961 e 1963), (seg. Moore, 1966), estudaram padrões cromatínicos em esfregaços de células

da mucosa bucal e em cultura de pele de várias espécies de macacos, demonstrando a existência de um dimorfismo sexual nuclear semelhante ao encontrado na espécie humana. Em gorilas (Gorilla gorilla gorilla), 42% dos núcleos das células do epitélio bucal apresentavam o corpúsculo da cromatina sexual, enquanto que, em 4% dos núcleos masculinos, aparecia um corpúsculo algo semelhante ao das células femininas, porém de tamanho menor. A cromatina autossômica, de uma maneira geral, é mais grosseira do que na espécie humana.

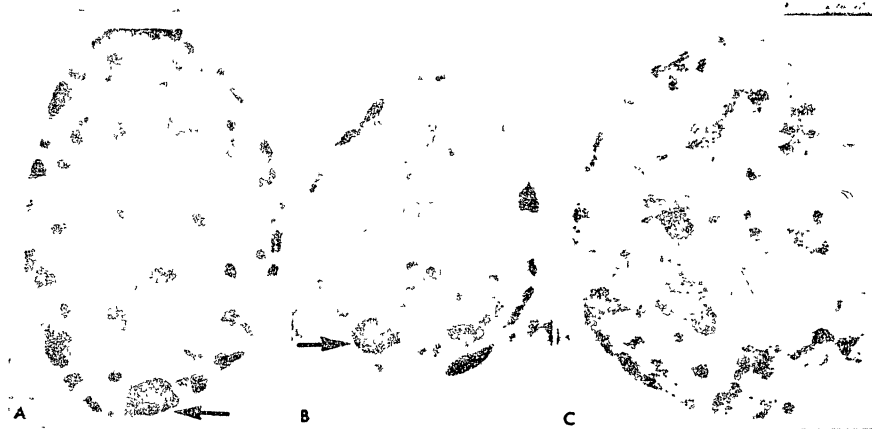


FIG. IV.2 - Células do epitélio bucal de gorilas.

OBS.: Cortesia do DR. K.L.Moore.

Nas células femininas A e B, da figura IV.2, observa-se o corpúsculo da cromatina sexual aderido à membrana nuclear. C é uma célula masculina.

b.2 - Macaco Rhesus

Prince, em 1952 e 1955, descreveu uma diferença sexual em padrões cromatínicos em células nervosas de várias regiões do cérebro e da corda espinal, bem como em vários outros tecidos desta espécie (apud Moore, 1966).

b.3 - Em macacos platirrinos

Beath e Benirschke (1962) estudaram tecidos de 31 macacos platirrinos. Um corpúsculo de cromatina sexual típico, análogo ao dos outros primatas, foi encontrado nas fêmeas de todos os animais. O tamanho, posição, frequência, número e aspecto das massas cromatínicas são muito semelhantes aos dos tecidos humanos.

II - EM CARNÍVOROS

Um dimorfismo sexual nuclear, comparável ao dos primatas, se verifica em células dos carnívoros abaixo:

1. Urso Preto (Euarctos americanus)

2. Gato (Felis domestica)
3. Coiote (Canis latrans)
4. Cachorro (Canis familiaris)
5. Raposa (Vulpes fulvus)
6. Leão (Felis leo)
7. Minque (Mustela vison)
8. Jaritataca americana (Mephitis mephitis)
9. Lobo cinzento (Canis nubilis)
10. Furão (Mustela putorius furo)
11. Mão pelada americano (Procyon lotor)
12. Marta (Martes americana)

Com exceção do mão pelada americano (Procyon lotor), do furão (Mustela putorius furo) e da marta (Martes americana), vários tecidos mostram dimorfismo sexual nuclear em todos os animais estudados. Destes três, só foram examinadas células do tecido nervoso (Moore, 1966).

Os neurônios de carnívoros são mais vesiculares e menos abundantes em cromatina autossômica do que os de primatas, o que facilita a verificação da diferença sexual na morfologia nuclear neste grupo de animais.

Hay e Moore (1961), estudando tecido nervoso de 4 espécies de carnívoros, encontraram um nítido dimorfismo sexual nuclear, cujos dados se podem observar na Tabela IV.1.

TAB. IV.1 - Incidência e posição da cromatina sexual em tecido nervoso de alguns carnívoros.

REGIÃO	SEXO	POSIÇÃO DA CROMATINA SEXUAL			TOTAL (%)
		Adjacente ao nucléolo	Livre no nucleoplasma	Adjacente a memb.nuclear	
<u>LOBO CINZENTO</u>					
Córtex motor	F	52	7	35	94
	M	4	1	3	8
Células de Purkinje	F	84	4	6	94
	M	5	1	3	9
Núcleo hipoglossal	F	69	14	11	94
	M	3	2	3	8
Corda espinal (Células do corno anterior)	F	63	11	16	90
	M	3	2	3	8
Gânglios dorsais	F	76	9	7	92
	M	2	1	2	5
Gânglios estriados	F	80	8	6	94
	M	3	1	1	5

URSO PRETO

Córtex motor	F	76	5	13	94
	M	4	0	0	4
Células de Purkinje	F	80	3	4	87
	M	4	1	0	5
Núcleo hipo-glossal	F	44	9	24	77
	M	7	1	1	9
Corda espinal (Células do corno anterior)	F	66	3	9	78
	M	4	0	0	4
Gânglios dorsais	F	79	4	8	91
	M	4	0	0	4
Gânglios estrolados	F	68	10	3	81
	M	3	0	0	3

RAPOSA VERMELHA

Córtex motor	F	89	2	3	94
	M	1	0	1	2
Células de Purkinje	F	75	8	2	85
	M	2	0	1	3
Núcleo hipo-glossal	F	75	8	0	83
	M	1	0	1	2
Corda espinal (Células do corno anterior)	F	56	14	10	80
	M	1	1	1	3
Gânglios dorsais	F	82	2	1	85
	M	1	2	1	4
Gânglios estrolados	F	74	0	0	74
	M	6	0	0	6

COIOTE

Córtex motor	F	34	10	44	88
	M	4	1	1	6
Células de Purkinje	F	84	0	7	91
	M	2	1	1	4
Núcleo hipo-glossal	F	66	5	20	91
	M	3	0	1	4
Corda espinal (Células do corno anterior)	F	63	15	9	87
	M	2	1	1	4
Gânglios dorsais	F	53	10	17	80
	M	1	2	2	5
Gânglios estrolados	F	57	12	15	84
	M	1	0	2	3

OBS.: Dados obtidos de Hay e Moore (1961).

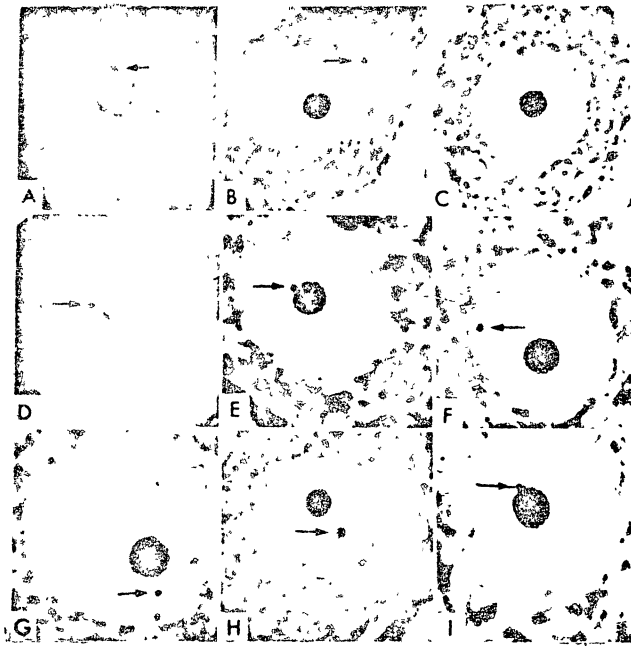


FIG. IV.3 - Células nervosas de vários carnívoros

Todas as células, com exceção da C, são femininas.

A - Gato; B - Cachorro; C - Cachorro; D - Mão pelada americano; E - Raposa; F - Coiote; G - Lobo cinzento; H - Marta; I - Leão.

OBS.: Cortesia do Dr. K.L.Moore.

III.- EM ARTIODÁCTILOS

a. Bisão americano (Bison bison)

A grande quantidade de cromatina grosseira, de origem autossômica, presente em células de ambos os sexos, impede a identificação do corpúsculo da cromatina sexual (Moore, 1966).

b. Boi (Bos taurus)

Dimorfismo sexual presente em neurônios. Em outros núcleos, a cromatina grosseira dificulta tal reconhecimento.

Com hidrólise ácida em tecido pancreático e adrenal o dimorfismo sexual pode ser reconhecido (Lang e Hansel, 1959; seg. Moore, 1966).

c. Veado virginiano (Odocoileus virginianus)

Só foram examinadas células nervosas, onde o dimorfismo sexual nuclear está presente (Moore, 1966).

d. Ovelha (Ovis aries)

Há muitos cromocentros nas células, porém uma diferença sexual na morfologia nuclear foi observada em todas. Somente na mucosa bucal e vaginal, Bruere não detectou o corpúsculo da cromatina se

xual(segundo Moore,1966).

e. Porco (Sus scrofa)

A cromatina sexual é facilmente identificável em células nervosas (Tabela IV.2); no entanto, a identificação se torna difícil nas células de Purkinje, bem como em outros tecidos e órgãos pela existência da cromatina grosseira(Cantwell e cols.,1958, e Hay e Moore, 1961).

TAB. IV.2 - Incidência e posição da cromatina sexual em tecido nervoso de porco

REGIÃO	SEXO	POSIÇÃO DA CROMATINA SEXUAL (%)			TOTAL (%)
		Adjacente ao nucléolo	Livre no nucleoplasma	Adjacente à Memb.nuclear	
Córtex motor	F	54	1	37	92
	M	5	0	2	7
Células de Purkinje	F	74	3	13	90
	M	15	1	1	17
Núcleo hipoglossal	F	87	3	5	95
	M	1	1	1	3
Corda espinal(Células do corno anterior)	F	78	11	4	93
	M	5	1	0	6
Gânglios dorsais	F	46	2	41	89
	M	1	0	1	2
Gânglios estrolados	F	21	1	70	92
	M	1	0	3	4

OBS.: Dados obtidos de Hay e Moore (1961).

Cantwell e cols. (1958) visualizaram também a possibilidade de determinar o sexo genético de machos, fêmeas e também de intersexos. O padrão cromatínico destes últimos é semelhante ao das fêmeas. (Tabela IV.3).

f. Caprinos

Somente verificável em células do tecido nervoso(Moore,1966).

IV - EM PERISSODÁCTILOS

a. Cavalo (Equus caballus)

Hoshino e Toryu, em 1959,(apud Moore,1966),verifica

TAB. IV.3 - Incidência (%) e posição da cromatina sexual em vários tecidos de fêmeas, machos e intersexos de porco

TECIDO	SEXO	POSIÇÃO DA CROMATINA SEXUAL			TOTAL (%)
		Adjacente ao nucléolo	Livre no nucleoplasma	Adjacente à Memb.Nuclear	
Gânglios dorsais	F	72,0	11,0	11,0	94,0
	I	73,0	10,0	10,0	93,0
	M	3,0	2,0	0,0	5,0
Cerebelo	F	73,5	10,0	11,0	94,5
	I	70,0	10,5	14,5	95,0
	M	5,5	1,0	0,5	7,0
Corda espinal (Corno ventral)	F	76,0	10,0	9,5	95,5
	I	74,0	9,0	11,0	94,0
	M	3,5	1,0	1,0	5,5
Gânglios simpáticos	F	56,0	9,0	32,0	97,0
	I	53,0	10,0	35,0	98,0
	M	6,0	0,5	1,0	7,5
Córtex	F	74,0	11,0	10,0	95,0
	I	71,0	9,0	9,0	89,0
	M	7,0	3,0	1,0	11,0

OBS.: F= feminino; I = Intersexo; M = Masculino
 Dados obtidos de Cantwell e cols. (1958).

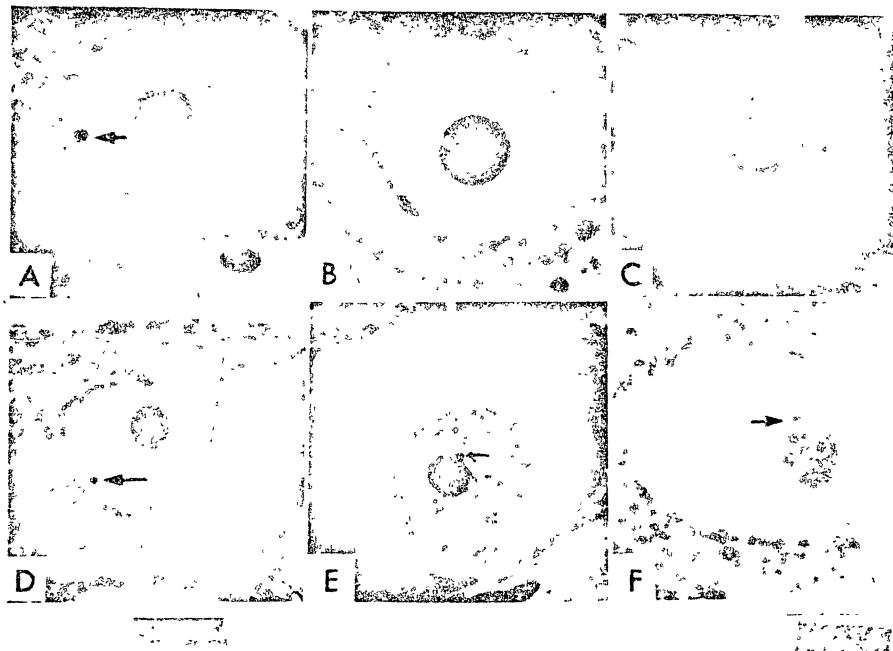


FIG. IV.4 - Células nervosas de vários artiodáctilos

A = Vaca; B = Touro; C = Caprino macho; D = Caprino fêmea; E = Veado fêmea; F = Suíno fêmea. (Por cortesia do Dr.K.L.Moore)

ram diferença sexual nuclear em tecido nervoso, epitelial e muscular liso do duodeno. Em outros órgãos, a cromatina grosseira não permitiu reconhecer tal fenômeno.

b. Burro (Equus asinus)

Benirschke, em 1965, apud Moore (1966), observou cromatina sexual típica em células da pele de mulas e fêmeas de burros.

V - EM INSETÍVOROS

a. Ouriços

Furieri, em 1958, não verificou cromatina sexual em neurônios do córtex cerebral (apud Moore, 1966).

b. Toupeira (Scapanus latimanus)

Dimorfismo sexual presente em neurônios da corda espinal (Furieri, 1958; segundo Moore, 1966).

c. Musaranha (Neosorex palustris)

Somente reconhecido o dimorfismo sexual nuclear em células nervosas da corda espinal (Moore, 1966).

VI - EM QUIRÓPTEROS

a. Morcego (Tadarida mexicana)

Dimorfismo sexual só descrito em neurônios da corda espinal (Furieri, 1958, segundo Moore, 1966).

VII - EM DESDENTADOS

a. Tatu (Dasypus novemcinctus)

O corpúsculo da cromatina sexual não é reconhecível em células nervosas e em vários tecidos (Hay e Moore, 1961), mas Beath e cols., em 1962, segundo Moore (1966), ao estudarem esfregaços da mucosa bucal dessa espécie, observaram, que, em média, 37% das células femininas eram cromatino-positivas, e nas masculinas, em somente 4% havia um corpúsculo algo semelhante ao das células femininas.

VIII - EM MARSUPIAIS

a. Gambá (Didelphys virginiana)

O dimorfismo sexual nuclear em células nervosas não é realizado, nessa espécie, pela presença ou não do corpúsculo de Barr nos núcleos (Tab. IV.4). No macho, há um cromocentro significativamente menor que no sexo feminino (Tab. IV.5 e Fig. IV.5)(Graham e Barr, 1959). Em tecidos não nervosos, ocorre o mesmo fato. Somente em células da epiderme é que as diferenças nas médias das dimensões máximas da cromatina sexual entre os dois sexos, não se mostraram estatisticamente significantes (Graham e Barr, 1959).

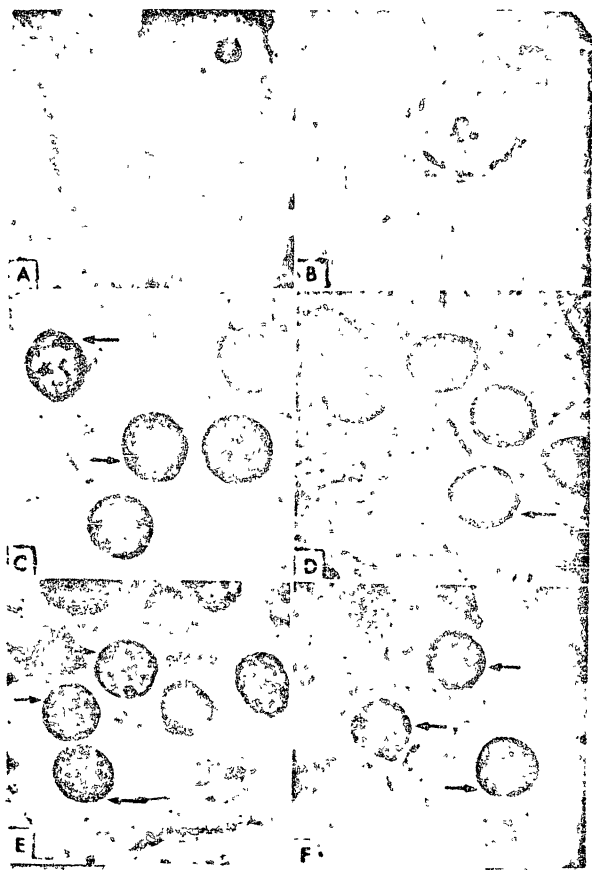


FIG. IV.5 - Núcleos de várias células do tatu

A - Córtex motor feminino; B - Córtex motor masculino (em ambos não se reconhece a cromatina sexual); C - Células femininas do córtex da adrenal; D - Células masculinas do córtex da adrenal; E - Células pancreáticas femininas; F - Células pancreáticas masculinas (Obs. Cortesia do Dr. K.L.Moore).

IX - EM LAGOMORFOS

a. Coelhos (Oryctolagus cuniculus)

Nos núcleos de ambos os sexos foi encontrado por Moore e Barr, em 1953, segundo Moore (1966), de uma a quatro massas cromatínicas

TAB. IV.4 - Incidência e posição da cromatina sexual em neurônios do gambá

R E G I Ã O	FÊMEA				MACHO			
	a	b	c	TOTAL	a	b	c	TOTAL
Córtex cerebral	22	72	0	94	9	77	0	86
Hipocampus (Células piramidais)	18	75	1	94	17	77	0	94
Córtex cerebelar (células de Purkinje)	25	64	0	89	15	68	0	83
Corde espinal (corno ventral)	12	65	8	85	17	46	0	63
Gânglios dorsais	6	65	3	74	5	61	1	67
Gânglios estrelados	18	78	0	96	8	79	0	87
M É D I A	17	70	2	89	12	68	0	80

OBS.: a = adjacente ao nucléolo; b = livre no nucleoplasma; c = adjacente à membrana nuclear (Dados de Graham e Barr, 1959).

TAB. IV.5 - Tamanho (μ) da cromatina sexual em gambá.

T E C I D O	F Ê M E A	M A C H O	t
Córtex cerebral	0,8 x 1,0	0,6 x 0,8	3,533
Hipocampus (células piramidais)	0,8 x 1,0	0,6 x 0,7	7,371
Córtex cerebelar (células de Purkinje)	0,8 x 1,1	0,5 x 0,7	11,019
Corde espinal (corno ventral)	0,9 x 1,1	0,5 x 0,8	—
Gânglios dorsais	0,8 x 1,1	0,6 x 0,8	7,324
Gânglios estrelados	0,8 x 1,1	0,6 x 0,8	2,027
M É D I A	0,8 x 1,1	0,6 x 0,8	

OBS.: Dados obtidos de Graham e Barr (1959). Todos os valores de t revelam significância ao nível de 5%.

grandes paranucleolares sem se verificar o dimorfismo sexual nuclear.

Em células de Purkinje, no entanto, Castro e Sasso (1959) observaram que, nas femininas, havia dois cromocentros grandes e, nas masculinas, somente um.

James (1960), observando mesentério jejunal, notou que a cromatina sexual aparecia em 99% a 100% das células femininas.

Hulliger, Klinger e Allgöwer (1963), após incubação, por 24 horas, de leucócitos de coelhos, não foram capazes de identificar células masculinas e femininas. Só conseguiram fazê-lo após 3 a 4 dias de incubação, quando a proliferação de células se verifica, e células do tipo fibroblasto aparecem em grande número.

Nayyar e Barr (1966), observando núcleos mesoteliais grandes de fêmeas, notaram serem os mesmos livres de cromocentros, exceto para uma única massa cromatínica localizada adjacente à membrana nuclear; 96% dos núcleos femininos eram cromatino-sexual positivos enquanto, no macho, somente 3% possuíam um corpúsculo semelhante.

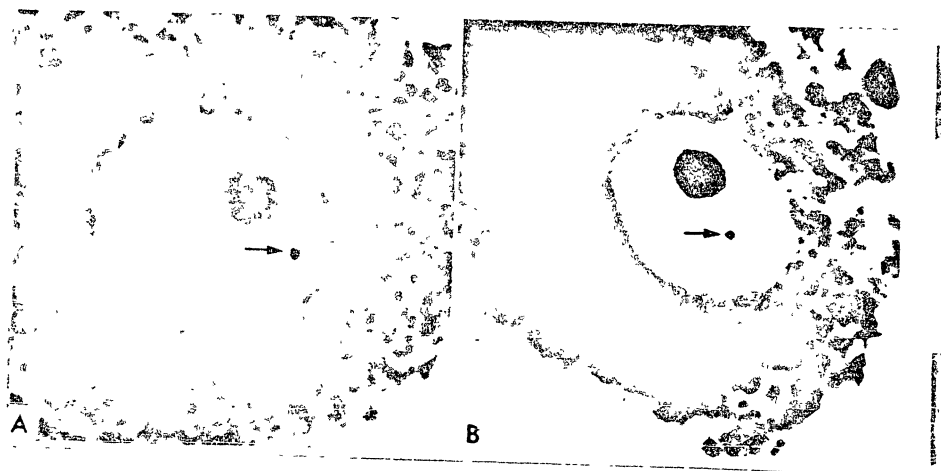


FIG. IV.5 - Neurônios de gambá.

Obs.: A - neurônio de fêmea; B - neurônio de macho
Cortesia do Dr. K.L.Moore.

X - EM ROEDORES

a. Castor (Castor canadensis)

Em vista da cromatina ser muito grosseira, o dimorfismo sexual nuclear não é evidenciado (Moore 1966).

b. Chinchila (Chinchila laniger)

Hopkins e Whidden, em 1959, segundo Moore (1966), descreveram dimorfismo sexual em células do fígado, mas não em cartilagem, intestino, pele, rim e bexiga.

c. Rato de bolsa (Goemys thomomys)

Marmota (Marmota monax)

Preás (Cavia procellus)

De acordo com Moore (1966), nestas três espécies não se constata dimorfismo sexual nuclear. Nayyar e Barr (1966) verificaram,

no entanto, que, em média, 65% dos núcleos do mesentério em fêmeas e 6% em machos eram cromatino-positivos em preãs (Cavia procellus).

Kang e Park (1965), em células cultivadas do córtex renal, encontraram que 36,8% eram positivas periféricamente, nas fêmeas, e somente 6,3% em machos, enquanto que, na posição não periférica, havia 6,1% em fêmeas e 3,5% em machos. No total, a incidência era de aproximadamente quatro vezes maior na fêmea do que no macho do preã.

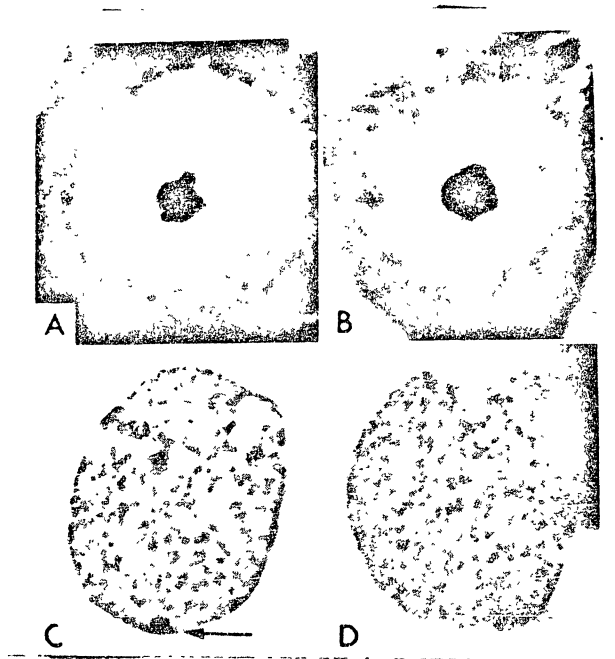


FIG. IV.6 - Células de coelhos

Obs.: A e B são células de Purkinje, feminina e masculina respectivamente; C e D, núcleos de células do mesentério, feminina e masculina respectivamente. Cortesia do Dr.K.L. Moore.

d. Hamster (Cricetus auratus)

Somente em neurônios da corda espinal e nas células do parênquima hepático é reconhecida a diferença sexual (Walsh, em 1955, e Moore e Barr, em 1953, segundo Moore, 1966).

e. Camundongos (Mus musculus domesticus)

Hinrichsen e Goethe, em 1958, segundo Moore (1966), demonstraram uma diferença estatisticamente significativa nos padrões cromatínicos das células de Purkinje, hepáticas e zona glomerular das glândulas adrenais.

f. Porco-espinho-do-oeste (Erethizon dorsatum)

No tecido nervoso, mas somente em células de gânglios estre

lados, o dimorfismo sexual é evidenciável. As células do córtex adrenal da medula e dos músculos também o apresentam (Moore, 1966).

g. Cachorro-do-campo (Cynomys ludovicianus)

Somente células dos gânglios estrelados apresentam diferença sexual nuclear (Moore, 1966).

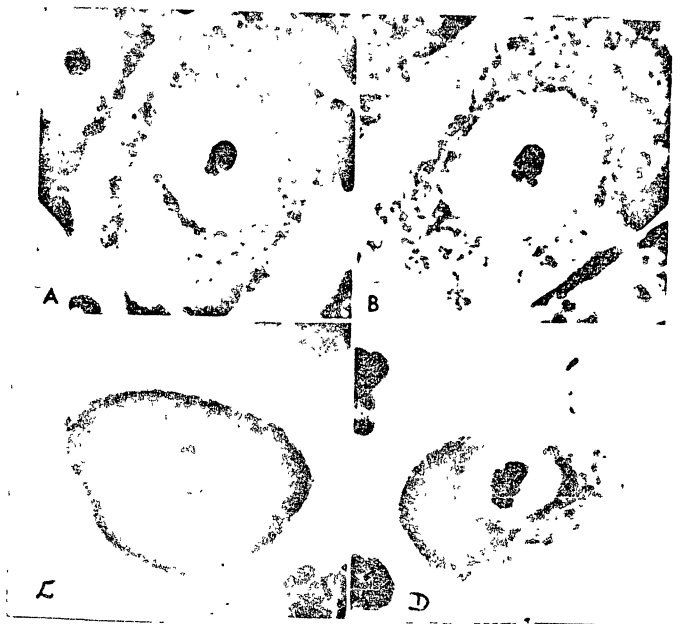


FIG. IV.7 - Células nervosas de roedores

Obs.: Em A (fêmea) e B (macho) de cachorro-do-campo, nota-se uma grande massa cromatínica adjacente ao nucléolo; ambas são células nervosas do gânglio dorsal. Em C (fêmea), há duas massas cromatínicas adjacente ao nucléolo e em D (macho) há três; ambas são células de Purkinje do preâ. (Cortesia do Dr. K.L. Moore).

h. Rato (Rattus norvegicus)

Por ser animal de laboratório, foi extensamente estudado. Segundo Moore (1966), Moore e Barr, em 1953, não observaram diferença sexual em células de várias regiões do tecido nervoso, mas Feiner (1960) e Hinrichsen e Goethe (1958) reconheceram um dimorfismo sexual em núcleos de células de Purkinje.

Forsberg e Lindh (1962) reconheceram a cromatina sexual em células de gânglios espinais de embriões, fetos e adultos.

Castro e cols., em 1956, segundo Castro e Sasso (1959), verificaram diferença sexual em núcleos de ameloblastos de ratos recém-nascidos.

Feiner, em 1960, estudando largamente o assunto, observou a diferença sexual em células dos seguintes tecidos embrionários: rim, estômago, intestino, gânglios espinais, músculo liso e esquelético, gônadas, dutos de Wolf e Müller. Não observou-a em fígado, baço, medula espinal, epiderme e pulmões. Em adultos, encontrou-a em

fígado, rim, células de Purkinje e epitélio genital (Seg. Moore, 1966). Nota-se, portanto, que há tecidos que apresentam esse dimorfismo, em um estágio e não em outro (estômago, músculos e fígado, por exemplo).

Berembaum (1960) concluiu que o sexo do metamielócito de camundongos e ratos pode ser determinado pela incidência de corpúsculos cromatínicos situados perifericamente, adjacentes à membrana nuclear.

i. Esquilo voador (Glaucomys)

Esquilo listrado (Citellus tridecemlineatus)

Nesses animais, não foi verificado dimorfismo sexual em células de vários tecidos e órgãos (Moore, em 1965, segundo Moore 1966). Em células mesoteliais do esquilo listrado (C. tridecemlineatus), no entanto, Nayyar e Barr (1966) o encontraram (Tab. IV.6).

j. Rato agreste (Microtus agrestis)

Espécie com cromossomo X do tipo quadruplicado, segundo Ohno, Beçak e Beçak (1964_a). Sachs e Danon (1956) não verificaram diferença sexual nuclear (apud Moore, 1966). O dimorfismo sexual se manifesta pelo tamanho dos corpúsculos heteropicnóticos das células de ambos os sexos. Há um cromocentro de igual tamanho em células femininas e masculinas, mas há um outro cromocentro bem maior nas células femininas do que nas masculinas (Fig. III.7).

k. Rato de Oregon (Microtus oregoni)

Espécie com o cromossomo X do tipo triplicado (Ohno, Beçak e Beçak, 1964_a), havendo, nos núcleos de ambos os sexos desta espécie, cromocentros derivados de cromossomos sexuais.

Nos núcleos masculinos, há dois cromocentros, um proveniente do cromossomo X; e o outro, do Y em heteropicnose positiva, enquanto que, nos núcleos femininos, há somente um, derivado do cromossomo X.

TAB. IV.6 - Frequência de cromatina sexual em núcleos mesoteliais de roedores

ESPECIES	Número de animais estudados	Total de núcleos observados	Frequência de núcleos cromatino-sexual positivos (%)
Rato (<u>Rattus norvegicus</u>)	5 F 5 M	1600 1600	84 6
Camundongo (<u>Mus musculus</u>)	4 F 4 M	1400 1400	58 9
Preá (<u>Cavia procellus</u> L.)	3 F 3 M	1100 1100	65 6

Hamster (<u>Cricetus auratus</u>)	3 F	900	78
	3 M	900	10
Esquilo listrado (<u>Critellus tridecemlineatus tridecemlineatus</u>)	3 F	700	92
	3 M	700	5
Rato de campina (<u>Microtus pennsylvanicus</u>)	3 F	500	77
	3 M	500	5

Obs.: F - Feminino; M - Masculino. Dados obtidos de Nayyar e Barr (1959).

XI - EM AVES

O dimorfismo sexual nuclear foi verificado na epiderme, na derme e no músculo liso do galo doméstico (Gallus domesticus). A frequência da ocorrência do corpúsculo é 10 vezes maior, no mínimo, em fêmeas do que em machos, variando de 22% nas células do músculo duodenal a 52% nas células epidérmicas de uma pena em crescimento (Kosin e Ishizaki, 1959).

Ohno, Kaplan e Kinosita (1960) estudaram preparações por esmagamento de núcleos interfásicos de pele e fígado de embriões de galinha Leghorn. Notaram que os núcleos de ambos os sexos apresentavam de três a oito pequenos cromocentros de origem aparentemente autossômica; entretanto, um grande cromocentro, lembrando o da cromatina sexual, somente foi encontrado em núcleos femininos.

Segundo Moore (1962 e 1966), estudos realizados em tecido nervoso do pombo (Brusa, em 1952); pãrdal e andorinha (Furieri, em 1958); pato doméstico e papagaio (Ashley e Theiss, em 1959) e peru, não revelaram diferença sexual em padrões cromatínicos.

XII - EM RÉPTEIS

Na tartaruga (Pseudemys elegans) e em várias espécies de ofídios, não se observou dimorfismo sexual nuclear (Moore, 1966).

XIII - EM ANFÍBIOS

Em vários tecidos de salamandra (Ambystoma mexicanum), observados por Wolf-Heidegger e Klinger, em 1958, e sapo (Bufo arena rum) por Brum e cols., em 1959, não se verificou dimorfismo sexual nuclear (Segundo Moore, 1966).

XIV - EM INSETOS

a. Em hemípteros (Gerris lateralis e Gerris locustris)

Geitler, em 1937, descreveu dimorfismo sexual em núcleos

L Y O N I Z A Ç Ã O D O C R O M O S S O M O S E X U A L X

INTRODUÇÃO

O fato do corpúsculo da cromatina sexual em fêmeas de mamíferos, ser derivado de um único cromossomo X que se apresenta em heteroplicose positiva na prófase mitótica, encontrar-se condensado em interfase e replicar seu ADN tardiamente na fase de síntese, já foi enfocado em outro capítulo da presente monografia.

Com novos conhecimentos a respeito do código genético, presentemente, interessa-nos conhecer os "passos" do controle da expressão gênica. Lyon (1968) conceitua o que significa inativação: " In general what is meant is a lack of any phenotypic effect on the organism of the genetic material contained in the inactivated regions or chromosomes."

Há casos em que a inativação ocorre em uma parte do cromossomo, como no X de *Drosophila*; em outros, um cromossomo inteiro é inativado, como o X das fêmeas de mamíferos; em outros pode também ocorrer a inativação de um número variável de cromossomos [cromossomos B de plantas; cromossomos E de *Cecidomyidae* (Painter, em 1966); cromossomos L de *Sciara* (Rieffel e Crouse, em 1966)] ou ainda, tal fenômeno pode ocorrer num conjunto (n) de cromossomos (Brown, em 1966), segundo Lyon (1968).

Berlowitz (1955), estudando a síntese de ARN em coccídeos (*Planococcus obscurus*), concluiu que a inatividade genética das regiões heterocromáticas estava correlacionada com o bloqueio da síntese do ARN, ainda que o ADN apresentasse duplicação regular em cada divisão celular.

Em coccídeos, um grupo haplóide de cromossomos se torna heterocromático. Revisões de evidências de ser este grupo de origem paterna e geneticamente inativo foram feitas por Brown (1966) e

por Nur (1967). Brown e Nelson-Rees (1961), pela irradiação de machos e fêmeas e pela observação das aberrações cromossômicas presentes em sua descendência, obtiveram indicações de ser o grupo paterno o heterocromático, uma vez que aberrações cromossômicas no grupo materno levavam à morte dos descendentes, enquanto que, após constantes e altas doses de radiação em machos, levando a aberrações cromossômicas, seus filhos sobreviviam, enquanto as filhas, nas quais os cromossomos paternos são eucromáticos, morriam. Portanto, evidenciou-se, não somente a origem paterna dos cromossomos heterocromáticos, como também o fato de que esse grupo se apresenta sem efeito fenotípico, isto é, geneticamente inativo. O estudo de genes mutantes, nessa espécie, também contribuiu com evidências para tal fenômeno. Quando o alelo dominante do tipo selvagem era herdado da mãe, expressava-se tanto nos descendentes masculinos como femininos, mas quando a mãe contribuía com o alelo recessivo e o pai com o selvagem, todos os filhos apresentavam fenótipo recessivo e as filhas, o selvagem.

HIPÓTESE DE LYON

Ohno e Hauschka(1960), segundo Lyon (1961), mostraram que, em fêmeas de camundongos, um cromossomo em células de carcinoma de mama, em células diplóides normais do ovário, em células das glândulas mamárias e do fígado, mostrava-se heteropicnótico, sendo considerado como um cromossomo sexual X, e sugeriram que o corpúsculo da cromatina sexual seria originado de um cromossomo X heteropicnótico.

Lyon (1961), baseada em que fêmeas de camundongo, com cariótipo XO, são fenotipicamente normais (Welshon e Russel, 1959), mostrando, desta maneira, que somente um cromossomo X é necessário para o desenvolvimento normal, e que camundongos fêmeas, heterozigotas para genes ligados ao sexo, apresentam um mosaico fenotípico, sendo que os genes que afetam a cor da pele causam um fenótipo "variegado", "maltizado" ou "malhado", descreveu uma hipótese (hipótese de Lyon), cujo enunciado é o seguinte:

1. O cromossomo X heteropicnótico poderá ser tanto de origem materna quanto paterna, em diferentes células do mesmo animal;
2. Esse cromossomo é geneticamente inativo;
3. Sua inativação ocorre da seguinte maneira:
 - a. ao acaso;
 - b. precocemente no desenvolvimento embrionário mas, uma

vez realizada, tal característica permanece fixa nas células descendentes.

Muitos dos genes mutantes ligados ao sexo, que afetam a cor da pele em camundongos, são letais quando em hemizigose, mas verificou-se que os machos, antigamente aceitos como "malhados", têm, na realidade, pele branca. A pele de fêmeas heterozigotas apresenta partes da cor mutante e da cor selvagem.

Outra experiência, cujos dados estão de acordo com a hipótese de Lyon, foi realizada por Russel, em 1961, segundo Frota-Pessoa, (1966), com o locus gênico "brown". Normalmente este locus está situado no autossomo 8 do camundongo. "Brown" é recessivo e, quando em homozigose, apresenta como fenótipo uma coloração castanha e uniforme da pelagem. Russel obteve numa linhagem uma translocação de um segmento do cromossomo 8, o qual continha o alelo normal de "brown", para o cromossomo X. Nessa linhagem as fêmeas heterozigotas apresentam uma coloração variegada, com manchas de cor castanha e manchas de cor normal. Sabendo-se que o alelo normal é dominante, o aparecimento de manchas castanhas demonstra que, em certas porções da pele, o alelo normal não atuou.

A hipótese de Lyon, requer dois tipos principais de evidências:

- 1º - Que um dos cromossomos X nas células femininas, em mamíferos, seja inativo
- 2º - Que o X inativo, heteropiconótico ou de replicação tardia, e o corpúsculo da cromatina sexual sejam, de fato, a mesma coisa.

1º - PRESENÇA DE UM CROMOSSOMO X INATIVO

a. Expressão gênica em heterozigotos

A hipótese de que em fêmeas normais de mamíferos, um dos dois cromossomos X é geneticamente inativo, leva a várias predições, particularmente em relação à expressão de genes ligados ao sexo em heterozigotos. A principal é que tais fêmeas seriam um mosaico natural de células; umas com o cromossomo X de origem paterna inativo; e outras em que o X inativo seria o materno (Fig. V.1).

Segundo Lyon (1966), a maneira com que este mosaicismo se manifesta, depende do tipo de ação gênica. No caso de genes com ação localizada, tais como os que afetam a cor ou textura da pele, o efeito mosaico será visível como partes diferentes, ou como dois tipos

diferentes de células ao microscópio (Fig. V.2). No caso de genes com ação não localizada, uma variedade de efeitos pode ser prevista:

1º - Quando os resultados da ação gênica podem ser medidos quantitativamente, como no caso de genes determinantes de alguma deficiência em enzimas e outras proteínas, os heterozigotos deverão apresentar-se intermediariamente e também de forma variável, porque as proporções de células com o gene mutante ou com o normal ativo variam ao acaso, em diferentes indivíduos;

2º - Onde os resultados da atividade gênica podem ser conhecidos somente como "normal" ou "anormal", pode ser que a presença de qualquer célula normal seja suficiente para garantir um fenótipo normal, como se o gene se comportasse como recessivo. Pode também acontecer que a anormalidade seja visível somente nos heterozigotos em que a proporção de células com o gene mutante ativo é alta, levando a uma manifestação gênica ocasional ou parcial. Quando a manifestação for ocasional, sua frequência dependerá da proporção relativa das células que devem ser anormais para dar um fenótipo anormal. Se a frequência de manifestação é muito pequena, digamos 1%, o gene pode ser tomado como recessivo, mas podem-se encontrar algumas fêmeas anormais cujos ancestrais ou descendentes serão heterozigotos e, ainda, fenotipicamente tidos como homozigotos (Lyon, 1966).

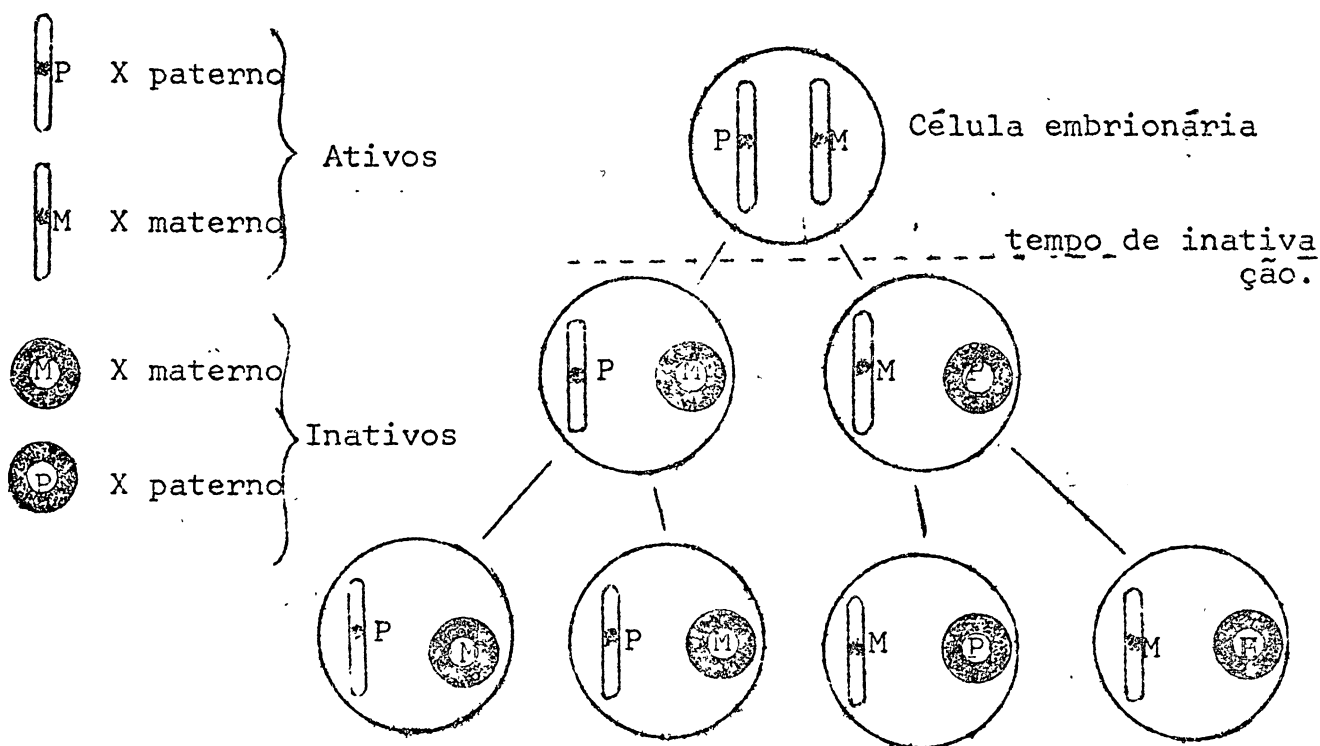


FIG. V.1 - Diagrama da inativação ao acaso, do cromossomo X, em mamas.

Na Tab. V.1, encontra-se uma lista de alguns genes ligados ao sexo, no camundongo, com seus respectivos efeitos fenotípicos quando em heterozigose.

TAB. V.1 - Genes ligados ao sexo no camundongo e seus efeitos em heterozigose.

Efeito em heterozigose	Cor da pele	Tipo de efeito na pele e textura do pelo	Outros
MOSAICO	"Mottled" (Fraser e cols., em 1953)	"Tabby" (Falconer, em 1953)	
	"Brindled" (Fraser e cols., em 1953)	"Striated" (Phillips, em 1953)	
	"Tortoiseshell" (Dickie, em 1954)	"Greasy" (Russel e Larsen, em 1964)	
	"Dappled" (Phillips, em 1961)		
	"Dappled-2" (Lyon, em 1960)		
	"Blotchy" (Russel e Saylor, em 1962)		
PENETRÂNCIA INCOMPLETA			"Bent-tail" (Garber, em 1952)
			"Jimpy" (Phillips, em 1954)
			Anemia ligada ao sexo (Falconer e Isaacson, em 1962)
NENHUM		"Scurfy" (Russel e cols., em 1959)	Antígeno ligado ao sexo (Bailey, em 1962)
		"Sparse-Fur" (Russel, em 1964)	"Gyro" (Lyon, em 1961)

Obs.: Dados obtidos de Lyon (1966).

TAB. V.2 - Efeito em heterozigose de alguns dos conhecidos genes ligados ao sexo na espécie humana.

Efeito em heterozigose	Célula Ou tecido	Locus gênico
MOSAICO	Pele	Incontinentia pigmenti (McKusick, em 1962) Síndrome de Christ-Siemens-Touraine (Lyon, em 1962)
	Olhos	Coroideremia (Lyon, em 1962)
	Dentes	Hipoplasia do esmalte ligada ao sexo (Rushton, em 1964)
	Eritrócitos	Deficiência em G-6PD (Beutler e Baluda, em 1964)
	Fibroblastos cultivados	Deficiência em G-6PD (Davidson e cols., em 1963)
	Leucócitos cultivados	Agamaglobulinemia (Fudenber e Hirschhorn, em 1964)
INTERMEDIÁRIO.	Sangue	Doença de Christmas (Simpson e Biggs, em 1962; Frota-Pessoa e cols., em 1963)
	Sangue	Hemofilia A (Didisheim e cols., em 1958)
	Músculo	Distrofia muscular tipo Duchenne (Demos e cols., em 1963; Hughes, em 1962; Schapira e cols., em 1960)
NENHUM	Pele	Ictiose ligada ao sexo (Lyon, em 1962)
	Eritrócitos	Locus X _g

Obs.: Dados obtidos de Lyon (1966). Tabela modificada.

Nas mulheres, efeitos mosaicos podem não somente ser verificados em exame de pele, olhos e dentes, mas também, por técnicas especiais, quando apresentam um efeito intermediário. O primeiro desses estudos foi realizado por Beutler e Fairbanks (1962). Três mulheres heterozigotas para G-6PD apresentavam aproximadamente 50% da atividade enzimática normal em seus eritrócitos. Aqueles autores obtiveram forte sugestão de que as hemácias dos heterozigotos representavam

um mosaico de unidades (G-6PD deficiente e normal), o que estava de acordo com a hipótese de que um X com o gene para a atividade normal estava ativo em uma população de hemácias, enquanto o gene mutante estava ativo em outra.

Davidson, Nitowski e Childs (1963) obtiveram duas populações de células em mulheres heterozigotas para variantes quantitativos e qualitativos de G-6PD. Obtiveram clones de fibroblastos cultivados com nível de atividade enzimática normal e clones com atividade deficiente, mas nenhum com nível intermediário. Similarmente, todos os clones mostraram somente uma ou outra variante eletroforética de G-6PD (Fig. V.3).

Em negros, há uma variação qualitativa dessa enzima, que pode ser verificada pelo uso de eletroforese em gel de amido. G-6PD em tecidos masculinos aparece sobre o gel como uma única banda, que pode mostrar duas mobilidades: cerca de 34% têm banda firme, mais distanciada do ponto de aplicação, chamada banda A, e 66%, uma banda mais lenta, B. Em mulheres negras, aparecem três padrões eletroforéticos: dois correspondentes aos tipos masculinos (A e B) e cerca de 35% com os dois padrões de bandejamento, por isto designados AB (segundo Davidson, 1964) (Fig.V.3).

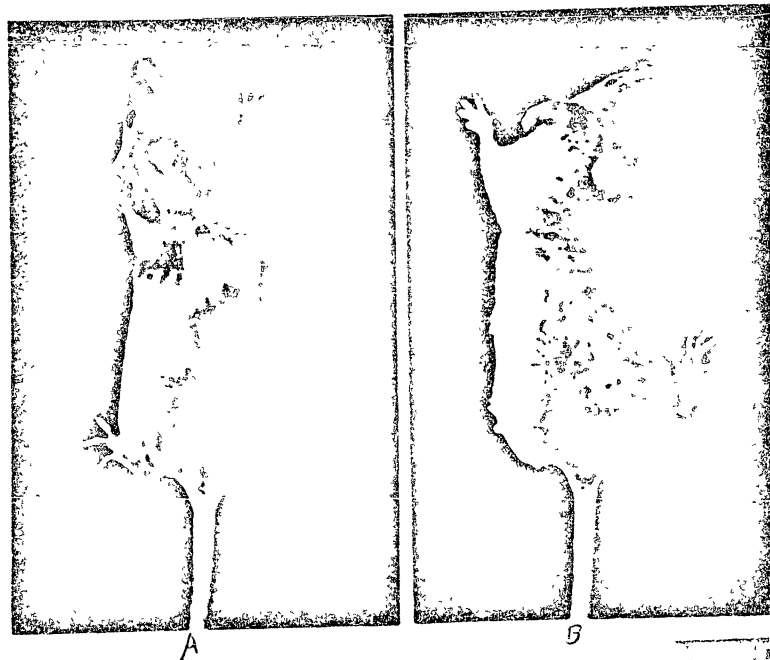


FIG. V.2 - Camundongos fêmeas heterozigotas para "dappled" e "tabby"
A - mutante "variado" (dappled); B - mutante "listado"
(tabby) Cortesia da Dra. M.Lyon.

Beutler e Baluda (1964) separaram eritrócitos de mulheres duplo-heterozigotas para deficiência em G-6PD e siclemia em duas populações diferentes. Converteram a hemoglobina em metahemoglobina, primeiramente, com nitrito de sódio. Incubaram, então, as células com um agente redutor e, em seguida, a reduzida tensão de oxigênio. Desde que a redução de metahemoglobina depende da atividade de G-6PD, eritrócitos deficientes poderiam ainda conter uma alta proporção de metahemoglobina. Tais células não apresentavam siclemia. As células com atividade de G-6PD normal conteriam principalmente oxi-hemoglobina e então apresentariam siclemia. Células siclêmicas eram facilmente separadas da porção restante através filtração "mil-lipore" e a determinação da atividade de G-6PD mostrou as duas populações previstas de células: células siclêmicas com atividade normal e células não-siclêmicas com reduzida atividade, comparável à dos machos hemizigotos deficientes.

Epstein (1969) estudou a atividade da G-6PD e da lactato desidrogenase (LDH) em oócitos de camundongos, de constituição cromossômica XO e XX. Quanto ao G-6PD, notou que a atividade em oócitos de camundongos XO é metade da encontrada em camundongos XX, indicando este resultado que o gene para G-6PD está ligado ao sexo, e sua síntese ocorre em oócitos, bem como a inativação do cromossomo X não ocorre no oócito do camundongo.

Enquanto isto a atividade de LDH nos dois grupos mostrou a mesma, sendo seu controle autossômico.

Crianças com rápida e progressiva distrofia muscular tipo Duchenne apresentavam alterações patológicas no músculo, incluindo fibras inchadas, trocas hialinas, variação no tamanho da fibra e aumento do número de núcleos. O estágio final do processo distrófico é a completa substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e lipídios. Antes e durante os primeiros estágios da doença, várias enzimas exibem níveis mais altos, por exemplo, a creatino-fosfoquinase (Thompson, 1965).

Schapira e cols. (1963), segundo Thompson (1965), concluíram que o nível da creatino-fosfoquinase é elevado na maioria dos portadores, sendo o acréscimo variável em magnitude. Essas variações estão de acordo com a hipótese de Lyon.

Pearson, Fowler e Whight (1963) sugeriram que a distribuição em forma de "remendos" (mosaico) dos distúrbios distróficos, observada em portadores, é evidência de duas populações de células: uma distrófica e uma normal.

Emery (1965) achou uma ampla graduação de anormalidades em biópsia muscular de nove pacientes, podendo aquela ser explicada pelo desenvolvimento embriológico das fibras musculares dos miótomos mosaicais. Dos miótomos do embrião, são derivados os mioblastos unnucleados, que se fusionam para formar fibras multinucleadas. No heterozigoto, dois diferentes tipos de núcleos (com respeito ao X ativo) se apresentarão nos mioblastos (Fig. V.4). Emery sugeriu que o grau de troca patológica em qualquer fibra dependerá da proporção dos núcleos em que o cromossomo X portador do gene para Duchenne estiver ativo.

Burch e Burwell, em 1963, segundo Lyon (1963), sugeriram uma explicação para a ausência do efeito mosaico em alguns genes ligados ao sexo em fêmeas heterozigotas: há genes no cromossomo X do homem que estão relacionados com a morfostasia e estes não obedecem à teoria do X inativo; isto foi baseado na hipótese de que certas doeenças autoimunes são mais comuns em mulheres do que em homens.

Em alguns casos, entretanto, o efeito "mosaico" não foi definitivamente demonstrado; por exemplo, no grupo sanguíneo X_g, cujo antígeno X_g^a comporta-se com um caráter dominante ligado ao sexo (Mann e cols., em 1962; Sanger e cols., em 1962; Gavin e cols., em 1964) segundo Sanger e cols. (1964).

Sanger e cols. (1964), no entanto, num estudo em 1161 famílias, com 2752 filhos, encontraram duas famílias em que as mães eraram X_g(a-) com filhos X_g(a+), contrariando, desta maneira, a hipótese de gene dominante ligado ao sexo. Para Sanger e cols., a resposta para o problema da herança irregular do grupo X_g nessas duas famílias pode ser mais de interesse citogenético do que imunológico.

Linsteins e cols. (1963), estudando duas mulheres com disgenesia gonadal, bem como suas famílias, obtiveram evidências de que o gene para o grupo sanguíneo X_g está localizado no braço curto do cromossomo X.

Reed e cols. (1963), estudando cinco mulheres heterozigotas para o grupo sanguíneo X_g (X_g^aX_g) e usando antiglobulina fluorescente, concluíram que, se o antígeno X_g^a da hemácia é produzido por uma precursora daquela célula, a completa inativação de um dos dois cromossomos X, em cada precursora, não ocorre na mulher, na frequência predita pela hipótese de Lyon.

Cohen e cols. (1964), usando a técnica de anticorpo-fluorescente para o grupo sanguíneo X_g, concluíram que não se podem obter evidências nem contra a hipótese de Lyon e nem a favor dela, por esta técnica.

FIG. V.3 - Diagrama de bandas de G-6PD de um heterozigoto tipo AB com quatro clones dos mesmos indivíduos (Davidson, 1964)

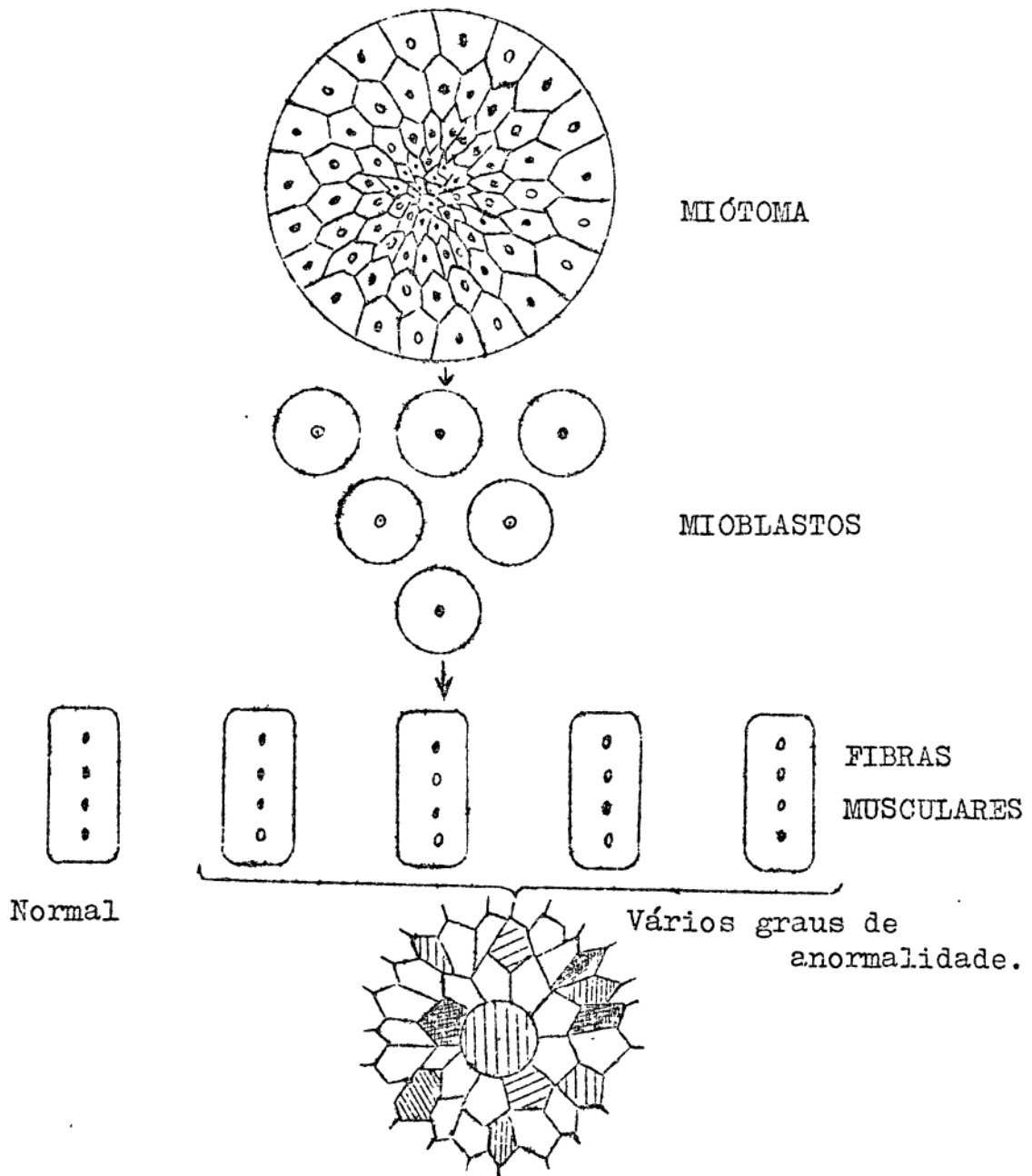
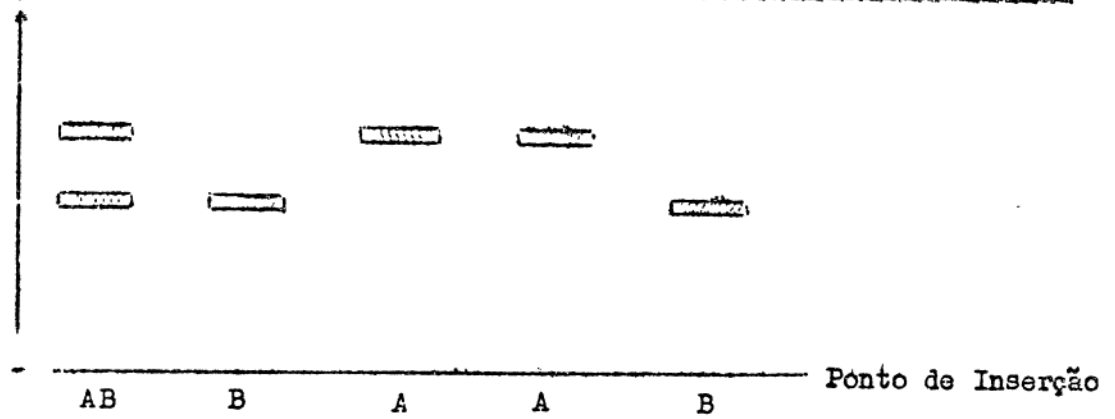


FIG. V.4 - Diagrama ilustrando uma possível explicação para a Distrofia Muscular Duchenne, segundo Emery (1965).

Para Gorman e cols., em 1963, e Cohem e cols., em 1964, segundo Lyon (1966), bem como, para Reed e cols. (1963), há três possíveis explicações para a não correlação entre o grupo sanguíneo Xg e a hipótese de Lyon:

- a. O mosaïcismo esperado pôde estar presente, mas, por problemas técnicos, torna-se difícil demonstrá-lo;
- b. O locus Xg pode estar sob inativação, mas o mosaïcismo esperado não é verificado por problemas de reação antígeno-anticorpo, pois as hemácias de homens portadores do alelo Xg^a (+ve) são aglutinadas pelo anticorpo específico, enquanto as de homens com o alelo Xg⁻ (-ve) não o são.
- c. O locus Xg não está sujeito à inativação.

Fialkow (1970) descreveu um novo método para testar a inativação do locus Xg baseado em dados da literatura. Mulheres heterozigotas para deficiência em Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRTase) têm um heterozigoto normal relativamente ao fenótipo de suas hemácias. Essas células são provavelmente derivadas de precursores onde todas têm o mesmo X ativo. Se este cromossomo X traz o alelo Xg e o cromossomo X inativado traz o alelo Xg^a, a hipótese do X inativo prediz que as hemácias teriam um fenótipo Xg(a-). Entretanto, cada três mulheres eram Xg(a+). Estes achados, para Fialkow, fornecem algumas evidências de que este locus não sofre inativação ao caso ou que o antígeno Xg^a não é sintetizado nas próprias hemácias.

Entretanto, uma demonstração um tanto interessante "in vivo" foi realizada por McDiarmid e cols., em 1967, segundo Lyon (1966). Em uma mulher heterozigota para uma anemia ligada ao sexo e para o antígeno do grupo Sanguíneo Xg^a, em relação à anemia, demonstrou duas populações de eritrócitos; uma normal; e outra hipocrômica e microcítica. Quando os dois tipos de células foram separadas por uma técnica especial, os eritrócitos normais mostraram-se com fenótipo Xg(a-), enquanto as células anormais eram Xg(a+). Há, pois, a possibilidade de que o grupo sanguíneo Xg também se encontre sob inativação.

A aparente inconsistência entre o desenvolvimento de G-6PD e Xg pode encontrar uma explicação na conclusão de Russel, em 1963, segundo Sanger e cols. (1964), de que somente partes do cromossomo X inativo são afetados pelo processo de inativação.

Littau e cols. (1964), fazendo autoradiografia de micrôsc

cópia eletrônica de núcleos do timo de boi, demonstraram que o ADN ativo em síntese de ARN está principalmente difuso, estendido, muito mais do que no estado condensado de massas compactas de cromatina. Desse modo que muito ADN de núcleo do timo está presente nas massas de cromatina, logo apresenta-se inativo para a síntese de ARN. Quando autoradiografias foram preparadas após marcação do ARN nuclear com uridina tritiada, Littau e cols. (1964) observaram que muito do ARN radioativo ocorre nas áreas da cromatina difusa, e que a cromatina condensada está virtualmente inativa para a síntese de ARN. Representando isto uma demonstração direta da atividade nuclear localizada, fornece informações de que muito ADN nuclear é suprimido; essa supressão ocorre em grupos isolados de cromatina condensada e diminui muito a síntese de ARN mensageiro.

Além do efeito mosaico, ocorre também com alguns genes ligados ao sexo, em condições de heterozigose, um efeito intermediário.

Na Doença de Christmas, heterozigotos apresentam um nível intermediário do efeito gênico (Simpson e Biggs, 1962; Frota-Pessoa e cols., 1963), mas Harris (1963) achou que isto não representa evidências críticas em relação à inativação do X, pois o mesmo efeito poderá ser produzido por outros mecanismos (segundo Lyon, 1966).

Em hemofilia (Didisheim e cols., em 1958; Nilsson e cols., em 1959; Lewis e cols., em 1963; Mulder e cols., em 1965), encontraram um nível médio de globulina anti-hemofílica (AHG) em torno de 50% em heterozigotas. Taylor e Biggs, em 1957 e 1961, descreveram uma mulher com hemofilia clínica e um nível de AHG de somente 18-25%, sendo apenas considerada heterozigota pela análise genealógica (segundo Lyon, 1966).

Em outros mamíferos, além do homem e do camundongo, quatro genes ligados ao sexo, que afetam a cor da pele, sendo um no gato, dois no hamster e um na vaca, produzem efeito mosaico em heterozigotos.

Hutt (1963) examinou seis tipos de hipotricose com padrão genético no gado vacum. Destes, "Lethal hairless", "Semihairlessness" e "Viable hypotrichosis", mostraram típico padrão autossômico recessivo simples. Em Hipotricose Com Anodontia, foram estudados poucos casos, e não foi possível uma conclusão, apesar de ser considerada como uma mutação recessiva ligada ao sexo. Em Hipotricose Com Falta de Incisivos, parecendo de padrão genético dominante, a amostra era muito pequena, donde nada se pôde concluir com segurança. Em "Streaked hairlessness", Hutt obteve boas evidências de ser o gene dominante ligado ao sexo, sendo letal em hemizigose e apresentando um efei-

to mosaico na pele da fêmea heterozigota.

Que a hemofilia canina seja um caráter recessivo ligado ao sexo, foi demonstrado por Hutt, Rickard e Field, em 1948, por Brock e cols., em 1963 e Sharp e Dike, em 1964, segundo Lyon(1966). Esses autores descreveram níveis intermediários de globulina anti-hemofílica em fêmeas de cachorros heterozigotas para a hemofilia A.

TAB. V.3 - Genes ligados ao sexo em mamíferos, com exceção do homem e camundongo.

Efeito em heterozigose	Mamífero	Gene	Referências
MOSAICO	hamster	"Mottled-White"	Magalhães, em 1954.
		"Tortoiseshell"	Tay, em 1964.
	gato	"Yellow"	Robinson, em 1959.
	vaca	"Streaked hairlessness"	Hutt, em 1963.
INTERMEDIÁRIO	cachorro	Hemofilia A	Hutt, em 1948.
			Brock e cols., em 1963.
DESCONHECIDO	cachorro	Doença de Christmas	Sharp e Dike, em 1964.
			Mustard e cols., em 1960.
	vaca	Hipotricose com anodontia	Hutt, em 1953 e 1963.

Obs.: Dados obtidos de Lyon (1966).

b) - Compensação de dose

Uma segunda implicação genética da hipótese refere-se ao efeito de dose para genes ligados ao sexo. Desde que em machos e fêmeas de mamíferos postula-se haver um único cromossomo X ativo, deverá existir, em ambos, igual quantidade de produtos gênicos quantitativamente mensuráveis; fato similar deverá ocorrer em indivíduos portadores de aneuploidias dos cromossomos X, pois, também, devem apresentar um único X ativo.

Grumbach, Marks e Morishima (1962) estudaram a atividade da G-6PD, medida em hemácias, em 15 pessoas com constituição anormal dos cromossomos sexuais. Em oito de nove pacientes com três ou quatro cromossomos X em sua constituição cariotípica, a atividade de G-6PD estava dentro dos padrões normais. Em um indivíduo com uma constitui

ção tetra-X, a atividade enzimática estava substancialmente elevada, o que, para os autores, poderia ser efeito de uma população de células mais jovens do que as normais.

TAB. V.4 - Constituição de cromossomos X e atividade enzimática de G-6PD em eritrócitos de 15 pacientes.

C A S O	Constituição de cromossomos X	Atividade de G-6PD (unidade por G.Hb)
1	XO	15.1
2	XO	14.2
3	XO	11.2
4	XO	11.0
5	XX/XO	11.9
6	XXY	13.8
7	XXX/XX/XO	11.7
8	XXX/XX/XO	13.7
9	XXX	11.1
10	XXX	14.6
11	XXX	11.7
12	XXX	11.1
13	XXXY	12.8
14	XXXX	11.1
15	XXXX	23.0
Homens normais	XY	14.0 ± 1.9
Mulheres normais	XX	14.2 ± 2.0

Obs.: Dados obtidos de Grumbach, Marks e Morishima (1962).

No camundongo fêmea, cromossomicamente XO, o fenótipo é normal, incluindo fertilidade; machos XXY também apresentam um fenótipo normal, exceto para fertilidade (Welshons e Russel, 1959).

No homem, de outra forma, indivíduos XXY mostram pequenas anormalidades, que são mais marcantes nos XXXXY (Brown e cols. em 1964; Farquhar e Walker, em 1964), segundo Lyon (1966). Mais marcantes são os efeitos fenotípicos nas mulheres XO, que mostram a síndrome de Turner, enquanto, pela hipótese de Lyon, deveriam apresentar padrões fenotípicos normais. Isto nos dá uma indicação que o segundo cromossomo X das mulheres não deva estar completamente inativado em todos os estágios do desenvolvimento.

c - Ação alternada dos cromossomos X

Nas fêmeas cujos cromossomos X são marcados com dois genes, não alélicos, atuando na mesma célula, é possível demonstrar a ação de um ou do outro X alternadamente em todas as células, e em nenhuma célula os dois se encontram ativos concomitantemente (Lyon, 1966). Lyon (1963), por exemplo, realizou dois experimentos em camundongos. Num, com dois genes diferentes que afetam a cor da pele e, no outro, com dois genes que afetam sua textura.

Valeu-se, no primeiro, da translocação Cattanach, na qual parte de um autossomo, incluindo o alelo selvagem do gene "pink-eye", p, foi inserido no cromossomo X, e ainda se utilizou do mutante, recessivo ligado ao sexo, "dappled", Mo^{dp}.

Em camundongos fêmeas portadoras do mutante para a cor "dappled", Mo^{dp}, sobre um X e, no outro X a translocação, incluindo o alelo selvagem de "pink-eye", p, tanto o Mo^{dp} como a translocação atuavam em todas as células (Fig. V.5).

Nos testes em relação à textura do pelo, Lyon usou os genes "tabby", Ta, que altera a proporção dos vários tipos de pelos da pele, e "striated", Str, que resulta em pele curta; ambos produzem um efeito mosaico em heterozigose. Pela contagem da proporção de tipos de pelos nas regiões com pelo curto e nas regiões com pelo longo, foi possível mostrar que, em heterozigotos Ta⁺/+Str, Ta atua nas partes onde Str não atua, enquanto, em Ta Str⁺/++, ambos Ta e Str atuam em algumas partes e nenhum dos dois nas restantes. Estes experimentos confirmaram que somente um dos dois cromossomos X está ativo nas células somáticas de fêmeas de mamíferos, assim fornecendo uma prova crítica para a hipótese de Lyon.

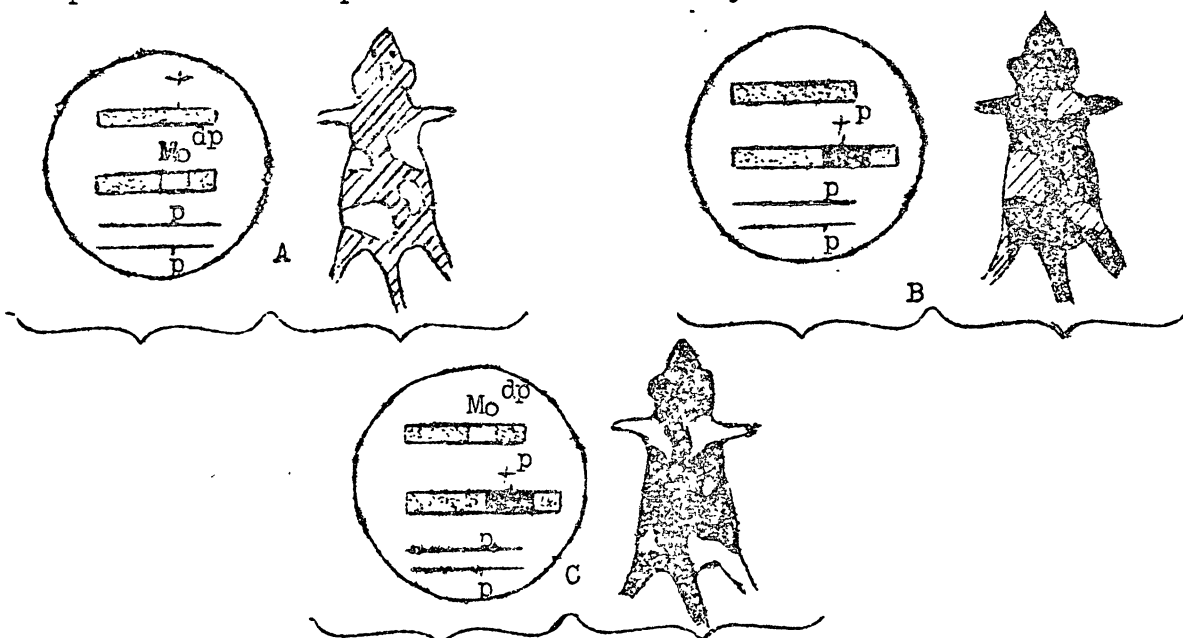


FIG. V-5. Teste de ação alternada dos cromossomos X em camundongos portadores de Mo^{dp} e translocação de Cattanach.

Uma outra demonstração da ação alternada dos dois cromossomos X em camundongos, foi realizada com o auxílio da translocação de Searle, uma translocação recíproca entre o X e um autossomo (Ford e Evans, 1964; Ohno e Lyon, 1965): geneticamente, fêmeas portadoras de Ta+, e tendo o alelo tipo selvagem de Ta no cromossomo X translocado, não mostram o efeito mosaico comum, mas o tipo selvagem. Imaginou-se que a causa tenha sido que, nessas fêmeas, a inativação dos dois cromossomos X não ocorresse ao acaso, mas que o X normal estivesse ativo em todas as células (Lyon e cols., 1964). Fêmeas duplamente heterozigotas, com Ta em um X e Blo no outro, foram obtidas. Em um animal cromossomicamente normal, este genótipo, resulta em um fenótipo listrado. Em heterozigotas para a translocação de Searle, entretanto, qualquer gene que está no X envolvido na translocação é totalmente expresso e o gene no X normal não o é. Isto demonstra a inatividade de um cromossomo X e também mostra que, o efeito variado (mottled) em fêmeas, depende da inativação ao acaso de um ou outro X (Fig.V.6) (apud Lyon, 1966).

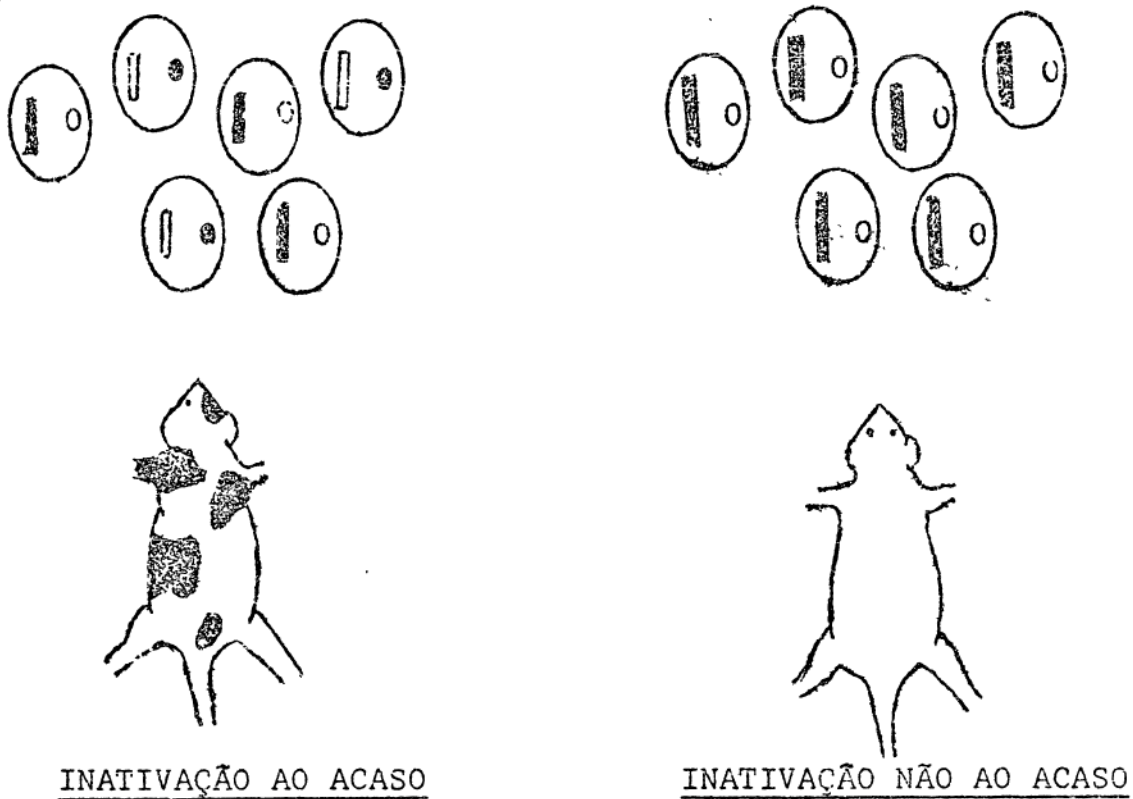


FIG. V.6- Representação diagramática do efeito da inativação do cromossomo X ao acaso e não ao acaso, sobre o fenótipo de fêmeas heterozigotas para um gene ligado ao sexo e expresso na pele (Lyon, 1966).

Cattanach (1963) realizou dois experimentos para testar a hipótese de Lyon com relação ao efeito de posição no camundongo. No primeiro, obteve fêmeas heterozigotas em repulsão para o gene ligado ao sexo "Brindled", Mo^{Br} , afetando a cor da pele, e uma translocação X-autossomo, que causa variação na cor da pele, com o gene autossômico albino, c ; no segundo, realizou seleção para alta e baixa quantidade de variação do efeito de posição, ao longo de várias gerações. Os resultados de ambas as experimentações levaram à conclusão de que o efeito de posição no camundongo é dependente da inativação do cromossomo X, mas que a extensão da inativação da união autossômica associada ao cromossomo X pode variar.

Para Lyon (1966), há três fatores que podem dificultar a verificação do mosaicismo esperado em fêmeas de mamíferos heterozigotas para genes ligados ao sexo:

- a. A taxa de formação dos tipos de células pode ser diferente.
- b. O período de vida entre células pode ser diferente.
- c. Pode haver difusão ou transferência do produto gênico de célula para célula.

Possíveis explicações para fenótipos anormais em indivíduos portadores de aneuploidias do cromossomo X são citadas no trabalho de Lyon (1966, 1968):

- a. Doses incorretas de cromossomos X, precocemente no desenvolvimento embrionário, antes de ocorrer a inativação de todos, menos um.
- b. Inativação incompleta de X inativo:
 1. Em alguns tecidos;
 2. Em alguns estágios do ciclo mitótico (Therkelsen e Petersen, em 1962; Therkelsen, em 1964);
 3. Em alguns "loci", por exemplo, o locus Xg .

Grüneberg (1967), no entanto, analisando um total de sessenta genes ligados, ou provavelmente ligados, ao sexo, não encontrou em trinta e quatro deles qualquer efeito conhecido na condição de heterozigose; em quatro, os efeitos gênicos conhecidos são humores que, passando de célula para célula, não poderiam apresentar qualquer informação a respeito da hipótese de Lyon; em dezessete, havia um efeito conhecido ou suspeito em mulheres heterozigotas, porém tornavam-se necessários, em todos, alguns "ad hoc" para suas interpretações; nos cinco restantes, efeitos heterozigóticos ao nível celular foram

identificados, apesar de que, em um deles (Xg), não se demonstraram ainda duas populações de células. Várias consequências, para Gröneberg, advêm em fêmeas heterozigotas para genes ligados ao sexo:

a. Para uma avaliação do fenótipo do heterozigoto precisam ser conhecidos ambos os hemizigotos (normal e mutante).

b. Onde um órgão ou estrutura é afetado em sua integridade no hemizigoto (tal como cor da pele), as partes contrastadas nos heterozigotos precisam estar dispostas ao acaso e não em um padrão.

c. Onde o fenótipo do hemizigoto anormal é por si mesmo um padrão, o surgimento de um padrão semelhante no heterozigoto não discrimina entre a hipótese de Lyon e a convencional semi-dominância.

d. As partes contrastadas nos heterozigotos precisam, claramente, corresponder aos fenótipos contrastados nos hemizigotos.

e. A ocorrência regular de grandes áreas de fenótipos uniformemente intermediários em heterozigotos é incompatível com a hipótese de Lyon, pois, em tais áreas, ambos os alelos precisam estar funcionando, concomitantemente, como em heterozigotos autossômicos comuns.

f. As partes contrastadas nos heterozigotos, para se ajustarem à hipótese de Lyon, precisam cobrir áreas iguais, em média, no agregado.

g. A manifestação das partes contrastadas no heterozigoto precisam ser neutras relativamente à seleção.

h. Se genes mímicos autossômicos e genes ligados ao sexo têm heterozigotos semelhantes, é ilegítimo invocar mecanismos diferentes para as suas respectivas origens.

29. - IDENTIDADE DO X INATIVO COM O CORPÚSCULO DA CROMATINA SEXUAL

Taylor, em 1960, segundo Mckusick (1962), observou, em hamster, heteropicnose positiva em células profásicas de fêmeas normais e incorporação asincrônica de timidina tritiada pelo ADN, ambos os fenômenos em um dos cromossomos X.

Fêmeas de camundongos com cariótipo X0, além de apresentarem um desenvolvimento fenotípico normal, não possuem cromossomo X heteropicnótico (Ohno e cols., em 1960, segundo Mckusick, 1962).

Há ainda evidências em indivíduos portadores de aneuploidias de cromossomos sexuais, em que o número de corpúsculos de cromatina sexual é sempre menor em uma unidade que o número de cromossomos X.

Ohno, Kaplan e Kinosita (1959) mostraram que um dos dois cromossomos X, em núcleos de células do fígado de fêmeas de ratos (Rattus norvegicus), apresentava-se em heteropicnose positiva na prófase mitótica, enquanto o único cromossomo X dos machos estava em isopicnose.

No camundongo, a identidade do X inativo com o corpúsculo da cromatina sexual também foi estabelecida pelo uso de uma translocação, a chamada "translocação Cattanach", que resulta num cromossomo X maior que todos os outros cromossomos e, por isso, morfologicamente reconhecível. Ohno e Cattanach, em 1962, segundo Lyon (1966), mostraram que, em camundongos portadores dessa translocação, um segmento autossômico com os alelos selvagens para a cor "chinchila" (ch) e "pink-eye" (p) foram translocados para o cromossomo X. Nas fêmeas heterozigotas, o cromossomo heteropicnótico era, ou o X com a translocação, ou o X normal, em diferentes partes do mesmo animal (Fig. III.4).

Chandley (1969), testando a hipótese da inativação ao acaso, independentemente da origem (materna ou paterna) da translocação Cattanach em fêmeas de camundongos, concluiu que a origem não interfere na proporção de cromossomos translocados inativados.

Mukherjee e Sinha, em 1964, segundo Lyon (1966), estudando mulas, cujos cromossomos X são claramente distintos, por provirem da égua e do jumento, encontraram, nas 33 células examinadas, o X da égua replicando tardiamente em 16 e o do jumento em 17. Hamerton e cols. (1969), no entanto, encontraram uma inativação preferencial do X de origem paterna (jumento).

Além disso, em mulheres com anormalidades estruturais do cromossomo X, há correspondência, em tamanho, entre o corpúsculo da cromatina sexual e o X com replicação tardia. Em mulheres portadoras de isocromossomos do braço longo do X, ficando, por isto, o X anormal maior do que o normal, os corpúsculos da cromatina sexual são grandes. Jacobs e cols., em 1961; Muldal e cols., em 1963, Gianelli, em 1963 e Muller e cols., em 1963, verificaram que o cromossomo X com replicação tardia é o cromossomo estruturalmente anormal (apud Lyon, 1966). Donde se pode concluir que a inativação do cromossomo X em mamíferos só ocorre ao acaso, quando são estruturalmente normais; quando tal não acontece, a inativação é preferencial para o estruturalmente anormal.

MECANISMOS DE INATIVACÃO

Pela existência de evidências, em várias espécies, sobre a inativação de cromossomos ou regiões de cromossomos, é natural se conjecture sobre o mecanismo pelo qual tal fenômeno se realiza.

Diz-se que os cromossomos inativos apresentam condensação, heteropicnose e replicação tardia. Alguns autores, segundo Lyon (1968), sugeriram que a condensação pode ser a causa da inatividade genética. Em fêmeas de mamíferos, nem todas as células mostram um cromossomo X condensado ou cromatina sexual. ~~Esta ausência seria causada pelo fato~~ do X inativo se tornar disperso durante os processos de replicação do ADN.

Comings (1967), porém, expôs fibroblastos de mulheres, por três minutos, à timidina tritiada e realizou imediata fixação. A autoradiografia demonstrou que o corpúsculo da cromatina sexual re-tém sua forma heterocromática durante a síntese de ADN, fato confirmado pela observação de que a percentagem de células cromatino-positivas não diferia significativamente das células no período S do ciclo celular, quando comparadas com células nos períodos G₁ e G₂. Logo, a falta do cromossomo X, condensado, não está relacionada à síntese de ADN.

Será que nas células cromatino-negativas ambos os cromossomos X estão ativos? Comings, em 1967, segundo Lyon (1968), des-creveu que culturas clonadas mostram a mesma proporção de células cro-matino-sexual negativas (aproximadamente 30%) que as culturas não-clonadas; e nestas, estudos de variantes de G-6PD têm mostrado que somente um cromossomo X está ativo. Comings também sugeriu que cél-ulas cromatino-sexual negativas contêm um X inativo em um estado não condensado. Isto implica que a condensação, levando à formação do cor-púsculo da cromatina sexual, não é causa da inatividade, mas sim, um fenômeno secundário.

Sugere-se, mas ainda sem provas, que a causa da in-ativação cromossômica se encontra na relação do ADN para com o componen-te proteico da fibra cromossômica. Berlowitz, em 1965, segundo Lyon (1968), mostrou que o grupo de cromossomos inativos do macho de coc-cídeos contém uma densidade ótica maior do que o grupo ativo, mas que esta histona não é rica em arginina. Frenster (1966) diz que tod-as cromatinas contêm histonas, que suprimem a atividade gênica, mas que, na cromatina geneticamente ativa, a histona é enriquecida com proteí-

nas ácidas ou outras substâncias polianiónicas, assim ~~d~~representando a atividade gênica (segundo Lyon, 1968). Himes (1967) encontrou que núcleos em células de milho com cromossomos B, tinham a mesma proporção ADN-histona do que as plantas sem os mesmos, mas, relativamente menos proteínas não-histônica.

Então, segundo Lyon (1968), a hipótese mais aceita, no presente momento, é a de que uma associação particular do ADN com uma certa espécie ou quantidade de proteína determina as outras propriedades.

A inatividade do ADN não é geral. O ADN inativo é aparentemente incapaz de reação com ARN polimerase para formar ARN mensageiro, mas em vista dos achados de Back e Dormer, em 1967, segundo Lyon (1968), é capaz de formar outros ARN. Faz a reação com ADN polimerase, em replicação normal, ainda que comece tardiamente e possa realizár mais rapidamente do que as outras cromatinas (Comings, 1967).

Em endoreduplicação levando à endopoliploidia ou à politenia, entretanto, cromossomos ou regiões inativas podem não ser capazes de replicação (Nur, em 1966; Berendes e Keyl, em 1967), segundo Lyon (1968).

Lyon (1968) acha que se pode visualizar a possibilidade da existência de um gene para a síntese da proteína acima referida. O mecanismo de sua união com o ADN é menos claro e há também a questão do "alastramento" do efeito inativante ao longo do cromossomo, que pode ser extensivo e delimitado precisamente. Por exemplo, em algumas espécies de mamíferos, todo um cromossomo X pode ser inativado, enquanto em outras espécies (hamster), um braço de um cromossomo X se mostra ativo, enquanto o outro braço está condensado e replicando tardamente no macho e em ambos os X da fêmea.

Evidências a respeito do "alastramento" da inativação provieram de estudos de translocações X-autossomos no camundongo, nos quais a inativação do X poderá atingir a segmentos autossômicos aderidos, mas somente até uma distância limitada (Russel, em 1963, segundo Lyon, 1968). Similarmente, há efeitos de posição em Drosophila melanogaster que parecem ser uma forma de inativação gênica; devido a translocações próximas à heterocromatina, o efeito se alastra por somente uma distância limitada, que pode ser alterada pela temperatura (Hartman-Goldstein, em 1967, segundo Lyon, 1968). Limitações do alastramento sugerem que, para a inativação de um cromossomo completo, deverá haver muitos genes, cada um com uma esfera limitada de influência (Lyon, 1968). Entretanto, se isto é assim, como é que ocorre a inativação total de um cromossomo enquanto o outro X homólogo, ou

partes de ambos, não são inativados? Russel (1964) sugere que sucessivos genes "controlantes", ao longo do cromossomo, precisam estar ligados a algum "gene maior" ou "centro de inativação", que poderá controlar os outros de uma maneira um tanto semelhante ao operon (apud Lyon, 1968).

Russel e Montgomery, em 1965, concluíram que, no cromossomo X do camundongo, o efeito inativante poderia se realizar em ambas as direções, diminuindo com o aumento da distância do centro de inativação; Cattanaach e Isaacson, em 1965, encontraram evidências de fatores genéticos afetando o grau de inativação de um segmento autosômico inserido e concluíram que poderia haver mais do que um centro de inativação.

FUNÇÕES DOS CROMOSSOMOS X INATIVOS

Se cromossomos ou regiões cromossômicas inativadas não apresentam qualquer função, por princípios biológicos gerais, esperar-se-ia que fossem eliminados durante a evolução. Sua presença sugere, porém, alguma função, ou então que ainda possam vir a ser eliminados no futuro.

Cooper, em 1959, segundo Lyon (1968), achou que cromossomos ou regiões que parecem inativos nos adultos podem apresentar alguma função em embriões, contendo genes cuja função somente se realiza precocemente no desenvolvimento e que são, presumivelmente, "desligados" no estágio adulto.

Indivíduos com aberrações numéricas do cromossomo X apresentam malformações. Uma possível causa disto seria uma má compensação de dose dos cromossomos X em seu desenvolvimento. Carr (1967), estudando aberrações cromossômicas em abortos espontâneos, encontrou uma proporção relativamente alta com tipo X0; logo, as anomalias neste tipo se desenvolvem suficientemente cedo para levarem à morte muitos embriões, aproximadamente no terceiro mês de gestação. Uma extensão da idéia de que regiões cromossômicas inativadas representam "genes desligados" é que diferentes regiões cromossômicas podem estar inativadas em diferentes tecidos. Testando esta possibilidade, Martin, em 1966, e Pflueger e Yunis, em 1966, segundo Lyon (1968), estudaram padrões de replicação de ADN em células de vários tecidos do hamster chinês, não encontrando diferença em padrões de replicação.

Outra possibilidade é que cromossomos ou regiões inativas

em células somáticas, tenham alguma função em células germinativas. O cromossomo Y de Drosophila melanogaster é heteropicnótico em células somáticas e aparentemente sem efeito fenotípico, mas machos sem Y são estéreis; em células germinativas de Drosophila hydei, o Y mostra estrutura aparentemente ativa, sintetizando ARN (Hess, em 1966, segundo Lyon, 1968).

Segundo Lyon (1968), em mamíferos, regiões do X e do Y, apresentando replicação tardia na porção somática, podem apresentar replicação sincrônica em espermatogônias. Entretanto, a isopicnose do X em células germinativas femininas não necessariamente implica em atividade, pois, em camundongos, os dois X da fêmea estão em isopicnose em oócitos e as fêmeas com um único X (X0) são tão férteis como as normais XX. O Y dos mamíferos, pelo menos em algumas espécies, apresenta replicação tardia em células somáticas e aparentemente é sem efeito fenotípico, ainda que apresente a função de ser, em estados embrionários, "determinante sexual".

Mittwoch (1967) sugeriu que a determinação do sexo em mamíferos depende de um balanço de heterocromatina.

Ohno (1962), para estimar a frequência com a qual o cromossomo X condensado participa na organização dos nucléolos, examinou trezentas figuras profásicas de fêmeas de camundongos. O cromossomo X em heteropicnose positiva estava associado com o nucléolo em trinta por cento das figuras em início de prófase, concluindo pela possibilidade de outras atividades genéticas ligadas ao sexo não serem dificultadas pela extrema condensação assumida pelo cromossomo X.

A L G U N S A S P E C T O S D A F R E Q U Ê N C I A D A
C R O M A T I N A S E X U A L N A E S P É C I E H U M A N A.

Desde que Barr e Bertram (1949) descreveram a diferença sexual na morfologia de núcleos dos neurônios de gatos, muitas observações foram realizadas em vários tipos de células humanas e de outros animais. Pesquisas, em grande escala, se tornaram possíveis em 1955, quando Moore e Barr introduziram a técnica do esfregaço de mucosa bucal.

Precisa ser reconhecido que, apesar do valor do método do esfregaço bucal, as preparações por ele realizadas apresentam somente uma estimativa da frequência e do tamanho do corpúsculo das cromatinas sexuais, pois técnicas padrões não podem eliminar variações causadas pelas condições da boca e de seu conteúdo em bactérias, assim como da capacidade do observador.

Para a análise da frequência de núcleos cromatino-positivos, é de bom alvitre só levar em consideração:

- a. Cromatina sexual periférica, isto é, aquela que se apresenta aderida à superfície interna da membrana nuclear. Evita-se, assim, em grande parte, a possibilidade de confusão com os possíveis cromocentros originados pela cromatina grosseira. Em consequência, os dados serão uma subestimativa da frequência;
- b. Núcleos cuja membrana esteja íntegra;
- c. Núcleos vesiculares, onde a coloração seja homogênea e não se apresente em picnose;
- d. Núcleos isolados e não superpostos;
- e. Núcleos não superpostos por bactérias;
- f. Uma quantidade razoável de núcleos devem ser analisados em cada lâmina;

g. Mais de um observador deve analisar cada lâmina.

I - Determinação pré-natal do sexo

Fuchs e cols. (1956) utilizaram fluido amniótico humano para determinar o sexo do feto, através da frequência de cromatina sexual. Nos vinte casos examinados, os resultados estavam de acordo com o sexo apresentado.

Exame de tecido placentário para determinação do sexo, através da morfologia nuclear, foi primeiramente realizado por Bohle e Hienz, em 1956, segundo Hienz e Stoll (1962). Usaram porções da placenta, como produtos da ectoderme fetal, e nelas procuraram determinar a positividade ou não dos núcleos em relação ao corpúsculo de Barr. O exame de 100 (cem) recém-natos (cinquenta homens e cinquenta mulheres) produziu, em cada caso, resultados idênticos entre o diagnóstico da morfologia nuclear do tecido conjuntivo do estroma da placenta e o sexo da criança.

Isto significa que, pelo exame de tecido da placenta se pode determinar o sexo do embrião, feto ou recém-nato, sem requerer o uso de tecido do indivíduo. O valor biológico do método está na possibilidade de ser realizado independentemente da presença do embrião como pode acontecer em abortos.

Heins e Stoll (1962) obtiveram 1.457 abortos do primeiro ao sexto mês de gestação, em condições de ser estudada a morfologia nuclear, para a determinação do sexo. A frequência de células com núcleos cromatino-positivos foi de 0,0 a 2,5% em masculinos e de 7,5 a 15% em abortos femininos, através de secções histológicas de 5 μ .

II - Em recém-natos

Há evidências de que a proporção de núcleos cromatino-positivos é menor em recém-natos do que em mulheres com mais idade.

Smith e cols. (1962) descreveram uma menor incidência de cromatina sexual em recém-nascidas. Taylor (1962 e 1963), fazendo esfregaço bucal de 464 meninas, logo após o nascimento e até o nono dia, usando como controle as próprias mães, notou que muitas das meninas estudadas mostraram uma menor incidência de cromatina sexual, especialmente durante os dois primeiros dias. Algumas crianças não apresentavam cromatina sexual. Os valores médios da incidência de cromatina sexual, entre as 20 crianças e suas mães, diferiam significativamente ($P < 0,01$), concluindo pela possibilidade da redução da evidência de

cromatina sexual em crianças, ser um reflexo de uma ou mais trocas metabólicas associadas com adaptações neo-natais, possivelmente pelos níveis extremamente altos de estrogênio neste período.

Hsu e cols., em 1967, segundo Curtis (1969), sugeriram que observações sobre a menor frequência de cromatina sexual em recém-nascidas seriam devidas à seleção inadequada de núcleos de um epitélio em degeneração.

Curtis (1969) também encontrou uma incidência significativamente menor de cromatina sexual em recém-natos quando comparadas com adultas. Notou também que esta frequência aumentava gradativamente com o passar dos dias (Tab. VI.1)

TAB. VI.1 - Frequência de cromatina sexual do primeiro ao sexto dia após o nascimento.

D I A S	1	2	3	4	5	6
Número de crianças	17	18	18	18	17	20
Média	28,82	33,70	38,16	39,2	37,97	38,95
Erro padrão	4,25	3,82	3,67	3,05	3,32	2,38

Obs.: Dados obtidos de Curtis (1969).

Golob, Israsena e Becker (1969), observando esfregaços da mucosa bucal e vaginal de 20 meninas fenotipicamente normais e recém-nascidas, do primeiro ao sétimo dia pós-parto, notaram que

1º - Na mucosa bucal

- Para obter 200 núcleos susceptíveis de análise, no primeiro dia pós-parto, precisava-se, em média encontrar 383,2 células, sendo diminuído este número para 289,8 no 7º dia pós-parto.
- A percentagem de núcleos picnóticos decrescia de 30,6%, no primeiro dia pós-parto, para 16,9% no quinto dia.
- A frequência de cromatina sexual era de 18,4% no primeiro dia, aumentando para 25,6% no quarto dia; daí em diante, permanecia inalterada. Este acréscimo é estatisticamente significativo.

2º - Na mucosa vaginal

- a. Entre as 400 células capazes de serem usadas para a determinação da atividade estrogênica, o número de células picnóticas decrescia de 23,9 no primeiro dia a 2,3 no sétimo dia pós-parto.
- b. A frequência de cromatina sexual aumentava de 1,8% a 4,6% do primeiro ao sétimo dia.

Notaram também a influência da técnica na frequência da cromatina sexual. Esfregaços vaginais e bucais, corados com Papanicolaou, apresentavam um menor incidência; porém, tanto o corante de tioina como o de Papanicolaou revelaram um acréscimo gradativo na frequência de cromatina sexual durante os primeiros dias pós-parto. Simultaneamente, havia um decréscimo da atividade estrogênica, indicado pelo decréscimo na incidência de células picnóticas nos esfregaços de células da vagina e da boca.

Isto, para Golob, Israsena e Becker, sugere a presença de uma relação causal entre atividade estrogênica e frequência de cromatina sexual.

III - No ciclo menstrual

Branco de Del campo e Ramirez (1965); Schmidt e cols. (1966); e Dokumov e Spasov (1968) verificaram que a frequência de cromatina sexual estava relacionada com o ciclo menstrual (Tab. VI.2).

TAB. VI.2 - Percentagem de células cromatino-sexual positivas na mucosa oral feminina em diferentes dias do ciclo menstrual.

GRUPO	I	II	III	IV	V	VI	VII
DIA	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20-	21-24	25-28
Percentagem média de cromatina sexual	31,71	30,58	27,75	30,59	30,37	29,32	28,57

Obs.: Dados de Schmidt e cols. (1966).

Dolan (1968); Christakos, Simpson e Bahrani, em 1969;

Brainerd, Mercer e Miles (1965) e Cavalli e cols. (1970_a, 1970_b e 1971) não encontraram, no entanto, correlação entre o ciclo menstrual e a frequência de cromatina sexual (Tab. VI.3).

TAB. VI.3 - Incidência de cromatina sexual de acordo com o ciclo menstrual normal de 20 jovens.

D I A	Percentagem média de cromatina sexual
1	38,20 ± 0,92
5	36,53 ± 1,06
12	36,05 ± 1,09
15	36,37 ± 0,72
24	37,09 ± 0,88

Obs.: Dados de Cavalli e cols. (1970_a).

No ciclo menstrual, não há, pois, a mesma concordância de dados entre os diversos autores, como ocorre na fase pós-natal.

IV - Incidência de cromatina sexual e volume nuclear

Levij e Meulendijk (1962), na base de considerações matemáticas, obtiveram uma fórmula para se obter a frequência de corpúsculos de cromatina sexual em aposição à membrana nuclear, em seções histológicas de tecidos femininos. Para Levij e Meulendijk, as variações na frequência de cromatina sexual periférica não seriam um fenômeno biológico, mas sim um resultado da limitação do poder de resolução do microscópio ótico, pois uma proporção de corpúsculos de Barr são projetados longe da membrana; assim, quanto maior for o diâmetro nuclear, maior será a possibilidade de tal projeção e, em consequência, menor a frequência de cromatina sexual periférica (Fig.VI.1). Pela fórmula, teríamos:

$$P = (r - h),$$

em que P = proporção de núcleo mostrando cromatina sexual periférica em exames histológicos; r = raio do núcleos; h = altura do segmento nuclear cortado por um plano paralelo ao plano de secção.

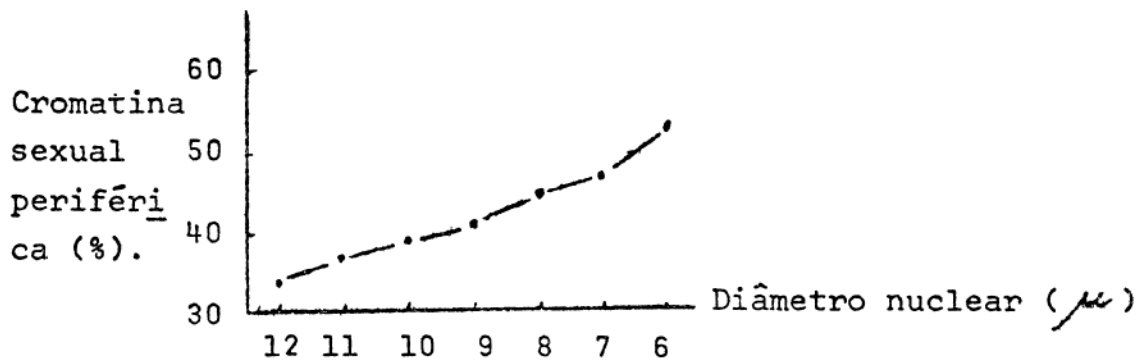


FIG. VI.1 - Frequência esperada de cromatina sexual periférica em núcleos com diferentes diâmetros médios, segundo Levij em 1967.

Para testar esta hipótese, Levij (1968) obteve esfregaços bucais de 20 jovens fenotipicamente normais. Determinou a frequência da cromatina sexual periférica bem como mediu o tamanho dos núcleos. Os resultados de Levij seguiram a relação predita em 1962 e 1967 (Tab. VI.4).

TAB. VI.4 - Frequência de corpúsculos de Barr e volume nuclear

Número de casos	2	3	5	6	4
Diâmetro nuclear-μ	< 8	8,0-8,4	8,5-8,9	9,0-9,4	9,5-10,0
Frequência média de cromatina sexual (%)	36	35	32	27	21

Obs.: Dados de Levij (1968).

Portanto, para Levij (1970, comunicação pessoal), as alterações na incidência de cromatina sexual periférica são puramente devidas a artefatos. Ocorrem variações no tamanho nuclear, entre outros fatores, como um resultado da ação hormonal possivelmente devido a trocas no conteúdo de água dos núcleos. Pode-se dizer, daí, que a frequência de cromatina sexual está relacionada a fatores hormonais, mas de uma maneira indireta.

Waldrigues e cols. (1970), no entanto, numa análise preliminar de dados obtidos em mucosa bucal de mulheres normais, observaram que, apesar de ocorrer a variação característica na frequência

de cromatina sexual, praticamente não apresentava variações a distribuição dos valores nucleares (proporcionais aos volumes), resultantes do produto do maior pelo menor diâmetro nuclear, perpendiculares entre si.

Protich, Spasov e Dokumov (1968) notaram que, em indivíduos do sexo masculino, após tratamento com hormônios sexuais, estradiol e testosterona, não se altera a incidência de cromatina sexual periférica.

V - Em gestantes

Em gestantes, os níveis dos hormônios estão em geral alterados, em particular a excreção de estrogênio pela urina que é de 100 a 1000 vezes maior do que em não-gestantes (Merril, em 1958, segundo Curtis, 1969).

Curtis (1969) obteve esfregaços bucais de 8 mulheres grávidas, aproximadamente com 35 semanas de gestação, comparando-os com os de mulheres normais; os desvios não foram estatisticamente significantes ($t = 1,54$; $P > 0,05$).

Moro, Waldrigues e Marçallo (não publicado), em estudos de mulheres no 7º, 8º e 9º mês de gestação, e no 1º, 2º, 7º, 15º e 30º dia pós-parto, não encontraram diferença estatisticamente significativa na incidência de núcleos cromatino-positivos periféricamente.

VI - Por idade

Waldrigues e cols. (não publicado), numa análise da frequência de células cromatino-sexual positivas, periféricamente, em diversas idades, encontraram uma variância estatisticamente significativa ($F = 3,527$; $P < 0,01$) entre idades, e não significativa ($F = 1,278$; $P > 0,05$) dentro de cada grupo etário de mulheres normais. A menor incidência ocorreu entre os 10 e 13 anos, coincidentemente com a época da menarca (Tab. VI.5).

Curtis (1969) analisando esfregaços de mucosa bucal de 20 mulheres normais com idade entre 18 e 20 anos, encontrou uma incidência média de $41,5 \pm 2,5\%$ (cromatina periférica). Sem Gupta (1968), usando esfregaços de mucosa nasal de mulheres normais, corados com cresil-violeta, obteve uma média de 25 a 30% de núcleos cromatino-positivos. Em mucosa bucal, com cresil-violeta, Dixon e Torr (1956) encontraram, na maioria das 95 mulheres analisadas, de 30 a 50% das células com uma massa de cromatina sexual (Tab. VI.6).

TAB. VI.5 - Distribuição das frequências de núcleos cromatino-positivos, em mulheres normais, por idade.

N	IDADE	TOTAL DE NÚCLEOS EXAMINADOS	FREQUÊNCIA DE CROMATINA SEXUAL (%)
15	7	1601	30,86
28	8	3348	30,88
14	9	1898	30,87
14	10	2661	26,91
13	11	2601	23,91
9	12	1764	25,34
13	13	1643	26,84
13	14	1621	28,69
4	15	451	34,37
5	16	739	31,12
2	17	461	35,57
17	18	2341	35,16
15	19	1955	32,79
23	20	2906	32,90
8	21	888	31,53
12	22	1294	35,70
7	23	863	31,75
3	24	309	32,69
4	25	531	31,45
2	26	211	30,81

Obs.: Dados de Waldrigues e cols. (não publicados).

TAB. VI.6 - Frequência de cromatina sexual em 95 mulheres

PERCENTAGEM	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64
Nº DE INDIVÍDUOS	3	0	5	11	12	21	14	10	6	6	2	1

Obs.: Dados de Dixon e Torr (1956).

Eskelund (1956) descreveu um método para células do epitélio descamante da bexiga, presentes na urina, com a finalidade de se verificar a presença da cromatina sexual.

VII - Ação de drogas

Sohval e Casselman (1961), estudando o efeito de antibióticos sobre o corpúsculo da cromatina sexual, notaram que apesar dos mesmos não alterarem sua frequência, alteram seu tamanho. Utilizaram "aureomicina" (clortetraciclina), "cloromicetina" (cloranfenicol), "pentids 400" (benzilpenicilina de potássio) e "gantrisin" (sulfaixazol) (Tab. VI.7).

Dokumov (1970, comunicação pessoal) acha que há uma correlação real entre padrões de cromatina sexual e diferentes hormônios esteróides (cortisona, hidrocortisona, dexametasona, progesterona e estrogênio). Para ele, a influência se exerce sobre o tamanho, a forma e frequência da cromatina sexual, não dependendo essa ação apenas do hormônio administrado, mas também da sua dose. De outra maneira, estados biológicos caracterizados por uma nítida mudança de níveis hormonais, por exemplo, gestação, são acompanhados por uma mudança correspondente do padrão de cromatina sexual. Para Dokumov, essas alterações não são devidas a artefatos de técnicas, mas representam um fato biológico.

VIII - Em queimaduras

Weste e cols. (1967) encontraram numa menina com queimaduras, uma frequência de cromatina sexual inexplicavelmente baixa; essa frequência, após uma semana, voltou ao normal. Por causa deste achado, examinaram esfregaços bucais diários, na primeira semana após a queimadura, de 30 crianças do sexo feminino. Encontraram uma redução inicial da frequência comum, e, em algumas, havia também uma anormalidade morfológica nos corpúsculos cromatínicos. Comparando esses resultados com os de crianças internadas no hospital por outras causas, que não queimaduras, a menor frequência verificada em pacientes com queimaduras mostrou-se estatisticamente significativa. Concluíram pela possibilidade desses efeitos serem resultantes do aumento da atividade adrenocortical após queimaduras.

IX - Em indivíduos do sexo masculino

Hambert (1955), numa amostra não selecionada de 2.752 adultos, encontrou seis casos (0,22%) de cromatina sexual positiva.

Stewart e Sanderson (1961), estudando testículos de homens normais, observaram a presença de uma estrutura aparentemente idêntica ao corpúsculo da cromatina sexual em 10% dos núcleos das células

TAB. VI.7 - Influências de vários antibióticos na dimensão e prevalência do corpúsculo de Barr na mucosa bucal.

Antibióticos e nº de dias administrados	Paciente número	CORPÚSCULOS DE BARR				Redução em área média (%)
		A N T E S		A P Ó S		
		Tamanho médio (µ)	Prevalência (%)	Tamanho médio (µ)	Prevalência (%)	
Clortetraciclina						
Tópica 2	1	0,78x1,2	20	0,52x0,76	20	57
Tópica 4	2	0,74x1,1	17	0,48x0,85	19	50
Oral 4	1	0,75x1,1	19	0,58x0,84	18	42
Oral 4	2	0,74x1,1	17	0,59x0,85	18	38
Oral 4	3	0,65x1,18	20	0,54x0,85	19	40
Oral 7				0,44x0,75	19	57
Oral 4	4*	0,71x1,16	18	0,54x0,88	13	42
Oral 7				0,52x0,96	17	39
Cloranfenicol						
3 1/3	1	0,74x1,11	18	0,43x0,75	25	61
3 1/3	2	0,74x1,1	18	0,39x0,74	20	65
Benzilpenicilina de potássio						
3 1/3	1	0,83x1,2	23	0,46x0,77	18	64
4	5	0,59x1,15	26	0,55x0,91	27	26
7				0,50x0,77	28	43
11				0,55x0,75	25	39
14				0,47x0,70	28	51
Sulfaisoxazol						
7	2	0,73x1,1	19	0,58x1,05	16	29
12				0,50x0,96	16	41

Obs.: 4* Paciente com síndrome de Klinefelter.

Dados de Sohval e Casselman (1961).

lulas germinativas. Tal corpúsculo era visível em espermatogônias, espermátócitos primários e secundários. Apresenta-se mais nitidamente em núcleos de espermátócitos primários, sendo que, em alguns desses, parece haver uma conexão com o nucléolo através de um delgado filamen

to cromatínico.

Close e cols. (1968) constataram 1,2% de indivíduos cromatino-positivos entre todos os pacientes adultos e do sexo masculino, de um hospital.

Em biópsia de pele de homens, uma massa cromatínica análoga à cromatina sexual. porém, na grande maioria das vezes muito menor, foi encontrada, por Carpentier (1962), em 3 a 5% dos núcleos das células epiteliais.

X - Em indivíduos com anormalidades mentais

Casey e cols. (1968) verificaram que a frequência de cromatina sexual era significativamente maior em indivíduos que requeriam cuidados especiais, por causas de violência e agressividade, do que em outra população de indivíduos mentalmente anormais.

Ferguson-Smith, em 1958 e 1959; Prader e cols., em 1958; Carr, Barr e Plunkett, em 1961; Forssman e Lambert, em 1963, (apud Márquez-Monter, Santiago-Payán e Kofman-Alfaro (1968), encontraram, em estudos de cromatina sexual realizado em instituições para crianças retardadas mentais, uma frequência consideravelmente maior de anormalidades cromatínicas em relação à população em geral. Barr e Carr (1960), por exemplo, estimaram que a frequência da síndrome de Klinefelter cromatino-positivo na população em geral é de 1/500, mas entre retardados mentais é de 1/100.

Márquez-Monter, Santiago-Payán e Kofman-Alfaro (1968_a), estudando mucosa bucal de 1.000 crianças com retardamento mental (QI entre 50 e 80) e com idade entre 6 e 14 anos, encontraram, entre 623 meninos, 5 (0,8%) que eram cromatino-positivos; em um deles, havia 2 corpúsculos cromatínicos. Uma (0,26%) menina, entre as 377 estudadas, era cromatino-negativo.

Márquez-Monter, Carnevale-López e Kofman-Alfaro (1968_b), em uma pesquisa onde analisaram esfregaços bucais de 3.000 recém-nascidos, encontraram, entre 1484 meninos, 4 (0,26%) com núcleos cromatino-positivos, e, entre 1516 meninas, 3 (0,19%) com núcleos cromatino-negativos.

Tsuboi e cols. (1966), numa amostra de 904 esquizofrênicos, verificaram que eram cromatino-positivos dois dos 480 homens (0,42%) e duas entre as 424 mulheres (0,47%) apresentaram dupla cromatina sexual (Tab.VI.8).

Observando-se as frequências de anormalidades, em cromatina sexual, entre indivíduos com anormalidades mentais e normais, no

ta-se, entre os últimos, uma menor frequência (Tab. VI.8).

TAB. VI.8 - Frequência de cromatina sexual em várias condições.

ANORMALIDADES EM CROMATINA SEXUAL	ESQUIZOFRÊNICOS		RECÉM- NASCIDOS	RETARDA- DOS MEN- TAIS
	ESTUDOS ANTERIORES	ESTUDOS DE Tsuboi e cols.		
Homens cromatino- positivos	0,71%	0,42%	0,26%	0,91%
Mulheres com dupla cromatina sexual	0,50%	0,47%	0,06%	0,43%

Obs.: Dados de Tsuboi e cols. (1966).

XI - Em mola hidatiforme.

Oliphant, Westerhout e Schwinn (1968), estudando 51 casos de mola hidatiforme, encontraram 46 (96%) cromatino-positivos. Parecendo, portanto, haver uma maior susceptibilidade de um embrião do sexo feminino vir a formar a mola hidatiforme.

XII - Em tumores

a. Hiperplasias e tumores somáticos benígnos.

O sexo nuclear de tecidos hiperplásicos e tumores benígnos está de acordo com o sexo nuclear do indivíduo. Veja-se, por exemplo, a revisão feita por Tavares (1966). As percentagens de cromatina verificadas naqueles tecidos são semelhantes às obtidas em tecidos normais.

b. Em tumores malígnos

b.1 - Câncer de mama

Langlands e Cathels (1967), analisando 71 mulheres com câncer de mama e 191 controles, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre as frequências de cromatina sexual em esfregaços da mucosa bucal dos dois grupos.

Ramirez e Cuadrillero (1962) encontraram, em mastopatias precancerosas cerca de 30% cromatino-negativos.

Soos e Knotte, em 1967, segundo Atkin (1967_b), encontraram uma menor frequência de cromatina sexual em tecido de tumor que em tecido normal, e acham que isto é devido, principalmente, à destruição das estruturas nucleares. Aparecendo, portanto, mais em tumores imaturos, de rápido crescimento. Esses achados não foram confirmados por Atkin (1967_b).

Wacker e Miles (1966), estudando 50 pacientes, encontraram uma correlação linear positiva entre percentagem de células de tumor com cromatina sexual e tempo de sobrevivência para pacientes que morriam dentro de 8 anos a partir do início do tratamento. Pacientes que sobreviviam mais de 8 anos, apresentavam, em média, uma frequência maior de células de tumor com cromatina sexual (Fig.VI.3).

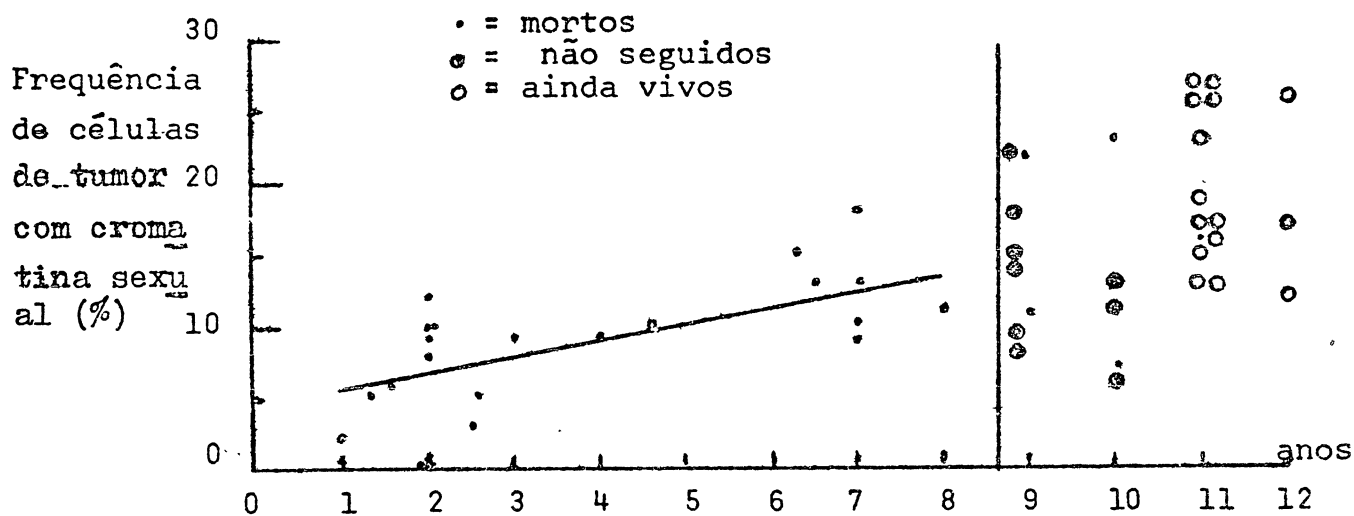


FIG.VI.3 - Correlação linear entre a frequência de cromatina sexual e o tempo de sobrevivência de pacientes portadores de câncer de mama, segundo Wacker e Miles (1966).

Yule, Howell e Verrill (1969) fizeram esfregaços de mucosa bucal em três grupos de mulheres: a. controles normais (64), b. com câncer de mama (391) e c. com câncer do colo de útero (274). A análise de variância entre os três grupos não se mostrou significativa.

Siracká e Siracký (1969), estudando pacientes com câncer de mama com metástases ósseas, verificaram que, nos casos de cromatina sexual positiva, havia uma diferença média na sobrevivência dos pacientes com metástases solitárias em relação aos com metástases multiloculares. Esta diferença não era evidente nos casos de cromatina sexual negativa (Tab. V.9).

Kimel (1957), estudando 91 casos de câncer de mama, le-

vando em consideração a incidência de cromatina sexual em células do tumor, o tipo de tumor, a idade do paciente no início da doença, a história de menopausa, a hiperplasia do córtex do estroma do ovário e a resposta à terapia hormonal, observou que cânceres de mama podem mostrar contagem de cromatina sexual diferente dos tecidos normais. Havia também evidências que sugeriam que tumores com alta frequência de cromatina sexual são clinicamente dependentes de estrógenos, enquanto os que se apresentam com baixa frequência não o são.

TAB: VI.9 - Sobrevivência em câncer de mama com metástases ósseas do começo da aplicação hormonal até a morte.

Estádio originário	Cromatina sexual positiva		Cromatina sexual negativa	
	Sobrevivência média em meses		Sobrevivência média em meses	
	Solitário	Multilocular	Solitário	Multilocular
I	48	10	-	-
II	44	15	5	5
III	13	11	3	3
IV	17	23	-	6

Obs.: Dados de Siracká e Siracký (1969).

b.2 - Em colo de útero

Atkin (1967_a), analisando 363 casos de tumores de colo de útero, encontrou, em dois casos, tripla cromatina sexual (Tab VI.10).

TAB.VI.10 - Cromatina sexual em 363 casos de tumores de colo de útero

	Corpúsculos de cromatina sexual por núcleo				TOTAL
	0	1	2	3	
a. células escamosas	120	156	31	2	309
b. adenoacantoma	15	23	3	-	41
c. adenocarcinoma	6	5	2	-	13
TOTAL	141	184	36	2	363

Obs.: Dados de Atkin (1967_a).

Atkin (1967_c) encontrou uma alta frequência de células com telófase condensada, com padrão cromatínico, em cerca de 10% dos carcinomas de colo de útero, fato também observado em carcinoma in-situ de colo de útero. Este fenômeno foi verificado em regiões com crescimento ativo, presumindo-se que represente um prolongamento da telófase, ou uma retenção do padrão cromatínico telofásico durante a primeira parte da interfase. Atkin mediu a quantidade de ADN nas células de dois tumores e observou que a maioria das células com este padrão tinha uma "dose simples" de ADN.

Forni e Miles (1966), analisando 9 pacientes com carcinoma de colo de útero, observaram que, quando presentes em células cancerosas, os corpúsculos de cromatina sexual aparecem muitas vezes duplos ou anormalmente grandes. Sugerem que isto possa ser causado pelo aumento do número de células tetraplóides.

Siracký (1967), estudando 225 casos de carcinoma epidermóide de colo uterino, encontrou a distribuição apresentada na Tab. VI.11.

TAB. VI.11 - Cromatina sexual em 225 casos de câncer de colo de útero.

Percentagem média de cromatina sexual	Número de casos	Classificação geral
0 - 9	51	Cromatina sexual negativa
10 - 19	19	Casos duvidosos
20 - 29	67	Cromatina sexual positiva
30 - 39	37	
40 - 49	30	
50 - 59	8	
60 - 69	7	
70 - 79	6	

Obs.: Dados de Siracký (1967).

Siracký (1967), fazendo classificação histológica dos carcinomas de colo de útero, obteve uma menor frequência de cromatina sexual no tipo indiferenciado (Tab. VI.12). Por outro lado, determinando a frequência desse corpúsculo, segundo o estágio clínico, observou uma distribuição um tanto quanto variável, porém, menor

nos estágios III e IV (Tab. VI.13).

TAB. VI.12 - Relação entre a classificação histológica e incidência de cromatina sexual.

TIPO HISTOLÓGICO	C R O M A T I N A S E X U A L	
	P O S I T I V A	N E G A T I V A
Queratinizado	23 (14,8%)	7 (13,7%)
Diferenciado	101 (65,2%)	19 (37,3%)
Indiferenciado	31 (20,0%)	25 (49,0%)
T O T A L	155	51

Obs.: Dados de Siracký (1967)

TAB. VI.13 - Relação entre estágio clínico e incidência de cromatina sexual.

E S T Á G I O	C R O M A T I N A S E X U A L	
	P O S I T I V A	N E G A T I V A
I	56 (36,1%)	13 (25,5%)
II	65 (41,9%)	19 (37,3%)
III	33 (21,3%)	15 (29,4%)
IV	1 (0,7%)	4 (7,8%)
T O T A L	155	51

Obs.: Dados de Siracký (1967)

Atkin (1967_d) obteve melhores colorações, para cromatina sexual em esfregaços de colo de útero, com orceína do que com Papanicolau.

Naujoks (1969), examinando células anormais exfoliadas de carcinoma-in-situ de colo de útero, encontrou uma incidência média de núcleos cromatina-positivos de 13%. Uma única célula com dois corpúsculos cromatínicos foi encontrada em seis casos e uma célula com três corpúsculos em um caso.

Atkin (1969) observando tipos de variantes nucleares, em tumores ginecológicos, em esmagamentos (squashes) e esfregaços, achou que variações do padrão cromatínico normal (em tumores femininos) e alterações (comumente aumentos) predominantes no tamanho nuclear ocorrem comumente, e podem estar relacionadas com alterações cariotípicas nas células do tumor. Outras variações nucleares, foram observadas, embora menos frequentes:

1. Protusão dos núcleos;
2. Múltiplos cromocentros;
3. Padrão telofásico.

b.3 - Outros tumores

O estudo de uma série de carcinomas de pele, realizado por Hunter e Lennox, em 1954, levou-os a concluir que esses tumores malignos apresentam um sexo nuclear idêntico ao do paciente. Tavares, em 1955, no entanto, encontrou, em dois carcinomas de pele, em pacientes do sexo feminino, uma incidência menor de cromatina sexual do que em tecidos normais (apud Tavares, 1966). Ashley e Theiss (1958), no entanto, ao estudarem 75 pacientes com tumores de testículos, não observaram alterações no padrão cromatínico.

A partir desses dados, pode-se concluir que, em geral o sexo nuclear, em tumores benígnos e malignos não teratóides, é idêntico ao do paciente; ainda que, em crescimentos malignos femininos, alterações no cariótipo frequentemente alteram significativamente a proporção de células com cromatina sexual.

Em teratomas, o desenvolvimento da cromatina sexual depende do sexo do paciente; discrepâncias são praticamente limitadas aos tumores desenvolvidos no sexo masculino (Fig. VI.2) (Moore e Barr, 1957).

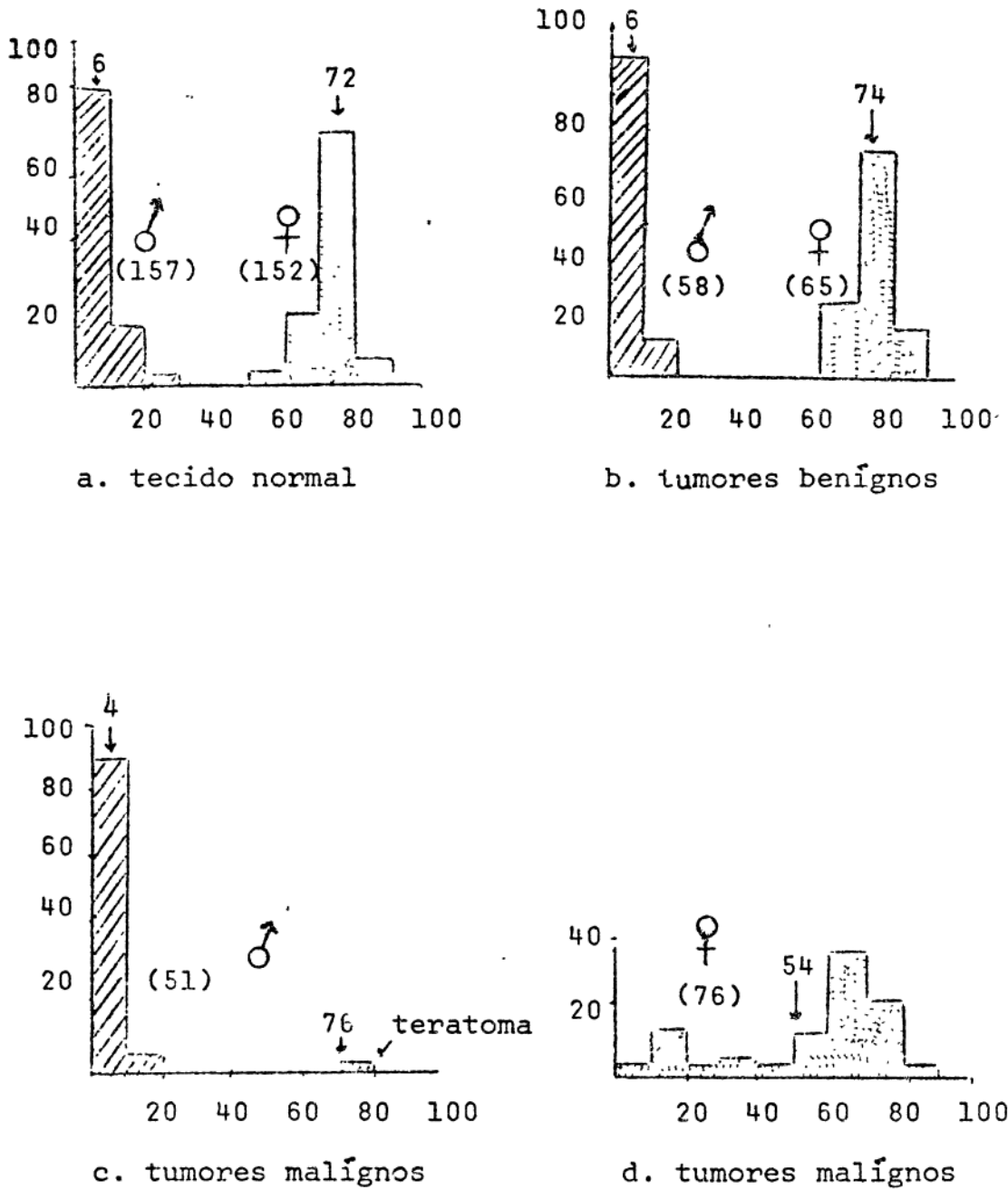


FIG. VI.2 - Histogramas ilustrando a frequência de cromatina sexual em tecidos normais, tumores benignos e malignos em homens e mulheres. As percentagens de núcleos com cromatina sexual estão nas abcissas e as percentagens de espécimes nas ordenadas. As médias das frequências estão indicadas por setas.

Obs.: Dados de Moore e Barr (1957).

C O N C L U S Õ E S

Descrito, pela primeira vez, por Cajal (1909); correlacionado com o sexo por Barr e Bertram (1949); originado a partir de um único cromossomo X, que se encontra condensado em interfase e em heteropicnose positiva em prófase (Ohno Kaplan e Kinoshita, 1959); o corpúsculo da cromatina sexual é de grande importância no diagnóstico das anomalias do desenvolvimento sexual.

O material heterocromático que compõe o corpúsculo da cromatina-X foi denominado, por Brown (1966), de heterocromatina facultativa; sendo admitido ser geneticamente inativo e de participar de um mecanismo de compensação de dose (hipótese de Lyon, 1961). Tal corpúsculo apresenta-se ora junto ao nucléolo, ora livre no nucleoplasma ora aderido à superfície interna da membrana nuclear, nesse caso adquirindo a forma plano-convexa.

O corpúsculo de Barr aparece, pela primeira vez, no embrião, ao se iniciar a diferenciação somática, na época da sua implantação (Austin e Amoroso, 1957; Park, 1957; Glenister, 1956; Axelsson, 1968; Ohno, 1964; Melander, 1962); e, sendo característico do sexo feminino, entre os mamíferos, acarreta uma diferença sexual na morfologia dos núcleos de suas células, bem como permite predizer o número de cromossomos X presentes em um indivíduo.

Através do corpúsculo da cromatina sexual, também se pode determinar o sexo de um indivíduo antes do seu nascimento (Fuchs e cols., 1956; Bohle e Hienz, 1956; Hienz e Stoll, 1962), sendo isto de capital importância em países onde o aborto pode ser legalmente praticado (Japão) nos casos de grande risco da criança vir a sofrer de anomalia grave, decorrente de fatores hereditários, se for do sexo masculino.

A frequência do corpúsculo da cromatina sexual, aderida à membrana nuclear, parece variar em alguns estágios do desenvol-

vimento normal humano (p. ex. período pós-natal, Smith e cols., 1962; Taylor, 1962 e 1963; Curtis, 1969; Golob, Israsena e Becker, 1969), bem como em estados anormais (queimaduras, Weste e cols., 1967; administração de antibióticos, Sohval e Casselman, 1961; e em tumores malignos, Tavares, 1966).

A determinação do corpúsculo da cromatina-X foi utilizada, por Davidson e cols., em 1957, para estudos do comportamento de transplantes da medula, e por Woodruff e Lennox, em 1959, em transplantes de pele, e até mesmo em medicina forense por Dixon e Torr, em 1956 (apud Bartalos e Baramki, 1967).

B I B L I O G R A F I A

001. Ashley,D.J.B. e Theiss,E.A. (1958).
Nuclear sex of patients with testicular tumors.
Science, 128:1434.
002. Atkin,N.B. (1960)
Sex Chromatin and chromosomal variation in human tumours.
Acta Un.Int.Canc .., 16:41-45.
003. Atkin,N.B. (1967_a)
Triple sex chromatin, and other sex chromatin anomalies, in
tumours of females.
Brit.J.Cancer., 21:40-47.
004. Atkin,N.B. (1967_b)
Sex chromatin in female breast cancer.
Lancet, ii:1145-1146.
005. Atkin,N.B. (1967_c)
A high incidence of cells with a condensed (telophase) chro-
matin pattern in human tumors and carcinoma-in-situ.
Acta Cytologica, 11:81-85.
006. Atkin,N.B. (1967_d)
Sex chromatin in cervical smears.
Acta Cytologica, 11:435-436.
007. Atkin,N.B. (1969)
Variant nuclear types in gynecologic tumors: bservations
on squashes and smears.
Acta Cytologica, 13:569-575
008. Austin,C.R. e Amoroso,E.C. (1957)
Sex chromatin in early cat embryos.
Exp.Cell Res., 13:419-421
009. Axelson,M (1968)
Sex chromatin in early pig embryos.
Hereditas, 60:347-354
010. Barr,M.L. (1939)
Some observations on the morphology of the synapse in the
cat's spinal cord.
J.Anatomy, 64:1-11
011. Barr,M.L. (1940)
Axon reaction in motor neurons and its effects upon the end-
bulbs of held-auerbach.
Anatomical Record, 77:367-374

012. Barr, M.L. e Bertram, E.G. (1949)
A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis.
Nature, 163:676-678
013. Barr, M.L. (1951)
The morphology of neuroglial nuclei in the cat, according to sex.
Exp.Res., 2:288-290
014. Barr, M.L. e Carr, D.H. (1960)
Sex chromatin, sex chromosomes and sex anomalies.
Canad.M.A.J., 83:979-986
015. Bartalos, M. e Baramki, T.A. (1967)
Medical Cytogenetics.
The Willians & Wilkins Co., Baltimore, 419 págs. (pp. 71-86)
016. Beath, M. e Benirschke, K. (1962)
The sex chromatin of interphase nuclei in Platyrrhine monkeys.
Cytologia, 27:1-10
017. Beiguelman, B. (1967)
Citogenética Humana
Vol.I, Livraria Editôra Ltda. (EDART), São Paulo, 79 págs. (pp.64-79)
018. Berenbaum, M.C. (1960)
Determination of sex in granulopoietic cells of mice and rats.
Nature, 12:603-604
019. Berlowitz, L. (1965)
Correlation of genetic activity, heterochromatization, and RNA metabolism.
Genetics, 53:68-73
020. Beutler, E., Yeh, M. e Fairbanks, V.F. (1962)
The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: Studies using the gene for G-6-PD-deficiency as a marker.
Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 48:9-16
021. Beutler, E. e Baluda, M.C. (1964)
The separation of glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient erythrocytes from the blood of heterozygotes for glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency.
Lancet, i:188-192

022. Brainerd, T., Mercer, C. e Miles, C.P. (1965)
Absence of correlation between sex chromatin incidence and
menstrual cycle.
Acta Cytologica, 9:440-441
023. Branco de Del Campo, M.S. e Ramirez, O.E.G. (1965)
Fluctuations of sex chromatin during the menstrual cycle.
Acta Cytologica, 9:251-256
024. Brock, W.E., Buckner, R.G., Hampton, J.W., Bird, R.M, e Wulz, C.E.
(1963).
Canine hemophilia.
Arch.Path., 76:464-469
025. Brown, S.W. e Nelson-Rees, W.A. (1961)
Radiation analysis of a lecanoid genetic system.
Genetics, 46:983-1007
026. Brown, S.W. (1966)
Heterochromatin.
Science, 151:417-425
027. Cantwell, G.E., Johnston, E.F. e Zeller, J.H. (1958)
The sex chromatin of swine intersexes.
J.Hered., 44:199-201
028. Carr, D.H. (1967)
Chromosome anomalies as a cause of spontaneous abortions.
Am.J.Obst.Gynec., St.Louis, 97:283-293
029. Carpentier, P.J. (1962)
Evaluation of sex chromatin in smears from the reproductive
and urinary tracts.
Acta Cytologica, 6:25-33
030. Casey, M.D., Street, D.R.K., Segali, L.J. e Blank, C.E. (1968)
Patients with sex chromatin abnormality in two State hospitals
Ann.Hum.Genet., Lond., 32:53-63
031. Castro, M.M.de e Sasso, W.da S. (1959).
Sex chromatin ("Chromoleme") in the Purkinje nerve cells of
some mammals.
Nature, 184:293
032. Cattanach, B.M. (1963)
The inactive-X hypothesis and position effects in the mouse.
Genetics, 48:884-885

033. Cavalli, I.J., Waldrigues, A., Stueber, N. e Marçallo, F.A.(1970_a)
Sex chromatin and menstrual cycle.
Lancet, ii:832
034. Cavalli, I.J., Waldrigues, A., Stueber, N. e Marçallo, F.A.(1970_b)
Frequência de núcleos cromatino-positivos durante o ciclo mens-
trual.
Resumos da XXII Reunião Anual da S.B.P.B., E-104, 441 págs.
(pp.130)
035. Cavalli, I.J., Stueber, N., Marçallo, F.A. e Waldrigues, A.(1971)
Incidência de núcleos cromatino-positivos em dois ciclos mens-
truais humanos.
Resumos da XXIII Reunião Anual da S.B.P.C., F-63, 449 págs.
(pp.113)
036. Chandley, A.C. (1969)
Paternal versus maternal inactivation in the X chromosome of fe-
male mice.
Nature, 221:70
037. Christakos, A.C., Simpson, J.L. e Bahrani, A. (1969)
Sex chromatin and the human menstrual cycle: Absence of cyclic
variation in the sex chromatin frequency.
J.Reprod.Med., 11:87-90
038. Close, H.G., Goonetilleke, A.S.R., Jacobs, P.A. e Price, W.H.
(1968)
The incidence of sex chromosomal abnormalities in mentally sub-
normal males.
Cytogenetics, 7:277-285
039. Cohem, F., Zuelser, W.W., Evans, M.M. e Reed, T.E. (1964)
Fluorescent-antibody technique and the Lyon hypothesis.
Lancet, i:1392-1393
040. Comings, D.E. (1967_a)
Histones of genetically active and inactive chromatin.
J.Cell Biol., 35:699-708
041. Comings, D.E. (1967_b)
The duration of replication of the inactive X chromosome in hu-
man based on the persistence of the heterochromatic sex chroma-
tin body during DNA synthesis.
Cytogenetics, 6:20-37

042. Crouch, Y.F. e Barr, M.L. (1953)
Behaviour of the sex chromatin during axon reaction.
J. Neuropath. Exp. Neurol., 12:353-358
043. Curtis, D.J. (1969).
Sex chromatin frequency in buccal mucosal tissue: the normal female population.
Cytogenetics, 8:20:29
044. Davidson, R.G., Nitowski, H.M. e Childs, B. (1963).
Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 50:481-485
045. Davidson, R.G. (1964).
The Lyon hypothesis.
J. Pediatrics, 65:765-775
046. DeMars, R. (1962).
Sex chromatin mass in living, cultivated human cells.
Science, 138:980-981
047. Dixon, A.D. e Torr, J.B.D. (1956)
Sex chromatin in oral smears.
Brit. M. J., 2:799-800
048. Dolan, S.B.E. (1968)
Sex chromatin incidence and the human menstrual cycle.
Acta Cytologica, 12:128-130
049. Dokumov, S.I. e Spasov, S.A. (1968).
Sex chromatin pattern and menstrual cycle.
Acta Cytologica, 12:131-136
050. Emery, A.E. (1965)
Muscle histology in carriers of Duchenne muscular dystrophy.
J. Med. Genet., 2:383-386
051. Epstein, C.J. (1969).
Mammalian oocytes: X chromosome activity.
Science, 163:1078-1079
052. Eskelund, V. (1956).
Determination of genetic sex by examination of epithelial cells in urine.
Acta Endocrinologica, 23:246-250
53. Fialkow, P.J. (1970)
X-Chromosome inactivation and the Xg locus.
Amer. J. Hum. Genet., 22:460-463

054. Ford, C.E. e Evans, E.P. (1964).
A reciprocal translocation in the mouse between the X chromosome and a short autosome.
Cytogenetics, 3:295-305
055. Forni, A. e Miles, C.P. (1966)
Sex chromatin abnormalities in carcinoma of the cervix uteri.
Acta Cytologica, 10:200-204
056. Forsberg, J.G. e Lindh, J. (1962)
Sex chromatin in adult and fetal rat.
Nature, 195:1329
057. Fraccaro, M., Lindsten, J., Mittwoch, U. e Zonta, L. (1964).
Size of drumsticks in patients with abnormalities of the X-chromosome.
Lancet, ii:43-44
058. Fuchs, F. e Riis, P. (1956)
Antenatal sex determination.
Nature, 177:330
059. Glenister, T.W. (1956)
Determination of sex in early human embryos.
Nature, 177:1135-1136
060. Golob, E.K., Israsena, T. e Becker, K.L. (1969)
Sex chromatin frequency and estrogenic activity in the newborn female.
J.Clin.Endoc. Met., 29:116-118
061. Graham, M.A. e Barr, M.L. (1952)
A sex difference in the morphology of metabolic nuclei in somatic cells of the cat. Ant.Rec., 112:709-723
062. Graham, M.A. (1954)
Sex chromatin in cell nuclei of the cat from the early embryo to maturity.
Anat.Rec., 119:469-492
063. Graham, M.A. e Barr, M.L. (1959)
Sex chromatin in the opossum, *Didelphys virginiana*.
Arch.D'Anat.Micr.Morph.Exp., 48:111-112
064. Grumbach, M.N., Marks, P.A. e Morishima, A. (1962)
Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and X-chromosome polysomy.
Lancet, i:1330-1332

065. Grüneberg, H. (1967)
Sex-linked genes in man and the Lyon hypothesis.
Ann.Hum.Genet., Lond ,30:239-257
066. Lambert, G. (1965)
Prevalence of positive sex chromatin in unselected adult Swedish
male population.
Acta Genet., Basel, 11:256-260
067. Hamerton, J.L., Giannelli, F., Collins, F., Hallet, J., Fryer, A.
e McGuirre, V.M. (1969)
Non-random X-inactivation in the female mule.
Nature. 222:1277-1278
068. Hamerton, J.L. (1971)
Human Cytogenetics.
Vol.I, Academic Press, N.Y. (USA), 432 págs. (pp. 131-191)
069. Hay, J.C. e Moore, K.L. (1961)
The sex chromatin in various mammals.
Acta Anat., 45:289-309
070. Hienz, H.A. e Stoll, P. (1962)
Sex determinations in intra-uterine death by means of sex chro-
matin.
Acta Cytologica, 6:108-121
071. Hügli, P. (1963)
Shape and position of the sex chromatin in living human cells.
Acta Anat., 55:370-392
072. Hülliger, L., Klinger, H.P. e Allgöwer, M. (1963)
Sex chromatin as a marker in some rabbit cells.
Experientia, 19:240-248
073. Hutt, F.B., Rickard, C.G. e Field, R.A. (1948)
Sex-linked hemophilia in dogs.
J.Hered., 39:3-9
074. Hutt, F.B. (1963)
A note on six kinds of genetic hypotrichosis in cattle.
J.Hered., 54:186-187
075. Jacobs, P.A., Harnden, D.G., Brown, W.M.C., Goldstein, J., Close,
H.G., MacGregor, T.N., Maclean, N. e Strong, J.A. (1960)
Abnormalities involving the X chromosome in women.
Lancet, i:1213-1216

076. Jacobs, P.A., Harnden, D.G., Buckton, K.E., Brown, W.M.C., King, M.J., McBride, J.A., MacGregor, T.N. e Macclean, N. (1961).
Cytogenetic studies in primary amenorrhoea.
Lancet, i:1183-1188
077. James, J. (1960)
Observations on the so-called sex chromatin.
Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat., 51:597-616
078. James, J. (1964)
Intermitotic transformation of the Barr body in cultured cells of the human female.
Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat., 64:173-188
079. Kang, Y.S. e Park, S.D. (1965)
The frequency and pattern of sex chromatin in cultured cat, guinea-pig and chick embryo cells, with special reference to the various cultured stages.
Korean J. Zool., 8:37-41
080. Kimel, V.M. (1957)
Clinical-cytological correlations of mammary carcinoma based upon sex-chromatin counts.
Cancer, 10:922-927
081. Klinger, H.P. (1957).
The sex chromatin in fetal and maternal portions of the human placenta.
Acta Anat., 30:371-397
082. Klinger, H.P. (1958)
The fine structure of the sex chromatin body.
Exp. Cell Res., 14:207-211
083. Klinger, H.P. (1962)
Morphological characteristics of the sex chromatin.
Acta Cytologica, 6:69-72
084. Kosin, I.L. e Ishizaki, H. (1959)
Incidence of sex chromatin in Gallus domesticus.
Science, 130:43-44
085. Langlands, A.O. e Cathels, R. (1967)
Sex chromatin in female breast cancer.
Lancet, ii:719-720
086. Levij, I.S. e Meulendijk, P.N. (1962)
The localization of sex chromatin.
Lab. Invest., 11:192-194

087. Levij, I.S. (1967)
A three-dimensional interpretation of apparent differences in the incidence of sex chromatin.
I.J.Med.Sci., 3:783-786
088. Levij, I.S. e Carel, R. (1968)
Inverse relation between nuclear size and incidence of peripheral sex chromatin.
I.J.Med.Sci., 4:307-308
089. Lyon, M.F. (1961)
Gene Action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.).
Nature, 190:372-373
090. Lyon, M.F. (1962)
Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome.
Am.J.Hum.Genet., 14:135-148
091. Lyon, M.F. (1963_a)
Lyonisation of the X chromosome.
Lancet, ii:1120-1121
092. Lyon, M.F. (1963_b)
Attempts to test the inactive-X theory of dosage compensation in mammals.
Genet.Res., Camb., 4:93-103
093. Lyon, M.F., Searle, A.G., Ford, C.E. e Ohno, S. (1964)
A mouse translocation suppressing sex-linked variegation.
Cytogenetics, 3:306-323
094. Lyon, M.F. (1966_a)
X-chromosome inactivation in mammals. Em Advances in Teratology Vol.I, Org. por D.H.M.Woollem, Logos Press, London, (pp.25-54).
095. Lyon, M.F. (1966_b)
Sex chromatin and gene action in the X chromosome of mammals. Em The Sex Chromatin.
Org. por K.L.Moore, W.B.Saunders Co., Filadélfia, 474 págs. (pp. 370-386)
096. Lyon, M.F. (1968)
Chromosomal and subchromosomal inactivation.
Annual Review of Genet., 2:31-52
097. Lindsten, J., Fraccaro, M., Polani, P.E., Hamerton, J.L., Sanger, R. e Race, R.R. (1963)
Evidence that the Xg blood group genes are on the short arm of the X chromosome.
Nature, 187:648-649

098. Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H. e Mirsky, A.E. (1964)
Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by
electron microscope autoradiography.
Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 52:93-100
099. Maclean, N. (1966)
The sex chromatin surveys of newborn babies. Em The Sex chromatin.
Org. por K.L.Moore, W.B.Saunders Co., Filadélfia, 474 págs.
(pp.202-219)
100. Márquez-Monter, H., Santiago-Payán, H. e Kofman-Alfaro, S. (1968)
Sex chromatin survey in mentally handicapped children in Mexico.
J.Med.Genet., 5:40-44
101. Márquez-Monter, H., Carnevale-Lôpes, A. e Kofman-Alfaro, S. (1968)
Sex chromatin survey in 3000 newborn infants in Mexico.
Pediatrics, 41:664-666
102. McKusick, V.A. (1962)
On the X chromosome of man.
Quart.Rev.Biol., 37:69-175
103. Melander, Y. (1962)
Chromosomal behaviour during the origin of sex chromatin in the
rabbit.
Hereditas, 48:645-661
104. Miles, C.P. (1964)
Chromatin elements, nuclear morphology and midbody in human mitosis.
Acta Cytologica, 8:356-363
105. Mittwoch, U. (1964)
Sex chromatin.
J.Med.Genet., 1:50-76
106. Mittwoch, U. (1967)
Sex differentiation in mammals.
Nature, 210:352-354
107. Moore, K.L. e Barr, M.L. (1954)
Nuclear morphology, according to sex, in human tissues.
Acta Anat., 21:197-208
108. Moore, K.L. e Barr, M.L. (1955_a)
Smears from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex.
Lancet, ii:57
109. Moore, K.L. e Barr, M.L. (1955_b)
The sex chromatin in benign tumours and related conditions in man.
Brit.J.Cancer, 9:246-252

110. Moore, K.L. e Barr, M.L. (1957)
The sex chromatin in human malignant tissues.
Brit. J. Cancer, 11:384-390
111. Moore, K.L. (1962)
The sex chromatin: its discovery and variations in the animal kingdom.
Acta Cytologica, 6:1-12
112. Moore, K.L. (1966)
The sex chromatin
Editado por K.L. Moore. W.B. Saunders. Co.:1-55
113. Muldal, S. (1962)
Origin of the Barr body
Lancet, ii:1384-1385
114. Naujoks, H. (1969)
Sex chromatin in exfoliated cells of cervical carcinoma in situ.
Acta Cytologica, 13:634-636
115. Nayyar, R.F. e Barr, M.L. (1966)
Sex chromatin in rodents.
Can. J. Genet. Cytol., 8:654-660
116. Nur, U. (1966)
Reversal of heterochromatization and the activity of the paternal chromosome set in the male mealy bug
Genetics, 56:375-389
117. Oliphant, S., Westerhout, F.C. e Schwinn, C.P. (1968)
Sex chromatin in hydatidiform moles.
Acta Cytologica, 12:290-293
118. Ohno, S., Kaplan, W.D. e Kinoshita, R. (1959)
Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*.
Exp. Cell Res., 18:415-418
119. Ohno, S., Kaplan, W.D. e Kinoshita, R. (1960)
On the sex chromatin of *Gallus domesticus*.
Exp. Cell Res., 19:180-183
120. Ohno, S. e Makino, S. (1961)
The single-X nature of sex chromatin in man.
Lancet, i:78-79

121. Ohno, S., Beçak, W. e Beçak, M.L. (1964_a)
X-autosome ratio and the behavior pattern of individual X-chromosomes in placental mammals.
Chromosoma (Berl.), 15:14-30
122. Ohno, S. (1964_b)
The sex chromatin: its origin and nature.
Mam.Cytog.Relat.Prob.Radiol., Pergamon Press, Oxford. (pp.253-267)
123. Ohno, S. e Lyon, M.F. (1965)
Cytological study of Searle's X-autosome translocation in *Mus musculus*.
Chromosoma, 16:90-100
124. Ohno, S. (1966)
Single-X derivation of sex chromatin. Em The Sex Chromatin.
Org. por K.L.Moore, W.B.Saunders Co., Filadélfia, 474 págs.
(pp.113-126)
125. Park, W.W. (1957)
The occurrence of sex chromatin in early human and macaque embryos.
J.Anat., (Lond.), 91:369-373
126. Pavan, C. (1966)
Estrutura e função dos cromossomos. Em Elementos de Genética.
2ª ed., org. por C.Pavan e A.Brito da Cunha, Cia. Editora Nacional,
São Paulo, 666 págs. (pp.118-157)
127. Pearson, C.M., Fowler, W.M. e Wright, S.W. (1963)
X-chromosome mosaicism in females with muscular dystrophy.
Proc.Nat.Acad.Sci. (USA), 50:24-31
128. Protich, M., Spasov, S.A. e Dokumov, S.I. (1969)
Influence de l'oestradiol et de la testostérone sur la chromatine sexuelle nucléaire chez l'homme.
Rev.Roum.Endocrinol., 6:243-246
129. Ramírez, A.B. e Cuadrillero, C.B. (1962)
La cromatina sexual y las adicciones precancerosas de la mama.
Rev.Clin Esp., 85:30-34
130. Reed, T.E., Simpson, N.E. e Chown, B. (1963)
The Lyon hypothesis.
Lancet, ii:467-468

131. Robertis, E.D.P.De, Nowinski, W.W. e Sáez, F.A. (1952)
Citologia General.
El Ateneo, Buenos Aires, págs. (pp.214)
132. Russel, L.B. (1964)
Another look at the single-active-X hypothesis.
Trans.N.Y.Acad.Sci., 26:726-736
133. Sanger, R., Race, R.R., Tippett, P., Gavin, J., Hardisty, R.M. e
Dubowitz, V. (1964)
Unexplained inheritance of the Xg groups in two families.
Lancet, i:955-956
134. Schmidt , D.W., Marden, P.M., McDonald, M.J. e Speckhard,M.(1962)
Lower incidence of the sex chromatin in buccal smears of newborn
females.
Pediatrics, 30:707
135. Schmidt, M.E., Miller, W.V., Peenen, H.J.Van, e Lucas,F.V. (1966)
Changes in sex chromatin pattern during the menstrual cycle.
Am.J.Obst. e Gynec., 94:422-424
- 136- Schwarzacher, H.G. (1963)
Sex chromatin in living human cells in vitro.
Cytogenetics, 2:117-128
137. Sen Gupta, B.N. (1968)
Sex chromatin positive nuclei in the nasal smears of the fema-
les.
Med.J.Malaya, 23:32-34
138. Silva-Inzunza, E. (1957)
Cytological demonstration of sex in fresh unstained preparations
under the phase contrast microscope.
Exp.Cell Res., 13:405-406
139. Siracká, E. e Siracký, J. (1969)
Sex chromatin and hormonal treatment in breast cancer with bone
metastases.
Neoplasma, 16:205-208
140. Siracký, J. (1967)
Sex chromatin in cancer of the uterine cervix.
Acta Cytologica, 11:486-487
141. Sohval, A.R. e Casselman, W.G.B. (1961)
Alteration in size of nuclear sex-chromatin mass (Barr body) in
duced by antibiotics.
Lancet, ii:1386-1388

142. Stewart, J.S.S. e Sanderson, A.R. (1961)
Sex chromatin body in normal human testis.
Lancet, i:79-80
143. Tavares, A.S. (1966)
Sex chromatin in tumors. Em The Sex Chromatin.
Org. por K.L.Moore, W.B.Saunders Co., Filadélfia, 474 págs.
(pp.405-428)
144. Taylor, A.I. (1962)
Ambiguous sex and sex chromatin in the newborn.
Lancet, ii:1059
145. Taylor, A.I. (1963)
Sex chromatin in the newborn.
Lancet, i:912-914
146. Therkelsen, A.J. (1964)
Lyonisation of the X chromosome.
Lancet, i:937
147. Thompson, M.W. (1965)
Genetic implacations of heteropyknosis of the X chromosome.
Can.J.Genet.Cytol., 7:202-213
148. Thompson, J.S. e Thompson, M.W. (1970)
Genética Médica.
Livraria Atheneu S/A. Rio de Janeiro, 284 págs. (pp.106-126)
149. Tsuboi, T., Asaka, A., Hamada, S.e Nagumo, Y. (1960)
Frequency of sex chromosome anomaly among schyzophrenic patients.
Jap.J.Hum.Genet., 11:39-40
150. Yule, R., Howell, M. e Verrill, B. (1969)
Buccal sex chromatin and breast cancer.
Lancet, ii:824-825
151. Wacker, B. e Miles, C.P. (1966)
Sex chromatin incidence and prognosis in breast cancer.
Cancer, 19:1651-1654
152. Waldrigues, A., Cavalli, I.J., Sbalqueiro, I.J. e Marçallo, F.A.
(1970)
Frequência de núcleos cromatino-positivos e volume nuclear.
Resumos da XXII Reunião Anual da S.B.P.C.,E-102, 441 págs.(pp.129)
153. Weste, S.H., Barnett, J.S., Garson, O.M. e Baikie, A.G. (1967)
Variations in the frequency and form of sex chromatin in females
with burns.
Lancet, i:745-746