

JEANETE MARISTELA S. AGOSTINI

**Estudo da Variabilidade e da Herdabilidade das
Regiões Heterocromática e Eucromática
do Cromossomo Y Humano**

JEANETE MARISTELA S. AGOSTINI

ESTUDO DA VARIABILIDADE E DA HERDABILIDADE DAS REGIÕES
HETEROCROMÁTICA E EUCROMÁTICA DO CROMOSSOMO Y HUMANO

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Genética
Humana da Universidade Federal
do Paraná, para obtenção do título
de Mestre, em Ciências na área
de Genética Humana.

CURITIBA

- 1981 -

A todos com quem
estou unida
cromossômica
e/ou afetivamente.

Professor Orientador
Iglenir João Cavalli

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Iglênir João Cavalli, pela sua orientação, paciência e estímulo, fatores que me possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos Professores Iglênir João Cavalli, Ives José Sbalqueiro e Néria Amorim Maia Ehmke pela colaboração na obtenção da amostra.

Aos Professores Lodércio Culpi, Ida Cristina Gubert, Sérgio Luiz Primo Parmo pela colaboração na coleta de sangue.

Ao Dr. Bernardo Erdtmann pelas sugestões dadas no decorrer da realização deste trabalho.

À Dra. Margarete Suñe Mattevi pelas facilidades proporcionadas no Departamento de Genética da UFRGS, para a utilização do equipamento de microfotodensitometria.

À Néria Amorim Maia Ehmke pela colaboração na parte referente à obtenção do material fotográfico.

À Profa. Ida Cristina Gubert pela correção gramatical do texto.

À Irene Sedoski pelos trabalhos de datilografia.

Ao Carlos Alberto Padilha pela colaboração na confecção dos gráficos e desenhos que ilustram este trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram com a doação de sangue para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que, através do PICD me autorizou e subvencionou-me a realização do Curso de Mestrado na área de Genética Humana, razão do qual este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.	vii
Lista de Figuras.	ix
I. INTRODUÇÃO	
I.1. A variabilidade cariotípica humana.	1
I.2. Diferenciação longitudinal dos cromossomos humanos.	2
I.2.1. Tipos de bandas.	2
I.2.2. Bandas polimórficas.	4
I.3. Heterocromatina constitutiva-natureza.	5
I.3.1. Heterocromatina constitutiva-função.	9
I.4. Polimorfismo do cromossomo Y humano.	10
I.4.1. Estudo em indivíduos de diferentes grupos raciais.	11
I.4.2. Variabilidade das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y humano.	12
I.4.3. Análise familiar.	14
I.5. Objetivos.	16
II. MATERIAL E MÉTODOS	
II.1. Amostra.	18
II.2. Coleta do material, cultura e preparação citológica.	20
II.2.1. Coleta do material.	20
II.2.2. Cultura e preparação citológica.	20
II.3. Bandeamento-C.	21
II.4. Obtenção dos negativos.	22
II.5. Medidas.	22
II.6. Correção quanto ao estágio de contração.	23
II.7. Outras variáveis metodológicas.	27
II.8. Análise estatística.	29
III. RESULTADOS.	32
IV. DISCUSSÃO.	56
V. RESUMO E CONCLUSÕES.	61
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	63

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1 Idade média do total de indivíduos da amostra subdividida em duas subamostras, classificadas de acordo com o grupo racial.	19
2 Valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) calculados entre os comprimentos das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y e os da região eucromática do braço longo do cromossomo 1 (1q-h) da mesma célula.	26
3 Média das diferenças entre duas medidas das regiões heterocromática, eucromática e do tamanho total do cromossomo Y, avaliadas em 30 células.	28
4 Média das diferenças entre as medidas das regiões heterocromática, eucromática e do tamanho total do cromossomo Y, de 3 diferentes células do mesmo indivíduo, avaliadas em 30 indivíduos.	30
5 Tamanho absoluto (μ) das regiões heterocromática, eucromática e total do cromossomo Y de 30 Japoneses.	33
6 Tamanho absoluto (μ) das regiões heterocromática, eucromática e total do cromossomo Y de 30 Caucásios.	34
7 Valores dos coeficientes de correlação (r) calculados entre os tamanhos das regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y e entre os de ambas as regiões.	42

8	Tamanho relativo (heterocromatina ou eucromatina X 100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y de 30 Japoneses.	43
9	Tamanho relativo (heterocromatina ou eucromatina X 100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y de 30 Caucásóides.	44
10	Média dos tamanhos absoluto (A) e relativo (B = heterocromatina ou eucromatina X 100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática, e absoluto do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucásóides. . .	45
11	Tamanho da região heterocromática (μ) do cromossomo Y de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásóides.	46
12	Médias e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 11.	48
13	Tamanho da região eucromática (μ) do cromossomo Y de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásóides.	49
14	Média e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 13.	50
15	Tamanho total do cromossomo Y (μ) de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásóides.	51
16	Média e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 15.	52

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página	
1	Curva, obtida em fotodensitometria, do braço longo do cromossomo 1, distinguindo-se a região eucromática (A1 q-h) e a heterocromática (banda-C).	24
2	Curva, obtida em fotodensitometria, do cromossomo Y distinguindo-se a região eucromática e a heterocromática.	25
3	Polígonos de freqüência da distribuição dos tamanhos da região heterocromática do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucásóides.	35
4	Polígonos de freqüência da distribuição dos tamanhos da região eucromática do cromossomo Y de 30 Japoneses e 30 Caucásóides.	36
5	Polígonos de freqüência da distribuição dos tamanhos do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucásóides.	37
6	Diagrama de distribuição dos valores da região heterocromática e do cromossomo Y, apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão.	39
7	Diagrama de distribuição dos valores da região eucromática e do cromossomo Y, apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão.	40
8	Diagrama de distribuição dos valores das regiões heterocromática e eucromática apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão.	41

Figuras		Página
9	Diagrama de distribuição dos dados da Tabela 11 e reta de regressão.	53
10	Diagrama de distribuição dos dados da Tabela 13 e reta de regressão.	54
11	Diagrama de distribuição dos dados da Tabela 15 e reta de regressão.	55

I - INTRODUÇÃO

I.1. A VARIABILIDADE CARIOTÍPICA HUMANA

Na Conferência de Paris (1971), foi recomendado o termo variante, para descrever situações em que há uma alteração do normal na morfologia cromossômica. LUBS & RUDLE (1970) chamaram de maiores as variantes cromossômicas estruturais ou numéricas, responsáveis pela produção de fenótipos anormais ou que, quando presentes em estado balanceado, aumentam o risco de produção de proles anormais. Variantes que aparentemente não resultam em nenhuma implicação clínica, são denominadas de menores.

Mesmo sem o emprego das técnicas de identificação cromossômica, pôde-se demonstrar que as variantes menores ocorrem em indivíduos fenotipicamente normais, sendo que sua incidência populacional é maior do que se poderia esperar como resultado de mutações recorrentes, o que as definiu como um novo tipo de polimorfismo cromossômico. COHEN e cols. (1966), estudando o comprimento do cromossomo Y humano, demonstraram a sua variabilidade, não só entre indivíduos, mas também, entre diferentes grupos raciais.

LUBS & RUDLE (1970), estudando 2.444 recém-nascidos normais, apresentaram importantes informações sobre a variabilidade cariotípica humana. Estes autores definiram vinte e sete categorias de variantes menores e estabeleceram critérios para o reconhecimento das mesmas.

Embora as variantes menores tenham sido observadas em todos os grupos cromossômicos, foram mais freqüentes as detectadas nos braços curtos e nos satélites dos cromossomos dos grupos D e G (16,9% e 6,2%) respectivamente, e no braço longo do cromossomo Y (5,6%).

As comparações feitas por LUBS & RUDLE (1970), entre amostras de indivíduos caucasóides e negróides, demonstraram que determinadas variantes dos cromossomos dos grupos D, E e G são estatisticamente mais freqüentes nos negros do que nos caucasóides. Estas variantes referem-se a: aumento de tamanho dos braços curtos dos cromossomos dos grupos D e G, presença de satélites gigantes nos cromossomos do grupo D, e presença de um cromossomo longo no grupo E. Informações semelhantes foram fornecidas por STARKMAN & SHAW (1967), no que se refere aos satélites e braços curtos dos cromossomos do grupo D e G.

Diferenças nas freqüências de variantes menores entre sexos, tem sido também descritas. COURT-BROWN (1967), WALZER e cols. (1969), encontraram um número maior de variantes menores em cromossomos autossomos de homens, do que de mulheres. ZANKL & ZANG (1971) também observaram que variantes do tamanho do braço curto dos acrocêntricos, eram mais freqüentes em recém-nascidos do sexo masculino, do que em recém-nascidos do sexo feminino. MATTEVI & SALZANO (1975), e SCHWARZACHER (1976), observaram a existência de diferença sexual quanto ao número de satélites, sendo os mesmos mais freqüentes em homens do que em mulheres.

As técnicas convencionais, forneceram informações em condições em que, as de bandeamento, não foram, ou não puderam ser utilizadas e, apesar de limitantes, foram capazes de revelar uma considerável variabilidade entre homólogos, dentro e entre indivíduos. No entanto, a extensa variabilidade que ocorre no cariótipo humano normal, só pôde ser mais perfeitamente avaliada, com o desenvolvimento das técnicas de identificação cromossômica.

I.2. DIFERENCIAÇÃO LONGITUDINAL DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

I.2.1. Tipos de bandas

O primeiro método de bandeamento, foi desenvolvido a partir de 1968, por CASPERSON e cols. (1968, 1969a, b), através do uso de derivados da acridina como fluorocromo, quinacrina mostarda, em cromossomos de células vegetais.

ZECH (1969) e CASPERSON e cols. (1970a, b, c, d, e), aplicando a mesma metodologia, demonstraram a existência de bandas fluorescentes nos cromossomos humanos. As bandas formadas pelo

emprego dos corantes citados, foram denominadas de bandas-Q, e podem ser observadas em diferentes intensidades de fluorescência, classificadas em cinco níveis estabelecidos pela Conferência de Paris (1971).

PARDUE & GALL (1970), empregando a técnica de "hibridização in situ", com ARN radioativo complementar ao ADN satélite, observaram que as regiões centroméricas dos cromossomos de camundongos, eram as mais intensamente marcadas. Demonstraram, portanto, que o ADN satélite estava restrito às regiões centroméricas consideradas como regiões compostas por heterocromatina constitutiva.

ARRIGHI & HSU (1971), introduzindo modificações na metodologia acima, transformando-a de autorradiográfica para citoquímica, observaram nos cromossomos humanos, blocos heterocromáticos fortemente corados nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, sendo que o cromossomo Y apresentava estes locos, também na região distal do braço longo. As bandas obtidas por este procedimento (bandeamento C) foram denominadas de bandas-C.

A técnica de coloração por Giemsa sofreu, em seguida, uma série de modificações que resultaram em novos métodos de bandeamento.

O bandeamento G que revela as bandas-G, foi desenvolvido através de técnicas que empregam pré-tratamentos com calor, soluções alcalinas (SUMNER e cols., 1971, SCHNEDL, 1971, DRETS & SHAW, 1971), e enzimas proteolíticas (SEABRIGHT, 1971, KATO & YOSIDA (1972). As bandas obtidas por este método são, em geral, as mesmas que aparecem intensamente fluorescentes quando tratadas pelo método para obtenção de bandas-Q.

As bandas-R (DUTRILLAUX e cols., 1971), são evidenciadas quando a preparação cromossômica é incubada inicialmente em uma solução salina, de baixa concentração, a 87°C. Estas bandas revelam o padrão reverso das bandas-G.

Uma pequena modificação na técnica de obtenção das bandas-R, basicamente por mudanças do pH, de 6,5 para 6,7, resultou em padrões de bandeamento restritos, principalmente, às regiões teloméricas; as chamadas bandas-T (DUTRILLAUX, 1973), que podem ser obtidas tanto pelo emprego de Giemsa, como pelo de fluorocromos.

Outros métodos de coloração, são também empregados para a identificação cromossômica. O método Giemsa-11, por exemplo, usa solução de Giemsa à pH 11,0-11,6, e cora com maior intensidade a região heterocromática do par cromossômico 9.

As regiões organizadoras do nucléolo (NOR) são mais propriamente identificadas pelas bandas-N (MATSUI & SASAKI, 1973), ou pelo emprego do método da prata amoniaca (HOWELL e cols., 1975 e GOODPASTURE & BLOOM, 1975). Informações sobre o bandeamento cromossômico, trocas cromatídicas, reconhecimento de segmentos heterocromáticos e replicação cromossômica são fornecidas pelo emprego da 5-bromodeoxyuridina (BrdU), pela primeira vez utilizada em cromossomos humanos por KABECK e cols. (1964).

I.2.2. Bandas polimórficas

A estabilidade de determinadas bandas cromossômicas, interpretada evolutivamente, é uma forte demonstração da própria estabilidade cromossômica. Por outro lado, determinadas regiões do genoma humano, apresentando uma grande variabilidade, manifestam polimorfismos detectados principalmente pelo emprego das técnicas de bandeamento Q e C. O polimorfismo revelado pelas bandas-Q, envolve regiões cromossômicas que podem diferir em tamanho, e/ou intensidade de fluorescência entre os homólogos ou individualmente.

Polimorfismos das regiões pericentroméricas e dos satélites dos 5 pares de acrocêntricos, das regiões pericentroméricas dos cromossomos 3 e 4, e, da região distal do braço longo do cromossomo Y, tem sido freqüentemente descritos (BORGAONKAR & HOLLANDER, 1971, FISHER e cols., 1972; MIKELSAAR e cols., 1973, 1978; BUCKTON e cols., 1976; LUBS e cols., 1977a, b; PHILLIPS, 1977; SOUDEK & SROKA, 1978; VERMA e cols., 1978). No que se refere ao cromossomo Y, o intenso grau de fluorescência encontrado no braço longo, permitiu, inclusive, a detecção da cromatina sexual deste cromossomo, em células interfásicas (Conferência de Paris, 1971).

As bandas-C, também permitem a identificação, nos cromossomos humanos, de regiões com variações morfológicas.

As regiões centroméricas de todos os cromossomos, os satélites dos cromossomos acrocêntricos, as constrições secundárias dos cromossomos 1, 9 e 16, e a porção distal do braço longo do cromossomo Y, são intensamente coradas pelo método do bandeamento-C.

Os polimorfismos revelados pelas bandas-C, caracterizam-se por alterações tanto de tamanho, como de posição. No primeiro caso, têm sido estudadas principalmente as constrições secundárias

dos cromossomos 1, 9 e 16 e a região distal do braço longo do cromossomo Y (CRAIG-HOLMES & SHAW, 1971; AULA & SAKSELA, 1972; KIM, 1973; SCHNEDL, 1973; CRAIG-HOLMES e cols., 1973; MCKENZIE & LUBS, 1975; GHOSH & SINGH, 1976; CRAIG-HOLMES, 1977; BALÍCEK e cols., 1978; PODUGOLINIKOVA e cols., 1979; ERDTMANN e cols., 1981; CAVALLI e cols., 1981).

Os de posição, compreendem a presença total ou parcial de heterocromatina no braço curto, e, tem sido em geral, descritos somente nos cromossomos 1 e 9 (HOWARD e cols., 1973; CRAIG-HOLMES e cols., 1973; DE LA CHAPELLE, 1974; BOUÉ e cols., 1975; MCKENZIE & LUBS, 1975; BUCKTON e cols., 1976; PHILLIPS, 1977; SOUDEK & SROKA, 1977; VAN DYKE e cols., 1977; ERDTMANN e cols., 1981).

As bandas-C, manifestam a heterocromatina constitutiva localizada em regiões cromossômicas, que se caracterizam pelo alto conteúdo de ADN satélite, altamente repetitivo.

I.3. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA-NATUREZA

HEITZ em 1928, utilizou o termo heterocromatina para definir cromossomos ou segmentos cromossômicos que não se desespiralizam na telófase mitótica, mantendo-se condensados, ou em estado heteropicnótico, através da interfase até a prófase da divisão subsequente (segundo PASSARGE, 1974).

BROWN (1966), classificou a heterocromatina em constitutiva e facultativa. Heterocromatina facultativa é a cromatina que pode ou não estar condensada durante a interfase, podendo variar de estado nos diferentes tipos de células, ou diferentes fases de desenvolvimento, ou mesmo, entre diferentes homólogos na mesma célula. Um exemplo clássico é a inativação de um dos cromossomos X durante um estágio precoce de desenvolvimento embrionário em mamíferos. Nas fêmeas de mamíferos, os corpúsculos resultantes desta inativação são denominados corpúsculos de Barr e são visualizados em intérfase (BARR & BERTRAN, 1949; OHNO e cols., 1959, 1961; LYON, 1968).

Heterocromatina constitutiva é a forma usual, permanentemente condensada, encontrada nas mesmas regiões dos cromossomos homólogos formando um elemento estrutural permanente no par cromossômico.

ARRIGHI & SAUNDERS (1973), demonstraram, através de estudos de reassociação, que 30 a 40% do genoma humano é constituído por seqüências repetitivas, sendo que, as altamente repetitivas, ADN-satélites, correspondem a 6% do total de ADN do genoma humano.

O ADN humano pode ser fracionado em gradiente de densidade de $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ e $\text{Hg}^{2+} - \text{Cs}_2\text{SO}_4$, e a fração obtida pode ser em seguida analisada em cloreto de césio neutro (CsCl), após extensiva diálise para eliminar Hg^{2+} e Ag^+ (CORNEO, 1970). Quando as frações de ADN, obtidas pelo método primeiramente citado, são submetidas a centrifugação em cloreto de césio, observa-se a formação de um pico principal, e outros picos de densidades variáveis. Os pequenos picos, apresentam seqüências de bases idênticas, repetidas, o que os diferem do pico principal. Estas frações de ADN, que formam os pequenos picos, são denominadas de ADN satélites (SCHWARZACHER, 1976).

No homem, foram descritos oito tipos de ADN satélites. Quatro deles são denominados I, II, III e IV, e os outros quatro são denominados A, B, C e D (CORNEO e cols., 1967, 1970, 1971, 1972; SAUNDERS, 1974).

Nos cromossomos humanos, os ADN satélites estão localizados em sua maioria, em regiões que são formadas por heterocromatina constitutiva. Através da utilização das técnicas de hibridização "in situ", demonstrou-se que, os cromossomos autossomos de números 2, 4, 6, 8 e 11, tem bandas C que apresentam ausência dos quatro ADN satélites convencionais (I, II, III e IV). Já os cromossomos 1, 9, 13, 14, 15, 20, 21, 22 e Y, apresentam alta concentração de um ou mais ADN-satélites em suas bandas C; enquanto que os demais cromossomos, apresentam quantidades intermediárias (MACAYA e cols., 1977; MIKLOS & JOHN, 1979).

O ADN satélite, pela primeira vez, isolado por CORNEO e cols. em 1967, recebeu a denominação de ADN satélite I. Este ADN, apresenta uma densidade de $1,687 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro. Em cloreto de césio alcalino, apresenta faixas de separação com uma diferença de densidade entre as duas faixas de cerca de 33 mg/cm^3 . O ADN satélite I, corresponde a 0,15% do genoma humano (MACAYA e cols., 1977). Valores como 0,5% e 0,2% foram encontrados, respectivamente por CORNEO e cols. (1971) e SCHILDKRAUNT & MAIO em 1969, JONES e cols. em 1974, e MOAR e cols. em 1975 segundo MACAYA e cols., 1977), através de experimentos de hibridização, calcularam um valor de 0,15-0,175%, como sendo a quantida-

dade de ADN satélite I presente no genoma humano. O ADN satélite I, apresenta um conteúdo de 26% de G-C (EVANS, 1977).

STEFFENSEN (1977) encontrou ADN satélite I na região heterocromática do cromossomo 3, e no braço curto dos acrocêntricos. Esta última localização foi também descrita por GOSDEN e cols. (1975), embora estes autores tivessem detectado, principalmente, na constrição secundária do cromossomo 9 e na região distal do braço longo do cromossomo Y.

O ADN satélite II, primeiramente descrito por CORNEO e cols. (1970), apresenta uma densidade de $1,693 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro e uma diferença de densidade de 10 mg/cm^3 entre as faixas obtidas em cloreto de césio alcalino (MACAYA e cols., 1977). SAUNDERS e cols. (1975), encontraram uma densidade de $1,695 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro; densidade esta muito próxima da encontrada por CORNEO e cols. (1971) para o ADN satélite

MACAYA e cols. (1977), embora não tivessem afastado a possibilidade dos ADN satélite II e III representarem tipos de ADN satélite pouco diferenciados, e evolutivamente muito próximos, sugeriram que estes ADN satélite seriam, na realidade, um único ADN satélite, mas, que, devido aos métodos de obtenção, aparecem como dois tipos muito semelhantes.

De acordo com CORNEO e cols. (1970) e EVANS (1977), o ADN satélite II corresponde a 2% do genoma humano, enquanto que, para MOAR e cols. (1975) apenas 0,7% do genoma humano seria constituído por este tipo de ADN, que apresenta um conteúdo de G-C que varia de 33,7 a 43,2%, dependendo do método de obtenção (MACAYA e cols., 1977).

O ADN satélite II, é encontrado nas regiões centroméricas dos cromossomos 1 e 16, numa quantidade ligeiramente menor no 9, e, na região distal do braço longo do Y, estando, também, presente nos cromossomos do grupo D e G (STEFFENSEN, 1977). GOSDEN e cols. (1975), descreveram que o mesmo localiza-se principalmente, na constrição secundária do cromossomo 9 e na parte distal do braço longo do cromossomo Y, além de estar presente nos pares 1, 15, 16, 17, 21 e 23.

O ADN satélite III foi descrito por CORNEO e cols. (1971). Este ADN satélite apresenta uma densidade de $1,696 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro, e uma diferença de densidade de 14 mg/cm^3 entre as faixas separadas em cloreto de césio alcalino (MACAYA e cols., 1977). SAUNDERS e cols. (1975) encontraram uma densidade de $1,699 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro, e uma diferença de den-

sidade de 13 mg/cm^3 , nas faixas separadas em cloreto de césio alcalino. Estes dados são muito semelhantes aos encontrados para o ADN satélite IV. Autores como EVANS (1977), consideram muito similares os ADN satélite III e IV.

O ADN satélite III representa 1,5% do total do ADN do genoma humano (CORNEO e cols., 1971) ou 1,2% segundo MACAYA e cols., 1977. Apresenta um conteúdo de G+C de 35,9-36,7%, dependendo do método utilizado. Este ADN satélite localiza-se preferencialmente na constrição secundária do cromossomo 9 e nas contrações secundárias dos cromossomos do grupo D e G (STEFFENSEN, 1977), estando também presente nos cromossomos 20 e Y. Segundo GOSDEN e cols. (1975), ele se encontra nos cromossomos 9, 15 e Y, e nos pares 13, 14, 20, 21 e 22.

O ADN satélite IV, isolado por CORNEO e cols. (1972), apresenta uma densidade em cloreto de césio neutro de $1,700 \text{ g/cm}^3$. Com uma diferença de densidade de 12 mg/cm^3 entre as faixas de separação em cloreto de césio alcalino.

Este ADN satélite representa 2% da quantidade total de ADN do genoma humano (CORNEO e cols., 1972; EVANS, 1977). Apresenta um conteúdo de G-C relativamente rico, ou seja 41% e localiza-se preferencialmente no cromossomo Y e nos pares 13, 14, 15, 20, 21 e 22 (STEFFENSEN, 1977). Segundo GOSDEN e cols. (1975) ele estaria também presente nos cromossomos 9 e 17.

O ADN satélite A, apresenta uma densidade de $1,712 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro. Com aquecimento e rápido resfriamento, este ADN satélite apresenta duas bandas com densidade de $1,727$ e $1,716 \text{ g/cm}^3$ respectivamente (EVANS, 1977). Apresenta uma composição de bases G-C de 53,8% (MACAYA e cols., 1977. CHUANG & SAUNDERS (1974) encontraram, em gradiente de cloreto de césio neutro, uma densidade de $1,710 \text{ g/cm}^3$ e em cloreto de césio alcalino, uma densidade de $1,775 \text{ g/cm}^3$, mas sem separação de faixas. Em cloreto de césio neutro, após desnaturação-renaturação, ao contrário do achado por EVANS (1977), CHUANG & SAUNDERS (1974) encontraram uma banda simples, com $1,715 \text{ g/cm}^3$ de densidade.

Só será possível determinar se o ADN satélite A, representa uma ou duas formas de ADN satélite, após o conhecimento de uma série maior de resultados. De acordo com MACAYA e cols. (1977), o ADN satélite A, apresenta-se homogeneamente distribuído por todos os cromossomos, representando 0,5 a 1% da quantidade total de ADN.

CHUANG & SAUNDERS (1974), descreveram o ADN satélite B, cuja densidade em cloreto de césio neutro é de $1,726 \text{ g/cm}^3$. Este

ADN satélite está associado com genes ribossômicos, e liga-se preferencialmente ao nucléolo. Apresenta uma composição de base G-C equivalente a 67%, e, representa menos de 0,5% do ADN total (MACAYA e cols., 1977).

Os ADN satélites C e D foram isolados por SAUNDERS e cols. (1972, 1975), não estando ainda muito bem caracterizados.

O ADN satélite C apresenta uma densidade, em cloreto de césio neutro, de $1,703 \text{ g/cm}^3$, $1,760 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio alcalino e $1,712 \text{ g/cm}^3$ após renaturação em cloreto de césio neutro. Possui uma composição de base G-C calculada em 44%.

Já o ADN satélite D apresenta densidade de $1,720 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio neutro e $1,782 \text{ g/cm}^3$ em cloreto de césio alcalino; composição de base G-C calculada em 61%.

Ambos localizam-se, preferencialmente, na banda-C do par cromossômico nº 9.

Além dos oito tipos de ADN satélite acima descritos, uma significativa quantidade de ADN altamente repetitivo deve estar presente como satélites ocultos.

Recentemente, KUNKEL e cols. (1976) identificaram um tipo de ADN moderadamente repetitivo restrito ao cromossomo Y humano. COOKE (1976) encontrou frações de ADN de rápida associação no cromossomo Y.

MCKAY e cols. (1978), referindo-se às frações descritas por COOKE (1976), acreditam que devam existir dois tipos de ADN satélite específicos do cromossomo Y, que seguiram linhas evolutivas independentes. O tipo 1, pode variar em quantidade, de acordo com os diferentes tamanhos do cromossomo Y; e o tipo 2, cuja quantidade se manteria constante, ou mesmo, estaria ausente, independente das variações de tamanho do cromossomo Y.

I.3.1. Heterocromatina constitutiva-função

É muito difícil se estabelecer a função ou funções da heterocromatina constitutiva. Esta dificuldade talvez esteja relacionada com sua própria natureza, já que, encontrando-se permanentemente em repressão, não oferece condições para se provar que ela não contém genes estruturais.

EVANS (1977) acredita não existir nenhuma evidência real que demonstre a atividade do ADN satélite. BOSTOCK & SUMNER (1978) acham que existem poucas informações para que se possa concluir

se o ADN satélite transcreve ou, não, "in vivo". O ADN satélite poderia ser responsável pela produção de uma proteína com pouquíssima variedade de aminoácidos, ou ter uma função nuclear específica.

Já, autores como GAGNÉ e cols. (1972), descreveram que a heterocromatina constitutiva do cromossomo nº 9, forma pequenos grânulos no paquíteno, em machos. Grânulos similares foram observados por HUNGERFORD (1971), e HUNGERFORD e cols. (1972). A formação de pequenos nucléolos por todas as regiões de heterocromatina constitutiva, durante a primeira prófase meiótica em oócitos humanos, foi observada por STHAL e cols. (1975). Estas descobertas feitas por GAGNÉ e cols. (1972) e STHAL e cols. em 1975, são evidências de que, na prófase meiótica a heterocromatina constitutiva deve, de alguma forma, ser geneticamente ativa. A heterocromatina constitutiva deve servir como região organizadora nucleolar adicional, ou como região produtora de ARN durante um certo estágio da gametogênese (segundo SCHWARZACHER, 1976).

Autores como WALKER em 1972; YUNIS & YASMINCH em 1970; BOSTOCK em 1971 e FLAMM em 1972 (segundo SAUNDERS, 1974), atribuem um papel estrutural aos ADNs satélites localizados em regiões centroméricas. A heterocromatina conteria classes de ADN distintas, que atuariam, em áreas vitais, como no centrômero, por exemplo, no sentido de protegê-lo.

MIKLOS e cols. (1979), admitem um envolvimento da heterocromatina com o mecanismo de permuta meiótica, pois, a posição dos eventos de crossing over podem ser marcadamente alterados na presença de heterocromatina rica em ADN satélite. Se isto é verdadeiro, deve ser considerado possível um efeito somático da heterocromatina e ADN satélite. DAVIDSON & BRITTEN (1979), propõem que seqüências repetitivas de ADN sejam unidades de regulação em eucariontes.

I.4. POLIMORFISMO DO CROMOSSOMO Y HUMANO

Na Conferência de Denver (1960), ficou evidenciado que, o cromossomo Y varia mais significativamente em tamanho, do que qualquer outro cromossomo do cariótipo humano.

A variabilidade do tamanho do cromossomo Y humano tem sido descrita não só, entre indivíduos de um mesmo grupo racial, mas também entre indivíduos pertencentes a diferentes grupos raciais.

1.4.1. Estudo em indivíduos de diferentes grupos raciais

COHEN e cols. (1966), realizando um estudo com amostras de indivíduos Indianos, Japoneses, Negros, Judeus e Brancos não Judeus de origem anglo-saxônica, observaram diferenças significativas no comprimento do cromossomo Y, entre os grupos investigados. O comprimento médio deste cromossomo foi significativamente maior nos Japoneses, sendo que os dos Judeus, Negros, Indianos e Anglo-Saxões, apareciam subseqüentemente em ordem de tamanho.

STARKMAN & SHAW (1967), não encontraram diferenças significativas no comprimento do cromossomo Y de 20 Negros e 20 Caucasóides. Mas, observaram similarmente a COHEN e cols. (1966) numa amostra de 20 Japoneses que o comprimento médio do cromossomo Y, era significativamente maior do que o dos outros grupos estudados.

Estudos de GHOSH & SINGH (1975), feitos em dois grupos da Índia, os Rajputs, e Punjabis, demonstraram diferenças significativas no comprimento do cromossomo Y. Os autores observaram também, que os tamanhos dos cromossomos Y destes dois grupos, diferiam significativamente, quando comparados com os de diferentes populações.

MONSALVE e cols. (1980) utilizando o Índice Y/F, estudaram o comprimento do cromossomo Y de Japoneses, Italianos e Índios. Em cada um destes grupos raciais, duas diferentes amostras, cada uma constituída por 20 indivíduos, foram analisadas. Demonstraram que o comprimento médio do cromossomo Y dos Japoneses é maior do que dos Índios e Italianos, sendo que o destes últimos é menor do que dos Índios. Todas as diferenças foram estatisticamente significativas. Observaram também variações entre diferentes amostras de um mesmo grupo racial. O cromossomo Y da amostra de Italianos de São Paulo era, em média, maior do que a das amostras de Bogotá, o mesmo acontecendo com referência aos Japoneses de Bogotá e de São Paulo.

RIBEIRO e cols. (1981), utilizando a mesma metodologia do trabalho acima descrito, analisaram amostras constituídas de 25 indivíduos Japoneses e Italianos de Curitiba, e Indígenas da região Sul do Brasil. Verificaram que o cromossomo Y dos Japoneses era, em média, maior do que o dos Italianos e Índios, sendo destes últimos menor que o dos Italianos.

Considerando-se os trabalhos de MONSALVE e cols. (1980), e RIBEIRO e cols. (1981), observa-se que, ^{a variação} do tamanho do cromossomo Y em diferentes amostras de um mesmo grupo racial, não é restrita a Japoneses e Caucasóides, mas também, ocorre entre os Indígenas como já havia sido descrito por ERDTMANN (1979). Este autor, es-

tudando cinco tribos Indígenas do Brasil, observou que o tamanho das bandas-C terminais do braço longo do cromossomo Y, variava consideravelmente entre as tribos analisadas.

RIBEIRO e cols. (1981), estudando uma amostra constituída, de 25 Negros da população de Salvador, quanto ao comprimento do cromossomo Y, e comparando os resultados destes estudos com os obtidos anteriormente, observaram que, em média, o cromossomo Y dos Negros, era menor do que dos Japoneses e Italianos, mas similar ao dos Indígenas.

Algumas hipóteses e teorias tem sido apresentadas para explicar a variabilidade do tamanho do cromossomo Y em indivíduos de diferentes origens raciais, e, mesmo, entre diferentes amostras de um mesmo grupo racial.

FROTA-PESSOA & ARATANGY (1968) admitem a teoria da degeneração do cromossomo Y. Segundo estes autores, o cromossomo Y, antes homólogo do X, teria através da filogenia degenerado, por maior acúmulo de genes letais recessivos.

O cromossomo Y pode ter passado também, por fenômenos como duplicações e translocações que tendem a reconstituir seu tamanho.

COHEN (1966), já propunha que, em geral, a variação no comprimento total do cromossomo Y, deveria refletir diferenças na quantidade de material cromatídico, através de vários mecanismos, tais como: duplicações, deleções ou translocações. E que, as diferenças entre os grupos raciais, deve representar um verdadeiro polimorfismo cromossômico, cujos fatores que o mantêm na população, são ainda desconhecidos.

I.4.2. Variabilidade das regiões heterocromáticas e eucromáticas do cromossomo Y humano

Com o desenvolvimento das técnicas de bandeamento e especialmente com o emprego das bandas C e Q, tem sido possível uma melhor avaliação da variação do comprimento do cromossomo Y. Esta variação foi, em princípio, relacionada com o segmento fluorescente, enquanto que o segmento não fluorescente se manteria relativamente estável.

ROBISON & BUCKTON (1971), observaram que o comprimento do cromossomo Y variava de acordo com o segmento fluorescente. Rela-

taram também, não terem observado diminuição de intensidade de fluorescência com o aumento de comprimento, e, nem aumento de intensidade de fluorescência com o decréscimo de comprimento deste segmento.

BOBROW e cols. (1971) medindo as regiões fluorescentes e não fluorescentes do cromossomo Y de 12 indivíduos, demonstraram que a variação no comprimento total do cromossomo Y era devida somente à variação da região fluorescente.

Resultados semelhantes foram encontrados por LABERGE & GAGNÉ (1971), KNUNTILA & GRIPPENBERG (1972); NIELSEN & FRIEDRICH (1972).

Outros autores porém, detectaram que o segmento não fluorescente também contribui para variação do comprimento do cromossomo Y, se bem que menos significativamente do que o segmento menos fluorescente.

SCHNEDL (1971), encontrou uma pequena variação no segmento não-fluorescente proporcional ao tamanho total deste cromossomo.

TISHLER e cols. (1972), encontraram uma diferença de tamanho no segmento não-fluorescente, em 1, dos 16 indivíduos por eles examinados.

Estudos realizados por SOUDEK e cols. (1973) em 56 pacientes com deficiência mental, 30 dos quais portadores de um cromossomo Y longo e 26 apresentando um cromossomo Y de tamanho considerado normal, demonstraram também, que, a região não fluorescente do cromossomo Y aumenta proporcionalmente com o comprimento de todo o cromossomo.

JALAL e cols. (1974), admitiram que a região que não a banda-C terminal do cromossomo Y, seria invariável. Atribuíram as diferenças da região eucromática encontradas por outros autores, como devidas às diferenças do estágio de contração dos cromossomos estudados.

BRÖGGER e cols. (1977)- referiram que a variação em tamanho do cromossomo Y, não é causada por diferenças de contração, mas, sim, devida principalmente à variação da região fluorescente, e com menor extensão à região não-fluorescente.

YAMADA & HASEGAWA (1978), analisando um total de 157 indivíduos Japoneses, quanto ao comprimento do cromossomo Y, determinaram que, a variação no comprimento do braço longo deste cromossomo era resultante, principalmente, da variação do segmento fluorescente. Contudo, demonstraram existir uma ligeira tendência para o comprimento da região não fluorescente aumentar proporcio-

nalmente ao comprimento total do braço longo do cromossomo Y.

VERMA e cols. (1978) analisando o cromossomo Y de 60 indivíduos caucasóides, normais, observaram que as variações do comprimento deste cromossomo é dependente da variação da região fluorescente, como da não-fluorescente. Observaram também que as regiões fluorescentes e não-fluorescentes variam independentemente.

BELTRAN e cols. (1979) usando bandeamento C, em duas amostras de pais-filhos, das quais 27 pares eram normais, e 18 pares apresentavam o filho com malformações congênicas, mostraram que existe uma variação substancial no comprimento das regiões heterocromáticas e eucromáticas do cromossomo Y.

Com referência ao tamanho relativo do cromossomo Y, as bandas-C e também as Q, correspondem a cerca de 70% do comprimento total deste cromossomo, em amostras de populações de indivíduos que se caracterizam por possuir um cromossomo Y longo, tais como os Japoneses (EVANS, 1977).

Em indivíduos ou populações com um cromossomo Y pequeno, como os Aborígenes Australianos (ANGEL em 1973 segundo EVANS, 1977), a região de heterocromatina constitutiva é muito diminuta em tamanho, e pode chegar a estar ausente. Esta ausência representa a maior variação em termos de estrutura cromossômica.

1.4.3. Análise familiar

Desde que foi descrita a ocorrência de variantes do tamanho do cromossomo Y, demonstrou-se que as mesmas eram herdáveis (BISHOP e cols., 1962; DE LA CHAPELLE e cols., 1963; MAKINO e cols., 1963; MAKINO & TAKAGI, 1965; UNNERUS e cols., 1967).

McKAY e cols. (1972) analisaram em 21 famílias constituídas pelo pai e um filho, o comprimento total do cromossomo Y, do braço longo, do braço curto e do índice centromérico. O cálculo do coeficiente de correlação, para cada um destes parâmetros, indicou os seguintes valores: 0,92, 0,92, 0,82 e 0,87 respectivamente. Da mesma forma, a estimativa da herdabilidade (calculada através do coeficiente de regressão) apresentou os seguintes valores: 0,77, 0,82, 0,91 e 0,89 respectivamente, demonstrando a alta herdabilidade das variações do tamanho do cromossomo Y humano.

BELTRAN e cols. (1979) analisaram 45 pares de pais-filhos. Em 18 destas famílias, o filho apresentava malformações congêni-

tas. Os coeficientes de correlação e de regressão calculados entre os tamanhos das regiões heterocromática e eucromática dos cromossomos Y de pais e filhos, apresentaram para a região heterocromática valores altos, estatisticamente significativos em ambas as amostras ($r = 0,73$ para amostra de indivíduos normais e $0,74$ para a amostra em que o filho apresentava anomalias, e $b = 0,46$ e $0,70$ respectivamente). Com referência à região eucromática, os valores dos coeficientes de correlação e de regressão foram menores, sendo estatisticamente significativos para a segunda amostra ($r = 0,50$ e $b = 0,44$), enquanto que na primeira amostra os referidos coeficientes foram não significativos ($r = 0,21$ e $b = 0,11$).

CAVALLI e cols. (1981b) estudando o cromossomo Y, em 26 pares de pais-filhos (15 Japoneses e 11 Caucásios) encontraram, com referência a herdabilidade da região heterocromática, um coeficiente de regressão igual a $0,95$, e, de correlação igual a $0,86$; ambos significativos ao nível de $0,001$.

A variabilidade do cromossomo Y é um caráter hereditário que pode ser usado como marcador na determinação de paternidade. NUZZO e cols. (1966) propuseram que a análise morfológica do cromossomo Y é de interesse entre os métodos de exclusão de paternidade. DE LA CHAPELLE e cols. (1967), admitiram que o método é valioso quando o tamanho do cromossomo Y do suposto pai, é bem diferente do valor médio da população. Sugeriram ainda, que a análise do comprimento do cromossomo Y, deve ser usado na determinação de paternidade, quando os grupos séricos e sanguíneos não a excluem. As limitações apresentadas por eles com referência a este método, são devidas ao fato de somente ser válido para filhos do sexo masculino, e não poder ser utilizado quando os supostos pais apresentam relação de parentesco pelo lado paterno.

McKENZIE e cols. (1972), efetuando medidas comparativas no cromossomo Y, indicaram não paternidade em aproximadamente 28% dos casos onde realmente não existia paternidade. Exclusão de paternidade foi determinada através do comprimento do cromossomo Y, por GROUCHY (1977), em um caso onde a análise dos grupos sanguíneos não permitiu qualquer conclusão neste sentido. Utilizando técnica normal de coloração cromossômica, o autor verificou que o cromossomo Y do filho era 30% maior do que o do suposto pai. Com o uso de técnicas de bandeamento C e G, GROUCHY (1977), observou que as regiões marcadas pelas respectivas bandas, eram maiores no cromossomo Y do filho.

BALÍCEK e cols. (1978), estudando 10 famílias, demonstraram que, a comparação do comprimento da banda-C dos cromossomos 1, 9, 16 e Y conduz à rejeição de paternidade em 64% de indivíduos não relacionados. Excluindo o cromossomo Y, a percentagem cai para 61%. Estes autores acreditam, porém, que este método se torna limitado pelo fato da avaliação comparativa do tamanho dos blocos de heterocromatina constitutiva não ser simples, isto devido às diferenças do grau de contração cromossômica.

A estabilidade dos segmentos de heterocromatina é um problema importante, particularmente do ponto de vista da evidência forense. Por isso, BALÍCEK e cols. (1978), sugerem o emprego de método de correção para eliminar o efeito da contração diferencial, o que deverá dar a verdadeira medida da banda-C, tornando assim este método de determinação de paternidade mais válido.

I.5. OBJETIVOS

Os métodos de bandeamento Q e C, possibilitaram a identificação citológica das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y humano. A variabilidade do tamanho do cromossomo Y humano, extensivamente demonstrada pelo emprego das técnicas convencionais, pode, em consequência, ser analisada ao nível destas regiões.

Na maioria dos trabalhos foi utilizado o bandeamento-Q e os resultados foram contraditórios. Alguns autores, admitem que somente a região fluorescente é a responsável pela variação do tamanho do cromossomo Y (BOBROW e cols., 1971; LABERGE & GAGNÉ, 1971; KNUNTILA & GRIPPENBERG, 1972; NIELSEN & FRIEDRICH, 1972), enquanto que outros demonstraram uma participação da região não fluorescente na referida variabilidade (SCHNEDL, 1971; SOUDEK e cols., 1973; BRÖGGER e cols., 1977; VERMA e cols., 1978).

As bandas-C foram comparativamente menos utilizadas, sendo que novamente os resultados foram contraditórios (JALAL e cols., 1974; BELTRAN e cols., 1979). Um importante fator, freqüentemente citado na análise crítica dos diferentes resultados, refere-se ao estágio de contração dos cromossomos metafásicos (JALAL e cols., 1974), ERDTMANN (1979) salientou a necessidade de se estabelecer um critério de correção quanto ao estágio de contração dos cromossomos, para uma melhor avaliação da participação das regiões heterocromática e eucromática na variabilidade do cromossomo Y humano.

Utilizando o método de bandeamento C e corrigindo os cromossomos quanto ao estágio de contração, tivemos os seguintes objetivos:

- 1- Analisar quantitativamente o cromossomo Y humano em indivíduos de diferentes origens raciais (Japoneses e Caucásios), estabelecendo os tamanhos absoluto e relativo das regiões heterocromática e eucromática, e absoluto do cromossomo Y.
- 2- Verificar se a variabilidade do tamanho do cromossomo Y é devida somente as variações da região heterocromática ou se a região eucromática (definida como toda região do cromossomo Y que não a banda-C terminal) também contribui para que as mesmas ocorram.
- 3- Verificar se a diferença entre o tamanho médio do cromossomo Y de Japoneses e Caucásios é devida somente a diferença da região heterocromática, ou se a região eucromática apresenta diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos raciais.
- 4- Através do coeficiente de regressão, calcular a herdabilidade das variações das regiões eucromática, heterocromática e do tamanho total do cromossomo Y, em 30 pares de pais-filhos.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1. AMOSTRA

A amostra, constituída de 45 indivíduos Japoneses e 45 indivíduos Caucasoídes, perfazendo um total de 90 indivíduos da população de Curitiba, foi selecionada, principalmente, a partir de estudantes e professores da Universidade Federal do Paraná, incluindo também seus parentes.

Estes indivíduos podem ser classificados como tendo um nível sócio-econômico médio.

Os 90 indivíduos foram separados para constituir duas subamostras. A primeira, foi denominada de pais e não pais, e, a segunda, de filhos. Na primeira subamostra, foram incluídos 30 indivíduos de origem Japonesa e 30 de origem Caucasoíde, sendo, 75% destes, Italianos, ou descendentes de Italianos. Ainda, desta primeira subamostra, foram separados 15 indivíduos de origem Japonesa e 15 Caucasoídes, e os filhos destes indivíduos forneceram material para a segunda subamostra.

Assim, um filho de cada um dos 15 indivíduos representando os grupos raciais em questão, foram estudados, e constituíram a segunda subamostra, com um total de 30 indivíduos.

A Tabela 1 apresenta a idade média dos indivíduos de cada grupo racial, em cada subamostra. A média das idades dos Caucasoídes foi superior a dos Japoneses nas duas subamostras, não tendo ocorrido, no entanto, diferença estatisticamente significativa em nenhum dos casos.

Tabela 1. Idade média do total de indivíduos da amostra subdividida em duas subamostras, classificadas de acordo com o grupo racial.

Subamostra	Japoneses		Caucasóides		Total	
	N	$\bar{X} \pm DP$	N	$\bar{X} \pm DP$	N	$\bar{X} \pm DP$
Pais e não pais	30	37,1±14,1	30	45,2±13,1	60	41,1±14,1
Filhos	15	13,8± 7,9	15	20,0±11,6	30	16,9±10,2
Total	45	29,4±16,5	45	36,8±17,3	90	33,1±17,2

N = nº de indivíduos; \bar{X} = média; DP = desvio padrão.

II.2. COLETA DO MATERIAL, CULTURA E PREPARAÇÃO CITOLÓGICA

II.2.1. Coleta do material

De cada indivíduo, foram coletados 5 ml de sangue periférico, através de punção venosa com seringas descartáveis, previamente heparinizadas com Liquemine Roche 5000 UI/ml.

Após a coleta, a seringa era mantida em posição vertical, com a agulha voltada para cima, dentro da câmara asséptica.

Após aproximadamente 2 horas, o plasma era colocado em cultura, e as hemácias, tipadas para os sistemas eritrocitários ABO e Rh.

Quando a técnica de microcultura era utilizada, 3-5 gotas de sangue total eram colocadas diretamente nos tubos de cultura.

II.2.2. Cultura e preparação citológica

As culturas de linfócitos do sangue periférico foram feitas empregando-se a técnica de MOORHEAD e cols. (1960), modificada.

As macroculturas foram feitas adicionando-se 1,0 ml de plasma em Kits da DIFCO (TC Chromosome medium with reconstituting fluid - cod. 5102-32).

As microculturas foram realizadas em meios padronizados para microtécnica, da GIBCO (Chromosome medium 4).

Após incubação de 71 horas a 37°C, adicionava-se 0,1 ml de colchicina Houdee (1 mg para 25 ml de água bidestilada) às macroculturas, e, 0,05 ml às microculturas. Após 72 horas de incubação, fazia-se a preparação citológica, conforme as seguintes etapas:

- 1- As culturas foram transferidas para os tubos de centrífuga e centrifugadas a 900 rpm durante 5 minutos.
- 2- O sobrenadante era retirado, e, adicionado, inicialmente, 1 ml de KCl (0,075M) a 37°C. O material era ressuscitado lentamente, após o que, se acrescentava mais 2 ml de KCl. Esta etapa não ultrapassou 5 minutos. Submeteu-se novamente à centrifugação a 900 rpm durante 5 minutos, e retirou-se o sobrenadante.
- 3- Acrescentou-se, inicialmente, 1 ml de fixador (3 volumes de

metanol para 1 de ácido acético glacial) recém preparado, e, após ressuspender, completou-se para 3 ml de fixador, ressuspensando novamente.

- 4- Após o que, o material permaneceu na geladeira, por um período de 30 a 60 minutos.
- 5- Em seguida, o material era centrifugado a 900 rpm por 5 minutos. Retirado o sobrenadante, era repetida, pelo menos duas vezes, a etapa nº 3.
- 6- Ao sedimento final, adicionou-se 0,5 ml de fixador quando a microtécnica foi usada, e, 1 ml quando da utilização da macro-técnica.
- 7- 2 a 3 gotas da suspensão celular eram distribuídas em lâminas, previamente mantidas em álcool absoluto, na geladeira.
- 8- A secagem ocorria naturalmente, após o que, o material era guardado o tempo suficiente para obtenção das bandas-C.

II.3. BANDEAMENTO-C

As bandas-C foram obtidas utilizando a técnica de SUMNER (1972), ligeiramente modificada, que consiste no seguinte:

- hidrólise ácida em HCl 0,2N por 30 minutos, à temperatura ambiente;
- desnaturação básica em hidróxido de bário 5%, a 60°C. O tempo variou de 15 segundos em lâminas novas (até 7 dias), e, de 30 a 45 segundos, em lâminas mais velhas (até 15 dias);
- rinsar em água desionizada;
- incubar em solução de 2SSC, pH 7,0, a 60°C, por 60 minutos;
- rinsar em água desionizada;
- corar em uma solução de Giemsa 5%, tamponada a pH 6,8, durante 3 a 5 minutos. O Giemsa tamponado foi preparado na proporção de 1 parte de Giemsa para 40 partes de tampão fosfato pH 6,8 (Na_2HPO_4 M/15 + KH_2PO_4 M/15) diluído (3 partes de água desionizada e 1 parte de tampão);
- rinsar em água desionizada;
- secar em temperatura ambiente;
- montar em permount.

II.4. OBTENÇÃO DOS NEGATIVOS

Foram fotografadas em média 4 células por indivíduo, cuja seleção foi feita através da qualidade das bandas do par A1 e do cromossomo Y.

As metáfases selecionadas, foram fotografadas em fotomicroscópio ótico Leitz modelo Ortholux I), com filme "high contrast" 12 ASA; objetiva 100, filtro verde sem contraste de fase. Foi usado o processo convencional para obtenção dos negativos.

II.5. MEDIDAS

As medidas de comprimento foram realizadas diretamente sobre o negativo por um único observador. Foram medidos o comprimento da região eucromática do par A1 (A1 q-h), e, o das regiões eucromática e heterocromática do cromossomo Y, de 339 células. Em geral, foram medidas 4 células de cada indivíduo.

Convencionou-se considerar como região eucromática do cromossomo Y, toda região que não a banda-C terminal.

Para realização das medidas, foi utilizado um fotomicroscópio I da Zeiss, equipado com platina automática, com passos de 0,5 M, objetiva 1X, optovar 1,25X, diafragma do fotômetro de abertura circular de 0,05 M, e fotômetro 01, estando acoplado ao sistema registrado Segovar RE541. Um placa de acrílico foi ajustada ao comando de platina com as quatro posições dos quadrantes demarcados, o que permite a sua orientação manual em apenas um sentido.

O diafragma usado foi o de medida circular.

Foi de $41,583 \pm 0,292$ o aumento final do cromossomo, para a curva de registro.

Estes dados foram obtidos a partir da lâmina de referência, com subdivisões de 10 μ , que foi fotografada, sendo, o negativo, medido em toda sua extensão.

Com o auxílio de uma régua milimetrada, foram efetuadas as medidas de comprimento sobre a curva de registro. Os dados foram transformados em micra. Assim, todos os valores absolutos apresentados neste trabalho, estão expressos em micra.

O ponto intermediário entre a base da curva e o início de sua inclinação, foi tomado como ponto inicial para medida da re-

gião Al q-h.

Através de observação direta ao microscópio, era obtido o limite, entre as regiões eucromáticas e heterocromáticas, bem como, a delimitação do cromossomo Y.

A medida da densidade ótica era registrada na curva, quando colocava-se a abertura do diafragma do fotômetro no ponto considerado limite. Eram feitas duas marcações nos pontos cujo limite fosse duvidoso. Nestes casos, a média das marcas era utilizada.

As figuras 1 e 2 mostram as curvas obtidas do braço longo do cromossomo Al, do cromossomo Y, respectivamente, bem como os limites das regiões eucromáticas e heterocromáticas.

II.6. CORREÇÃO QUANTO AO ESTÁGIO DE CONTRAÇÃO

De posse do valor médio da região eucromática do braço longo do cromossomo 1 ($2,96 \pm 0,65$) das 339 células analisadas, e, do coeficiente de regressão, obtido entre os valores da região heterocromática, e, dos valores médios do comprimento da região eucromática do braço longo do par nº 1 (Al q-h) (Tabela 2), estabeleceu-se a seguinte equação:

$$CY(\text{corr.}) = CY \text{ obs} + \left| \frac{(2,96 - e)(0,13CY \text{ obs})}{(0,13(e - 2,96) + 1)} \right|$$

Onde $CY(\text{corr.})$ = banda-C do cromossomo Y corrigida;

$CY \text{ obs}$ = banda-C do cromossomo Y medida;

2,96 = valor médio da região eucromática do braço longo do cromossomo Al das 339 células analisadas;

0,13 = quociente aproximado, resultante da divisão do coeficiente de regressão pelo comprimento médio das bandas-C do cromossomo Y das 339 células analisadas (Tabela 2).

O valor 2,96 - e, representa a diferença entre o estágio de contração da célula sob análise, e, a média geral de todas as células (2,96). A diferença, é ponderada pelo produto de um mesmo valor médio, relativo, (0,13), pelo comprimento da banda-C sob análise. O valor obtido, é dividido por $|0,13(e - 2,96) + 1|$ o qual estabelece uma correção. Sem esta correção, as bandas distendidas, sofreriam redução maior do que é previsto, e as contraídas, não receberiam o acréscimo devido.

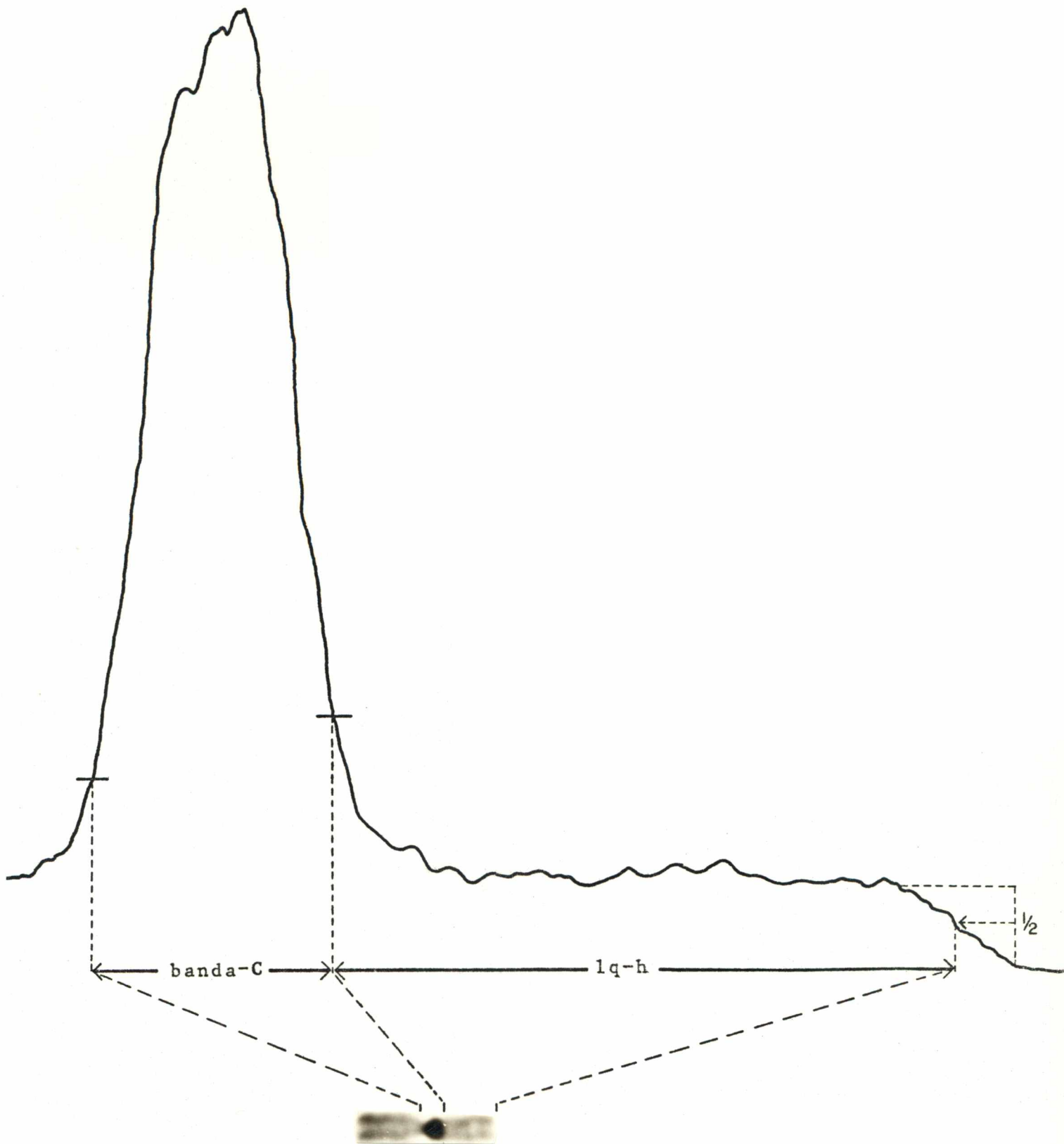


Figura 1. Curva, obtida em fotodensitometria, do braço longo do cromossomo 1, distinguindo-se a região eucromática (1q-h) e a heterocromática (banda-C) (I.J. CAVALLI).

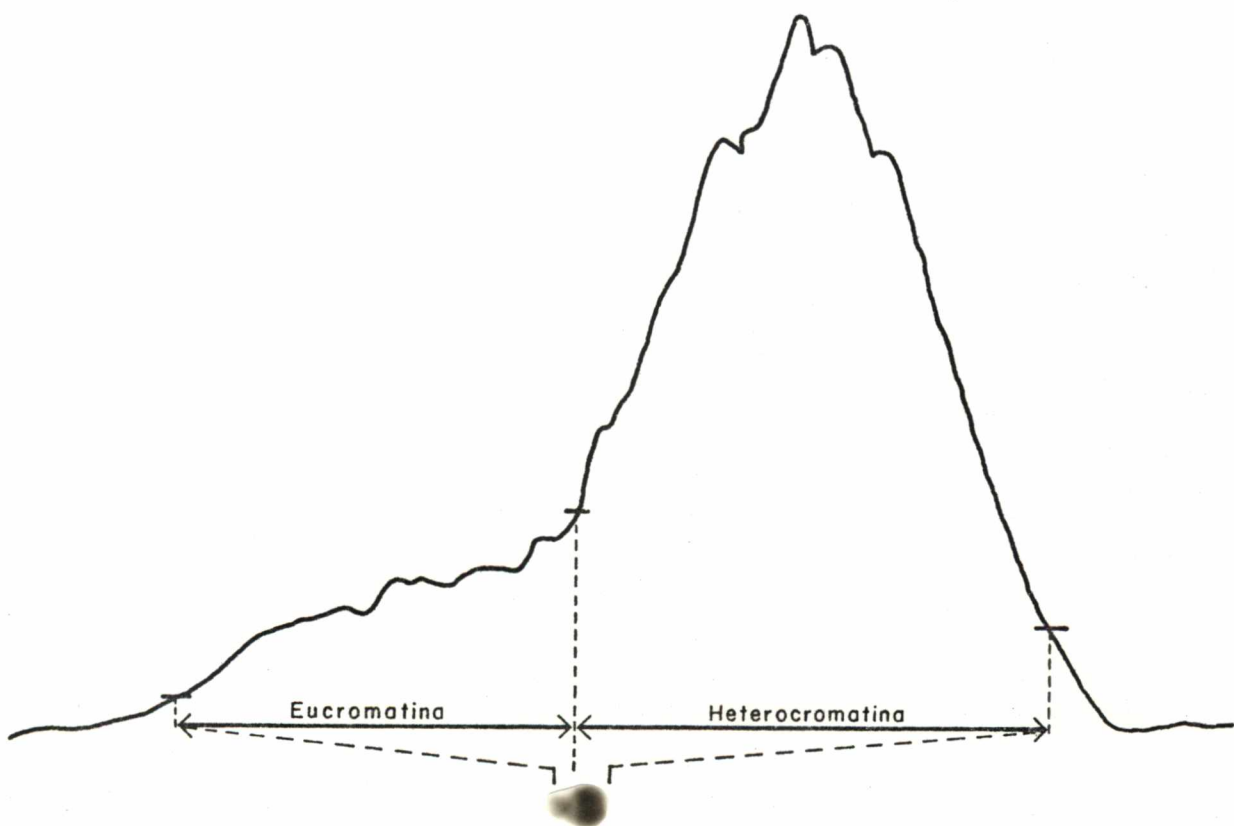


Figura 2. Curva, obtida em fotodensitometria, do cromossomo Y distinguindo-se a região eucromática e a heterocromática.

Tabela 2. Valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) calculados entre os comprimentos das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y e os da região eucromática do braço longo do cromossomo 1 (1q-h) da mesma célula.

Região	N	$\bar{X} \pm DP$	$b \pm s(b)$	r	b/\bar{X}
Heterocromática	339	1,329±0,303	0,170±0,024***	0,364***	0,128
Eucromática	339	1,042±0,210	0,167±0,015***	0,515***	0,160

N = número de cromossomos; \bar{X} = média; DP = desvio padrão; s(b) = desvio padrão do coeficiente de regressão.

*** = significativo ao nível de 0,001

Da mesma forma, para estabelecer a equação de correção da região eucromática, obtivemos o coeficiente de regressão entre os valores desta região e dos valores médios do comprimento da região eucromática do braço longo do par nº 1, das 339 células analisadas (Tabela 2).

A equação é a seguinte:

$$\text{Euc. corrig.} = \text{Euc. obs.} + (2,96 - e) 0,16$$

Onde Euc. corrig. = região eucromática do cromossomo Y corrigida.

Euc. obs. = região eucromática do cromossomo Y medida.

0,16 = quociente resultante da divisão do coeficiente de regressão, pelo comprimento médio das regiões eucromática do cromossomo Y das 339 células analisadas (Tabela 2).

Neste caso, admitiu-se que, as diferenças de tamanho das regiões eucromática do cromossomo Y, são devidas, somente, às diferenças do estágio de contração da célula.

Este método de correção, foi elaborado, e, extensivamente testado por ERDTMANN e cols. (1978), tendo-se mostrado eficiente em todas as situações em que o valor $lq-h$ não excede 5μ .

II.7. OUTRAS VARIÁVEIS METODOLÓGICAS

Além do estágio de contração dos cromossomos, uma série de outras variáveis podem influenciar na fidelidade dos resultados obtidos. ERDTMANN (1979) demonstrou que, a obtenção das bandas-C pelo método CNG, resultou em bandas de tamanho menor do que as obtidas pelo método CBG. O mesmo autor também demonstrou que, as preparações "envelhecidas" por muito tempo, resultavam em bandas-C menores do que as menos envelhecidas.

Todo nosso material foi tratado pelo método CBG e todas as bandas foram obtidas em preparações "envelhecidas" no máximo por 15 dias, de tal forma que, foram afastadas estas duas variáveis metodológicas. Embora na maioria das culturas tenha sido utilizada a macrotécnica, em alguns casos isso não foi possível. No entanto, CAVALLI (1981), não encontrou diferenças no tamanho das bandas-C em função do emprego da microtécnica ou da macrotécnica. Desta forma, das variáveis conhecidas, restaram duas, referentes às próprias medidas. Na Tabela 3 estão apresentadas as médias das diferenças entre 2 medidas, das regiões heterocromática, eucromá-

Tabela 3. Média das diferenças entre duas medidas das regiões heterocromática, eucromática e do tamanho total do cromossomo Y, avaliadas em 30 células.

	$\bar{X} \pm DP$	\bar{X}'	$(DP/\bar{X}')100$
Heterocromatina	$0,028 \pm 0,158$	1,326	11,9
Eucromatina	$-0,029 \pm 0,149$	1,125	13,2
Y total	$-0,001 \pm 0,149$	2,450	6,1

\bar{X} = média das diferenças; DP = desvio padrão; \bar{X}' = tamanho médio; $(DP/\bar{X}')100$ = % da diferença.

tica e do comprimento total do cromossomo Y, obtidas em 30 células.

Observa-se que as médias das diferenças são bastante baixas, de onde se deduz, não terem ocorrido desvios significativos entre diferentes medidas numa mesma estrutura. Da divisão do desvio padrão da média das diferenças, pela média de cada uma das regiões e do cromossomo Y, resultou um coeficiente de variação de cada uma das regiões e do cromossomo Y, em função da diferença de repetição da medida (Tabela 3). A Tabela 4 apresenta a média das diferenças entre as medidas das regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y de 3 diferentes células do mesmo indivíduo, avaliados em 30 indivíduos. Novamente, as médias das diferenças permaneceram em torno de zero.

II.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística seguiu os seguintes passos:

- 1- Teste de normalidade no grupamento de dados, utilizando o teste do χ^2 , onde, as frequências esperadas para os diferentes intervalos de classe, foram obtidas através do teste Z.
- 2- O grau de assimetria foi verificado através do coeficiente de Pearson:

$$\frac{3(\bar{X}-M_i)}{s(x)}$$
- 3- Cálculo da razão dos quadrados médios, (F), das regiões heterocromáticas, eucromáticas e Y total, entre Japoneses e Caucásios.
- 4- A comparação das médias foi feita através do teste t, de "Student", conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1977).
- 5- Análise de regressão e correlação entre:
 - o tamanho da região eucromática (x) e do cromossomo Y(y);
 - o tamanho da região heterocromática (x) e do cromossomo Y(y);
 - o tamanho da região heterocromática (x) e o da região eucromática (y).

Tabela 4. Média das diferenças entre as medidas das regiões heterocromática, eucromática e do tamanho total do cromossomo Y, de 3 diferentes células do mesmo indivíduo, avaliadas em 30 indivíduos.

	$\bar{X} \pm DP$	\bar{X}'	$(DP/\bar{X}')100$
Heterocromatina	-0,0003 \pm 0,248	1,325	18,7
Eucromatina	0,004 \pm 0,251	1,017	24,7
Y total	0,00002 \pm 0,364	2,341	15,5

\bar{X} = média das diferenças; DP = desvio padrão; \bar{X}' = tamanho médio; $(DP/\bar{X}')100$ = % da diferença.

6- O cálculo de herdabilidade foi feito através da análise de regressão.

Todos os cálculos foram efetuados em uma calculadora Texas TI 57, programável

III - RESULTADOS

Na Tabela 5 estão apresentados os valores dos tamanhos absolutos das regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y, classificados em ordem crescente de acordo com o tamanho do cromossomo Y, dos 30 indivíduos Japoneses. Os valores da região heterocromática variam de 0,758 μ (indivíduo nº 1) a 1,884 μ (indivíduo nº 30), ocorrendo uma diferença entre estes dois valores de 59%. Os valores da região eucromática variam de 0,786 μ (indivíduo nº 4) a 1,278 μ (indivíduo nº 27) com uma diferença de 38%. O comprimento total do cromossomo Y varia de 1,684 μ (indivíduo nº 1) a 2,884 μ (indivíduo nº 30), sendo a diferença igual a 42%.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores dos tamanhos absolutos das mesmas regiões, dispostos segundo o mesmo critério de classificação, utilizado para a amostra Japonesa, dos indivíduos Caucásides. Os valores da região heterocromática variam de 0,990 μ (indivíduo nº 1) a 1,633 μ (indivíduo nº 30) com uma diferença de 39%. A região eucromática apresenta valores extremos de 0,795 μ (indivíduo nº 3) e 1,228 μ (indivíduo nº 24) com 35% de diferença. O comprimento total do cromossomo Y tem um valor mínimo igual a 1,893 μ (indivíduo nº 1) e máximo igual a 2,678 μ (indivíduo nº 30) ocorrendo uma diferença de 29%.

Verifica-se que as maiores diferenças ocorrem na região heterocromática em ambos os grupos raciais, e que o tamanho das regiões heterocromática e eucromática e do cromossomo Y diferem mais entre os Japoneses.

As figuras 3, 4 e 5 apresentam os polígonos de frequência das distribuições dos tamanhos das regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y de 30 Japoneses e 30 Caucásides. Em nenhum dos casos a distribuição observada apresentou diferença es-

Tabela 5. Tamanho absoluto (μ) das regiões heterocromática, eucromática e total do cromossomo Y de 30 Japoneses.

Indivíduo	Heterocromatina	Eucromatina	Y total
nº			
01	0,758	0,926	1,684
02	0,795	1,114	1,909
03	1,013	0,936	1,949
04	1,221	0,786	2,007
05	1,183	0,872	2,055
06	1,255	0,860	2,115
07	1,204	1,017	2,221
08	1,198	1,084	2,282
09	1,310	0,988	2,298
10	1,399	0,941	2,340
11	1,411	0,945	2,356
12	1,324	1,083	2,407
13	1,317	1,120	2,437
14	1,368	1,071	2,439
15	1,308	1,173	2,481
16	1,265	1,226	2,491
17	1,303	1,215	2,518
18	1,641	0,882	2,523
19	1,435	1,091	2,526
20	1,497	1,030	2,527
21	1,708	0,857	2,565
22	1,461	1,114	2,575
23	1,526	1,062	2,588
24	1,552	1,046	2,598
25	1,495	1,167	2,662
26	1,583	1,094	2,677
27	1,402	1,278	2,680
28	1,735	0,986	2,721
29	1,746	1,127	2,873
30	1,884	1,000	2,884

Tabela 6. Tamanho absoluto (μ) das regiões heterocromática, eucromática e total do cromossomo Y de 30 Caucásios.

Indivíduo	Heterocromatina	Eucromatina	Y total
nº			
01	0,990	0,903	1,893
02	1,098	0,844	1,942
03	1,158	0,795	1,953
04	1,067	0,900	1,967
05	1,032	0,973	2,005
06	1,126	0,896	2,022
07	1,088	0,956	2,044
08	1,124	0,940	2,064
09	1,122	0,956	2,078
10	1,228	0,930	2,158
11	1,032	1,143	2,175
12	1,108	1,083	2,191
13	1,157	1,034	2,191
14	1,163	1,044	2,207
15	1,353	0,855	2,208
16	1,167	1,070	2,237
17	1,085	1,163	2,248
18	1,331	0,953	2,284
19	1,387	0,915	2,302
20	1,167	1,143	2,310
21	1,359	1,056	2,415
22	1,354	1,077	2,431
23	1,374	1,072	2,446
24	1,246	1,228	2,474
25	1,463	1,028	2,491
26	1,400	1,104	2,504
27	1,491	1,017	2,508
28	1,517	1,031	2,548
29	1,519	1,133	2,652
30	1,633	1,045	2,678

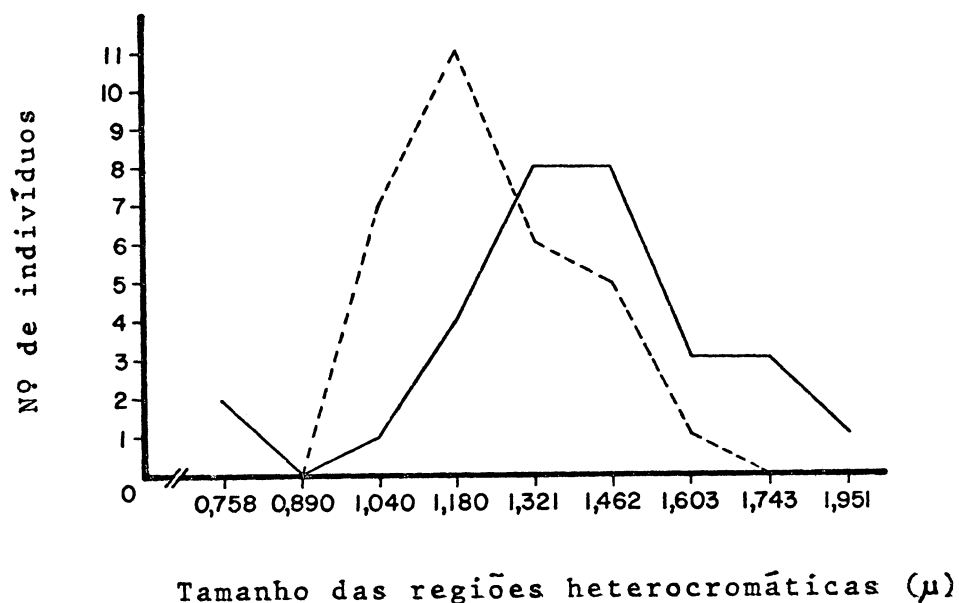


Figura 3. Polígonos de frequência da distribuição dos tamanhos da região heterocromática do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucásóides.

— Japoneses: $\bar{X} = 1,377$; $DP = 0,254$.
 $Mi = 1,368$. $CP = 0,106$. $\chi_1^2 = 1,468$;
 $P > 0,20$.

---- Caucásóides: $\bar{X} = 1,245$; $DP = 0,173$.
 $Mi = 1,167$. $CP = 1,353$. $\chi_1^2 = 1,522$;
 $P > 0,20$.

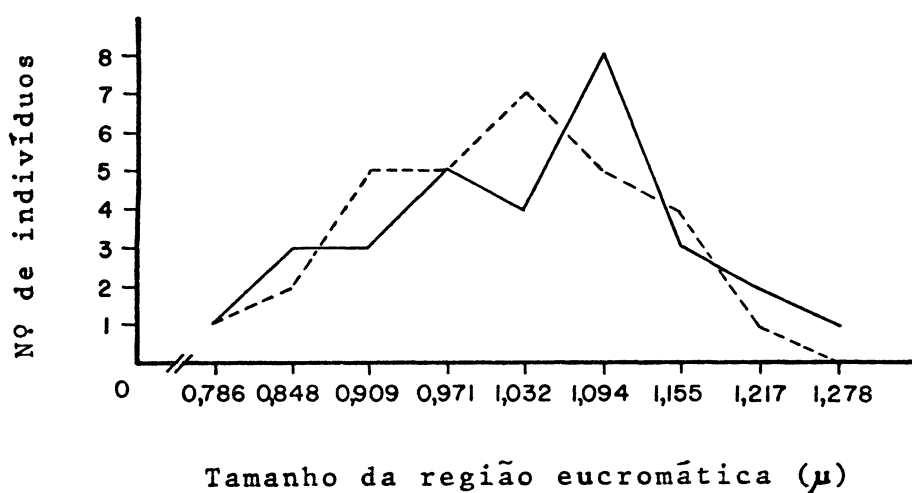


Figura 4. Polígonos de frequência da distribuição dos tamanhos da região eucromática do cromossomo Y de 30 Japoneses e 30 Caucásoides.

— Japoneses: $\bar{X} = 1,036$; DP = 0,121.
 $M_i = 1,046$. CP = -0,248. $\chi^2_2 = 3,964$; P > 10.

---- Caucásoides: $\bar{X} = 1,009$; DP = 0,105.
 $M_i = 1,028$. CP = -0,543. $\chi^2_2 = 3,576$; P > 10.

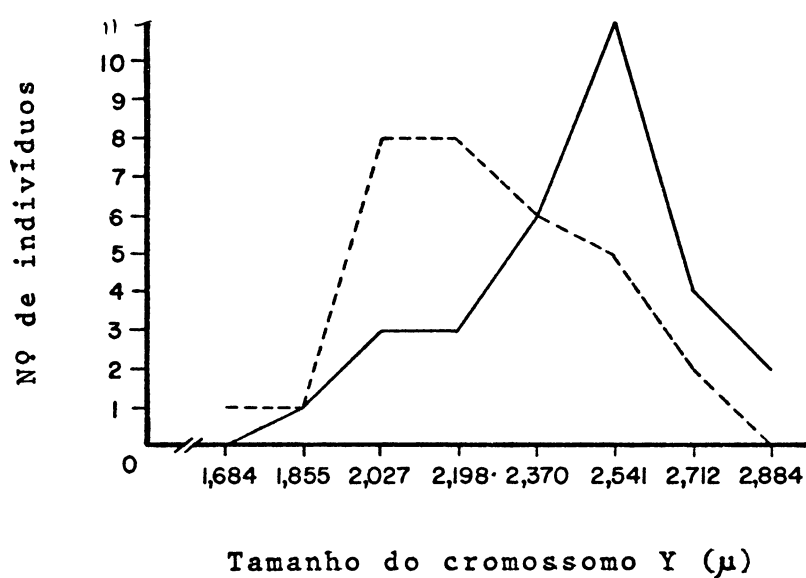


Figura 5. Polígonos de frequência da distribuição dos tamanhos do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucasóides.

— Japoneses: $\bar{X} = 2,413$; DP = 0,285. Mi = 2,481. CP = 0,716.
 $\chi^2_1 = 2,354$; $P > 0,10$.

---- Caucasóides: $\bar{X} = 2,254$; DP = 0,220. Mi = 2,237. CP = 0,232.
 $\chi^2_1 = 1,256$; $P > 0,50$.

taticamente significativa das freqüências teóricas da distribuição normal, sendo que, os valores de assimetria de Pearson foram positivos para distribuição dos valores da região heterocromática, e, negativos para os das regiões eucromática, em ambos grupos raciais. No que se refere ao tamanho total do cromossomo Y, o valor de assimetria foi negativo para a amostra de Japoneses, e positivo para a de Caucásóides.

As figuras 6, 7 e 8, apresentam os diagramas de distribuição e retas de regressão dos dados apresentados nas Tabelas 5 e 6. Observa-se que há correlação positiva com significância estatística ao nível de 0,001 entre os valores da região heterocromática e do cromossomo Y, e entre os valores da região eucromática e os do cromossomo Y (Figs. 6 e 7). A correlação entre os valores das regiões heterocromática e eucromática é baixo, não diferindo estatisticamente de zero (Fig. 8).

A Tabela 7, resume os achados com referência aos coeficientes de correlação calculados conforme acima foi descrito, dentro de cada grupo racial e no total da amostra. Somente os coeficientes de correlação obtidos entre os valores das regiões heterocromática e eucromática, não apresentaram valores estatisticamente significativos.

As Tabelas 8 e 9, apresentam os valores relativos da região heterocromática e eucromática de 30 Japoneses e 30 Caucásóides, respectivamente.

A Tabela 10, apresenta as médias dos tamanhos absoluto e relativo das regiões heterocromática e eucromática, e do cromossomo Y de 30 Japoneses e 30 Caucásóides. Os Japoneses apresentam o tamanho, tanto da região heterocromática, como do cromossomo Y, maior do que os Caucásóides, com diferença estatisticamente significativa ao nível de 0,05. As diferenças do tamanho absoluto da região eucromática e dos relativos, de ambas as regiões observadas entre Japoneses e Caucásóides, não apresentam diferença estatisticamente significativa. Em ambos os grupos raciais, a região heterocromática representa cerca de 55% do tamanho do cromossomo Y.

A Tabela 11, apresenta o tamanho da região heterocromática dos pais e filhos nas 30 famílias estudadas, e classificadas de acordo com o tamanho do cromossomo Y. Observa-se que os valores variam de 0,938 μ no filho da família 7 a 1,946 μ no filho da família 30, com uma diferença de 52%. As diferenças do tamanho desta região, entre os valores encontrados nos pais e filhos são

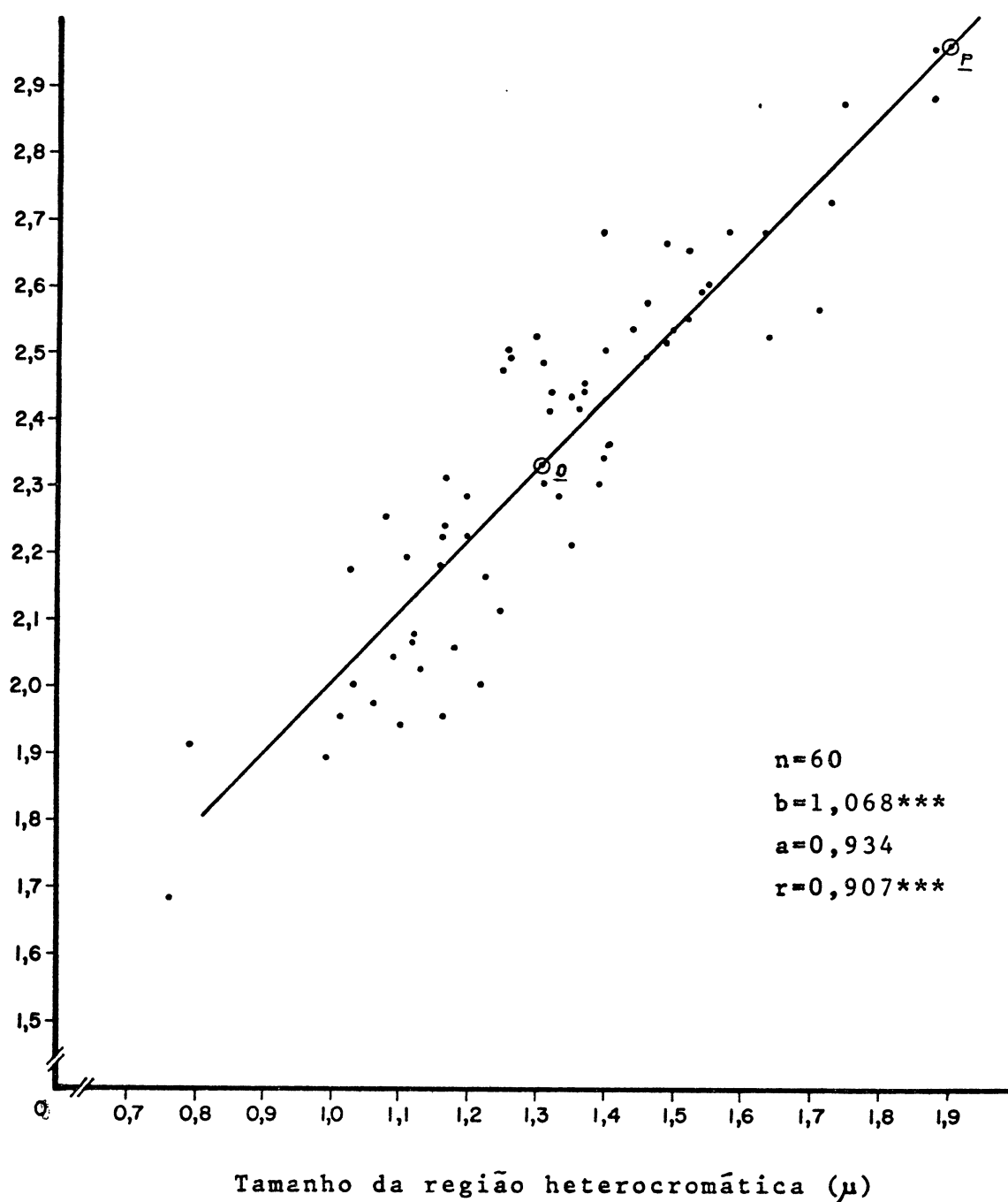


Figura 6. Diagrama de distribuição dos valores da região heterocromática e do cromossomo Y, apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão obtida a partir dos pontos Q ($\bar{X} = 1,310$; $\bar{Y} = 2,334$) e P ($X = 1,900$; $Y = 2,964$).

*** Significativo ao nível de 0,001.

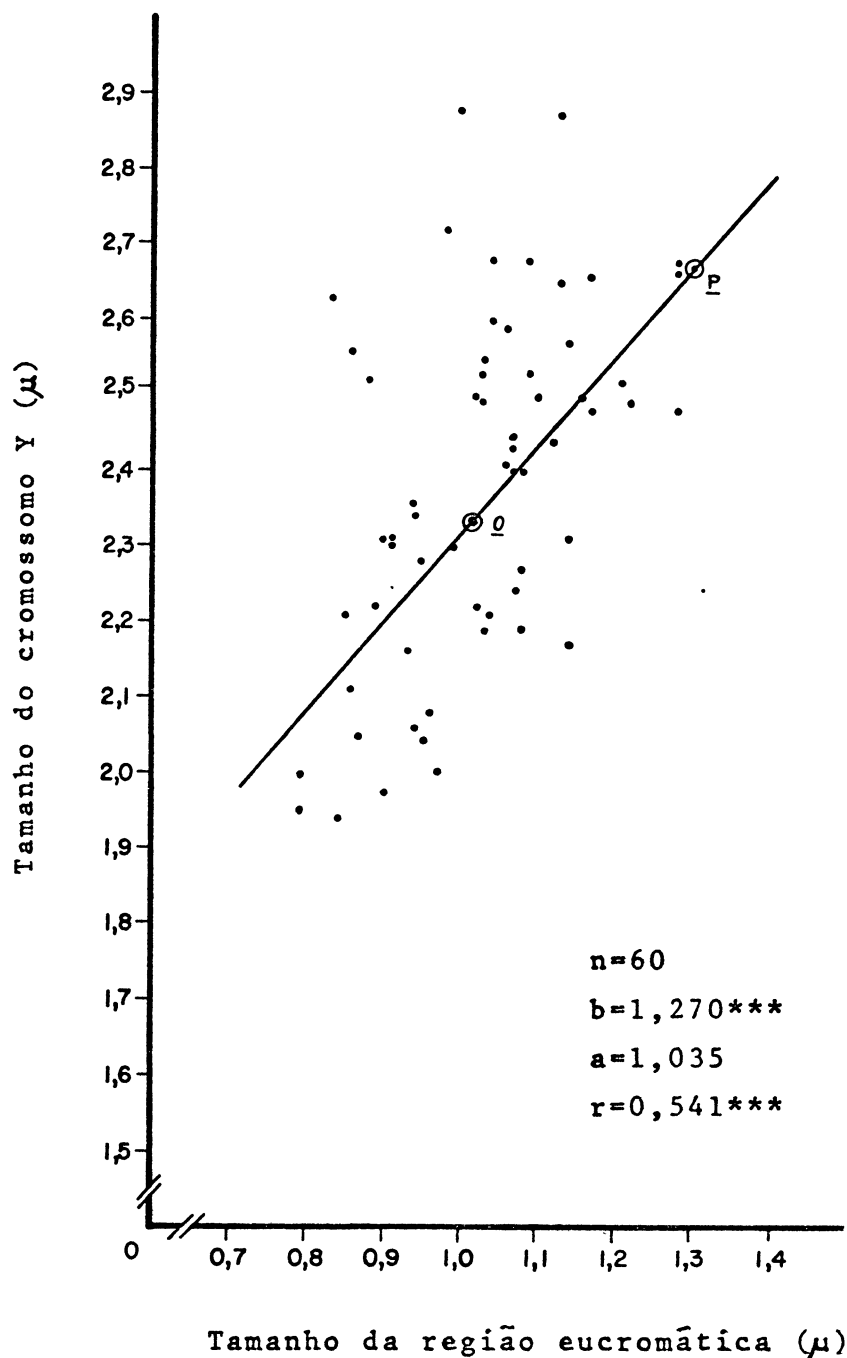


Figura 7. Diagrama de distribuição dos valores da região eucromática e do cromossomo Y, apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão obtida a partir dos pontos Q ($\bar{X} = 1,023$; $\bar{Y} = 2,334$) e P ($X = 1,300$; $Y = 2,685$).

*** Significativo ao nível de 0,001.

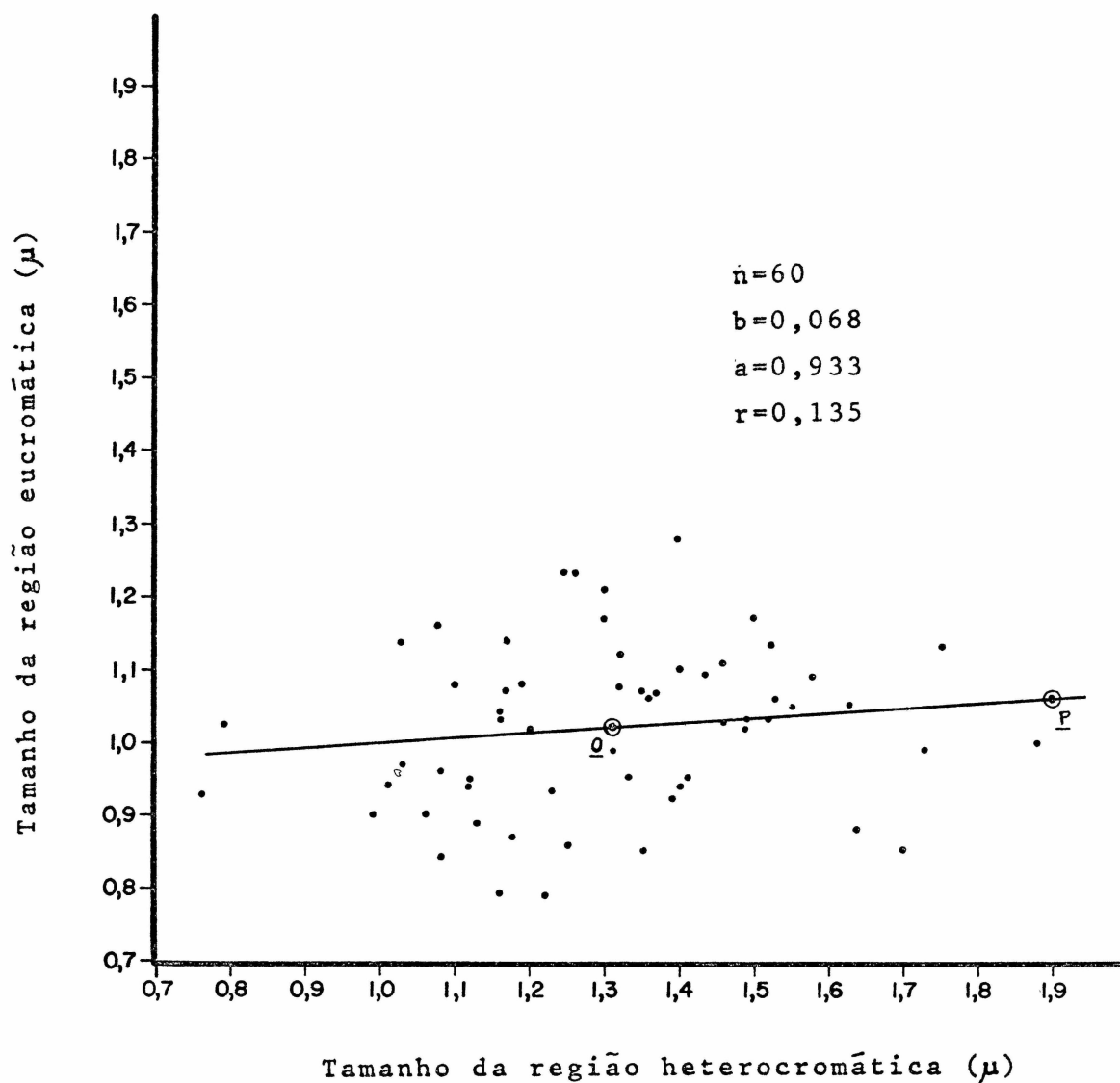


Figura 8. Diagrama de distribuição dos valores das regiões heterocromática e eucromática apresentados nas Tabelas 5 e 6 e reta de regressão obtida a partir dos pontos Q ($\bar{X} = 1,310$; $\bar{Y} = 1,023$) e P ($X = 1,900$; $Y = 1,063$).

Tabela 7. Valores dos coeficientes de correlação (r) calculados entre os tamanhos das regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y e entre os de ambas as regiões.

Correlações	Grupo racial	N	r	t	P
Heterocromatina e Y total	J	30	0,906	11,319	<0,001
	C	30	0,886	10,105	<0,001
	J+C	60	0,907	16,355	<0,001
Eucromatina e Y total	J	30	0,449	2,658	<0,02
	C	30	0,643	4,437	<0,001
	J+C	60	0,541	4,899	<0,001
Heterocromatina e Eucromatina	J	30	0,043	0,226	>0,80
	C	30	0,214	1,156	>0,20
	J+C	60	0,135	1,040	>0,30

J = Japônês; C = Caucásioide; N = Número de comparações.

Tabela 8. Tamanho relativo (heterocromatina ou eucromatina X100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y de 30 Japoneses.

Indivíduo	Heterocromatina	Eucromatina
nº		
01	45,01	54,99
02	41,64	58,36
03	51,98	48,03
04	60,84	39,16
05	57,57	42,43
06	59,34	40,66
07	54,21	45,79
08	52,50	47,50
09	57,01	42,99
10	59,79	40,21
11	59,89	40,11
12	55,01	44,99
13	54,04	45,96
14	56,09	43,91
15	52,72	47,28
16	50,78	49,22
17	51,75	48,25
18	65,04	34,96
19	56,81	43,19
20	59,24	40,76
21	66,59	33,41
22	56,74	43,26
23	58,96	41,04
24	59,74	40,26
25	56,16	43,84
26	59,13	40,87
27	52,31	47,69
28	63,76	36,24
29	60,77	39,23
30	65,33	34,67

Tabela 9. Tamanho relativo (heterocromatina ou eucromatina X100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática do cromossomo Y de 30 Caucásides.

Indivíduo nº	Heterocromatina	Eucromatina
01	52,30	47,70
02	56,54	43,46
03	59,29	40,71
04	54,25	45,76
05	51,47	48,53
06	55,69	44,31
07	53,23	46,77
08	54,46	45,54
09	53,99	46,01
10	56,91	43,10
11	47,45	52,55
12	50,57	49,43
13	52,81	47,19
14	52,70	47,30
15	61,28	38,72
16	52,17	47,83
17	48,27	51,74
18	58,28	41,73
19	60,25	39,75
20	50,52	49,48
21	56,27	43,73
22	55,70	44,30
23	56,17	43,83
24	50,36	49,64
25	58,73	41,27
26	55,91	44,09
27	59,45	40,55
28	59,54	40,46
29	57,28	42,72
30	60,98	39,02

Tabela 10. Média dos tamanhos absoluto (A) e relativo (B = heterocromatina ou eucromatina X100/Y total) das regiões heterocromática e eucromática, e absoluto do cromossomo Y, de 30 Japoneses e 30 Caucásios.

		Japoneses	Caucásios
		$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
Heterocromatina	(A)	1,377±0,254	1,245±0,173*
	(B)	56,69 ±5,55	55,09 ±3,75
Eucromatina	(A)	1,036±0,121	1,009±0,105
	(B)	43,31 ±5,55	44,91 ±3,75
Y total	(A)	2,413±0,285	2,254±0,220*

\bar{X} = média; DP = desvio padrão.

* Significativo ao nível de 0,05.

Tabela 11. Tamanho da região heterocromática (μ) do cromossomo Y de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásides.

Família nº	Grupo racial	Região heterocromática		
		Pais	Filhos	Diferença (%)
01	C	0,990	0,970	2,0
02	J	1,013	1,075	5,8
03	C	1,067	1,120	4,7
04	C	1,032	1,241	16,8
05	J	1,221	1,344	9,2
06	C	1,088	1,219	10,7
07	C	1,124	0,938	16,5
08	C	1,032	1,262	18,2
09	C	1,108	1,051	5,1
10	C	1,353	1,375	1,6
11	C	1,167	1,096	6,1
12	C	1,331	1,460	8,8
13	C	1,167	1,130	3,2
14	J	1,399	1,349	3,6
15	J	1,324	1,353	2,1
16	J	1,368	1,273	6,9
17	C	1,246	1,073	13,9
18	C	1,400	1,197	14,5
19	C	1,491	1,698	12,2
20	J	1,303	1,328	1,9
21	J	1,435	1,390	3,1
22	C	1,517	1,595	4,9
23	J	1,708	1,365	20,1
24	J	1,461	1,482	1,4
25	J	1,526	1,533	0,5
26	J	1,552	1,433	7,7
27	J	1,583	1,446	8,7
28	J	1,735	1,906	9,0
29	J	1,746	1,699	2,7
30	J	1,884	1,946	3,2

J = Japonês; C = Caucáside.

apresentados na última coluna da Tabela 11. Verifica-se que tais diferenças variam de 0,5% (família 25) a 20% (família 23).

A Tabela 13 apresenta o tamanho da região eucromática dos pais e filhos. Os valores variam de 0,786 μ no pai da família 5 a 1,360 μ no filho da família 20, com uma diferença de 42%. As diferenças do tamanho desta região, entre os valores encontrados nos pais e filhos variam de 0,4% (família 14) a 17% (família 21). Os tamanhos do cromossomo Y dos 30 pares de pais-filhos estão apresentados na Tabela 15. Os mesmos variam de 1,893 μ no pai da família 1 a 3,016 μ no filho da família 28, com uma diferença de 37%. As diferenças dos valores encontrados nos pais e filhos variam de 0,3% (família 26) a 12% (família nº 5).

A análise da herdabilidade das regiões heterocromática, eucromática e do tamanho total do cromossomo Y estimada através do coeficiente de regressão, a partir dos dados das Tabelas 11, 13 e 15, feita em 30 famílias (15 Japonesas e 15 Caucásoides, cada uma constituída pelo pai e um filho) revelou, em cada um dos grupos raciais, e, no total da amostra, valores altos, principalmente, para a região heterocromática e para o cromossomo Y. Em todos os casos, o coeficiente de regressão foi estatisticamente significativo. O mesmo ocorreu com relação aos coeficientes de correlação (Tabelas 12, 14 e 16).

Isto demonstra, não só, que, os valores encontrados nos pais e filhos variam em conjunto (alta correlação) como também que, a maior parte da variação encontrada entre e dentro das 30 famílias analisadas, pode ser atribuída a diferenças genéticas (alta herdabilidade). Nas Tabelas 12, 14 e 16, observa-se também que as médias das diferenças intrapares não são estatisticamente diferentes de zero, para nenhuma das regiões analisadas, e nem para o tamanho total do cromossomo Y.

O diagrama de distribuição, e retas de regressão dos dados referentes às regiões heterocromática, eucromática e do cromossomo Y das 30 famílias analisadas (Tabelas 11, 13 e 15, respectivamente), estão apresentadas nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 12. Médias e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 11.

Famílias	N	Pais		Filhos		$\bar{d} \pm s(\bar{d})$	t	P	$b \pm s(b)$	t	P	r	t	P
		$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$											
Japonesas	15	1,484±0,228	1,461±0,231	0,022±0,032	0,688	>0,50	0,868±0,140	6,200	<0,001	0,856	11,558	<0,001		
Caucasóides	15	1,208±0,172	1,228±0,220	-0,021±0,037	-0,568	>0,50	0,966±0,234	4,128	<0,01	0,755	4,149	<0,01		
Total	30	1,346±0,243	1,345±0,252	0,0006±0,024	0,025	>0,90	0,884±0,105	8,419	<0,001	0,855	8,700	<0,001		

N = número de pares pais-filhos; \bar{X} = média; DP = desvio padrão; \bar{d} = média da diferença; $s(\bar{d})$ = erro da média.

Tabela 13. Tamanho da região eucromática (μ) do cromossomo Y de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásides.

Família	Grupo racial	Região eucromática		
		Pais	Filhos	Diferença (%)
01	C	0,903	0,950	4,9
02	J	0,936	1,040	10,0
03	C	0,900	0,948	5,1
04	C	0,973	1,020	4,6
05	J	0,786	0,927	15,2
06	C	0,956	0,993	3,7
07	C	0,940	0,959	2,0
08	C	1,143	1,019	10,8
09	C	1,083	1,072	1,0
10	C	0,855	0,925	7,6
11	C	1,070	1,156	7,4
12	C	0,953	1,010	5,6
13	C	1,143	1,119	2,1
14	J	0,941	0,945	0,4
15	J	1,083	1,167	7,2
16	J	1,071	0,965	9,9
17	C	1,228	1,119	8,9
18	C	1,104	1,073	2,8
19	C	1,017	1,056	3,7
20	J	1,215	1,360	10,6
21	J	1,091	0,903	17,2
22	C	1,031	1,007	2,3
23	J	0,857	0,950	9,8
24	J	1,114	1,153	3,4
25	J	1,062	1,181	10,1
26	J	1,046	1,158	9,7
27	J	1,094	1,048	4,2
28	J	0,986	1,110	11,2
29	J	1,127	1,007	10,6
30	J	1,000	1,034	3,3

J = Japônês; C = Caucáside.

Tabela 14. Média e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 13.

Famílias	N	Pais	Filhos	$\bar{d} \pm s(\bar{d})$	t	P	$b \pm s(b)$	t	P	r	t	P
		$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$									
Japonesas	15	1,027±0,111	1,063±0,125	-0,036±0,027	-1,333	>0,40	0,677±0,238	2,845	<0,02	0,605	2,740	<0,02
Caucasóides	15	1,020±0,107	1,028±0,069	-0,008±0,016	-0,500	>0,80	0,543 0,088	6,170	<0,001	0,834	5,457	<0,001
Total	30	1,024±0,107	1,046±0,101	-0,022±0,016	-1,375	>0,30	0,618±0,210	2,943	<0,01	0,658	4,624	<0,001

N = Número de pares pais-filhos; \bar{X} = média; DP = desvio padrão; \bar{d} = média da diferença; $s(\bar{d})$ = erro da média

Tabela 15. Tamanho total do cromossomo Y (μ) de 30 pares de pais-filhos Japoneses e Caucásios.

Família	Grupo racial	Y total		
		Pais	Filhos	Diferença (%)
01	C	1,893	1,920	1,4
02	J	1,949	2,115	7,8
03	C	1,967	2,068	4,9
04	C	2,005	2,261	11,3
05	J	2,007	2,271	11,6
06	C	2,044	2,212	7,6
07	C	2,064	1,897	8,1
08	C	2,175	2,281	4,6
09	C	2,191	2,123	3,1
10	C	2,208	2,300	4,0
11	C	2,237	2,252	0,7
12	C	2,284	2,470	7,5
13	C	2,310	2,249	2,6
14	J	2,340	2,294	4,6
15	J	2,407	2,520	4,5
16	J	2,439	2,238	8,2
17	C	2,474	2,192	11,4
18	C	2,504	2,270	9,3
19	C	2,508	2,754	8,9
20	J	2,518	2,688	6,3
21	J	2,526	2,293	9,2
22	C	2,548	2,602	2,1
23	J	2,565	2,315	9,7
24	J	2,575	2,635	2,3
25	J	2,588	2,714	4,6
26	J	2,598	2,591	0,3
27	J	2,677	2,494	6,8
28	J	2,721	3,016	9,8
29	J	2,873	2,706	5,8
30	J	2,884	2,980	3,2

J = Japoneses; C = Caucásio.

Tabela 16. Média e valores dos coeficientes de regressão (b) e correlação (r) dos dados da Tabela 15.

Famílias	N	Pais		Filhos		$\bar{d} \pm s(\bar{d})$	t	P	b \pm s(b)	t	P	r	t	P
		$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$											
Japonesas	15	2,511 \pm 0,264	2,525 \pm 0,271	-0,013 \pm 0,047	-0,276	>0,80	0,783 \pm 0,186	4,210	<0,001	0,764	4,271	<0,001		
Caucasóides	15	2,227 \pm 0,211	2,257 \pm 0,226	-0,029 \pm 0,043	-0,674	>0,60	0,770 \pm 0,204	3,775	<0,01	0,718	3,720	<0,01		
Total	30	2,369 \pm 0,276	2,391 \pm 0,281	-0,021 \pm 0,031	-0,677	>0,60	0,824 \pm 0,116	7,103	<0,001	0,810	7,302	<0,001		

N = número de pares pais-filhos; \bar{X} = média; DP = desvio padrão; \bar{d} = média da diferença; s(\bar{d}) = erro da média.

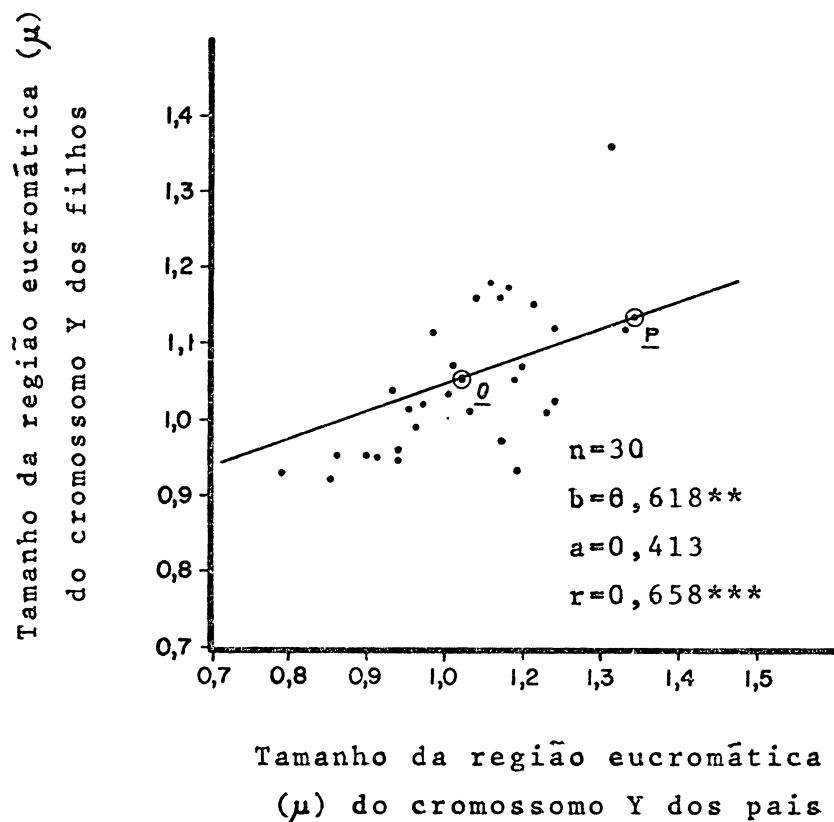


Figura 10. Diagrama de distribuição dos dados da Tabela 13 e reta de regressão obtida a partir dos pontos O ($\bar{X} = 1,025$; $\bar{Y} = 1,046$) e P ($X = 1,240$; $Y = 1,130$).

******, ******* Significativo ao nível de 0,01 e 0,001, respectivamente.

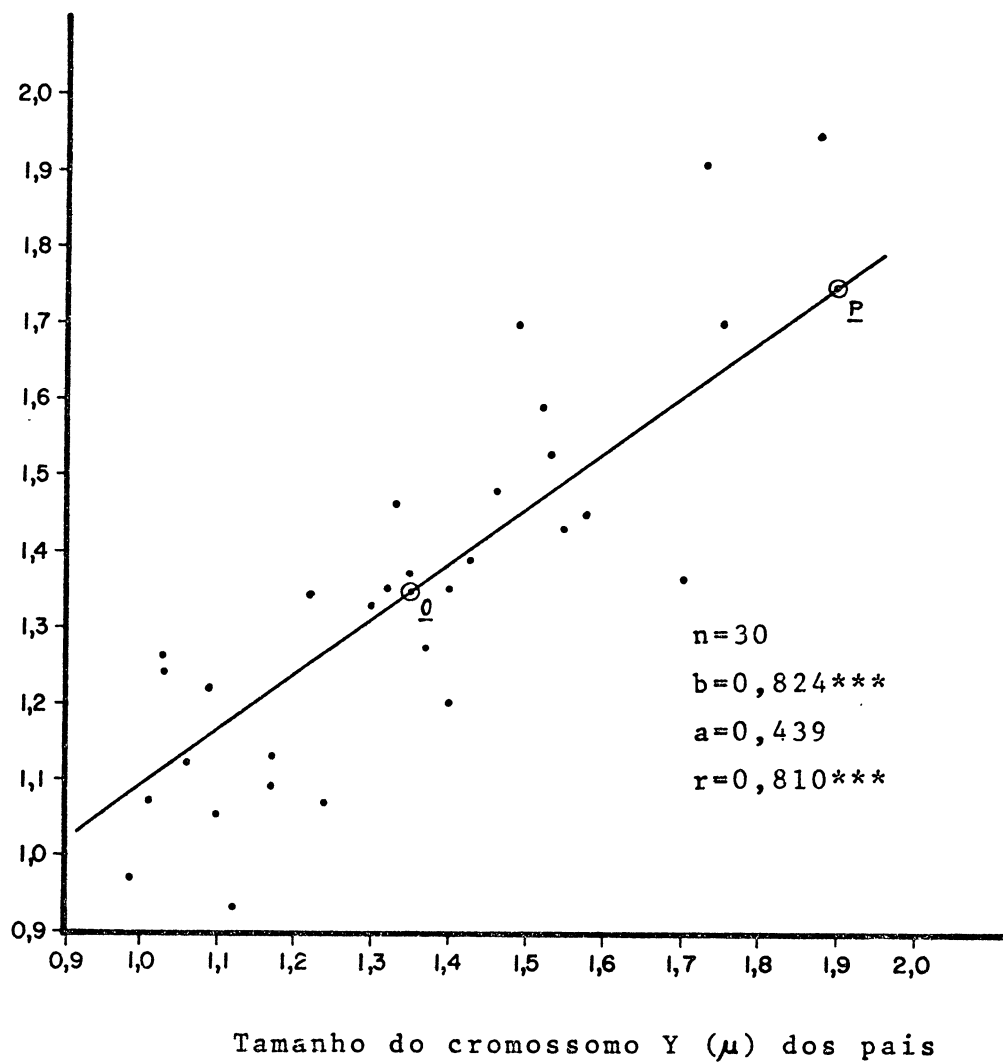


Figura 11. Diagrama de distribuição dos dados da Tabela 15 e reta de regressão obtida a partir dos pontos O ($\bar{X} = 2,369$; $\bar{Y} = 2,391$) e P ($X = 2,900$; $Y = 2,698$).

*** Significativo ao nível de 0,001.

IV - DISCUSSÃO

As diferenças do estágio de contração dos cromossomos metafásicos, sempre se constituíram num importante obstáculo para a perfeita avaliação da variabilidade do cromossomo Y humano, mesmo após a utilização dos métodos de bandeamento. JALAL e cols. (1974), admitindo que somente a região heterocromática é variável, atribuíram à contração diferencial às alterações do tamanho da região eucromática, descritas por outros autores.

ERDTMANN (1979), enfatizou a necessidade de se anular, ou pelo menos, minimizar os efeitos desta variável, sem o que, se torna impossível a obtenção de informações mais conclusivas.

Neste trabalho, foi empregado o método de correção para o estágio de contração cromossômica, desenvolvido por ERDTMANN e cols. (1978). Os resultados obtidos substanciam os achados de outros autores (SCHNEDL, 1971; SOUDEK e cols., 1973; BRÖGGER e cols., 1977; VERMA e cols., 1978; BELTRAN e cols., 1979), confirmando que, a variabilidade do tamanho do cromossomo Y humano, é devida, tanto às variações da região heterocromática, como da eucromática, sendo, no entanto, menor a contribuição desta última região.

De acordo com a natureza heterocromática da região distal do braço longo do cromossomo Y humano, tem sido, nesta região, demonstrada a presença de ADN satélite, altamente repetitivo. Frações dos quatro tipos de ADNs satélite melhor caracterizados, denominados de I, II, III e IV (CORNEO e cols., 1967, 1970, 1971 e 1972), estão localizados neste cromossomo (EVANS e cols., 1974; GOSDEN e cols., 1975).

A partir de 1976, outros ADNs repetitivos foram localizados no cromossomo Y humano. KUNKEL e cols. (1976), através de métodos de hibridização, identificaram seqüências de ADN moderada-

mente repetitivo, específico do cromossomo Y, e COOKE (1976), utilizando enzimas de restrição purificou frações de ADN de rápida reassociação, fundamentalmente encontradas no cromossomo Y. Este ADN de rápida reassociação, apresenta dois tipos de seqüências distintas. Uma delas, com 3.400 nucleotídeos (3,4 kb), apresenta uma grande heterogeneidade intra e intermolecular (KUNKEL e cols., 1979), e a outra, é constituída por 2.100 nucleotídeos (2,1 kb).

KUNKEL e cols. (1977), admitindo que as seqüências moderadamente repetitivas representam 10% do total do ADN do cromossomo Y, demonstraram que as mesmas localizam-se, principalmente, na região heterocromática, estando ausentes no braço curto e na região centromérica. McKAY e cols. (1978), analisando cromossomos Y de diferentes tamanhos, demonstraram que a fração de rápida reassociação, com 3,4 kb, está localizada de forma mais ou menos dispersa na região heterocromática. A possibilidade da referida fração localizar-se também na região eucromática do braço longo, foi sugerida por SCHMIDTKE & SCHMID (1980). Estes autores mostraram que a fração de rápida reassociação com 2,1 kb, localiza-se preferencialmente na região distal da heterocromatina. BOSTOCK e cols. (1978), analisando o ADN satélite III (CORNEO e cols., 1971), identificaram, nesta fração, a seqüência repetitiva de ADN-Y com 3.500 nucleotídeos (3,5 kb), localizada nas regiões heterocromática proximal, e eucromática distal do braço longo.

O envolvimento de frações de ADN-Y na variabilidade do tamanho do cromossomo Y, tornou-se fortemente sugestivo com os resultados do trabalho de McKAY e cols. (1978), quando foi demonstrado que, a quantidade da fração com 3,4 kb, está positivamente correlacionada com o aumento do tamanho do cromossomo Y. Estes achados vieram substanciar a hipótese de GERAEDS e cols. (1975), que admitem que cromossomos Y de diferentes tamanhos, apresentam diferentes quantidades de ADN.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar as alterações da quantidade de ADN repetitivo e do comprimento do cromossomo Y. A possibilidade de que permutas desiguais se constituam num mecanismo responsável pela evolução dos ADNs repetitivos, foi extensivamente discutida por SMITH (1976). No entanto, o fato de determinadas seqüências de ADN variarem em quantidade, sem alteração da própria seqüência, sugere que o processo evolutivo do ADN repetitivo não seria contínuo (McKAY e cols., 1978).

COOKE & McKAY (1978) e BOSTOCK (1978), apresentaram evi-

dências de que determinadas seqüências de ADNs repetitivos, apresentam homologia com seqüências achadas nos autossomos, o que reforça a antiga hipótese da ocorrência de translocações do material heterocromático do cromossomo Y para autossomos (COHEN e cols., 1966; NOEL e cols., 1971), a qual se tornava difícil de ser comprovada, sem o emprego das técnicas de bandeamento. COOKE & NOEL (1979), utilizando técnicas de identificação dos ADNs-Y e métodos de bandeamento, analisaram os cromossomos de quatro indivíduos com variantes Dp+. Demonstraram que o material em excesso, presente nos cromossomos do referido grupo, resultava de translocações da região heterocromática do cromossomo Y. Se os fragmentos translocados se constituem em unidades distintas, não se sabe. A identificação de bandas menores, nas regiões Yq1 e Yq2 (KNUNTILA & GRIPENBERG, 1972; JALAL e cols., 1974 e DRETS e cols., 1974), permite que se especule sobre a possibilidade destas bandas menores se constituírem na unidade de translocação (McKAY e cols., 1978).

É possível que outras regiões heterocromáticas polimórficas, do cariótipo humano, sejam devidas a alterações da quantidade de ADNs repetitivos, e mesmo, que as variações encontradas no tamanho das regiões heterocromáticas do cromossomo Y e dos autossomos, não sejam independentes. Como já foi referido, COOKE & McKAY (1978), propuseram que todas as seqüências localizadas na fração de ADN-Y de rápida reassociação, com 3,4 kb, tem alguma homologia com seqüências localizadas em outros cromossomos. Estes autores e BOSTOCK (1978), sugerem que somente os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição é que seriam verdadeiramente específicos do cromossomo Y.

SZABO e cols. (1979), descreveram a presença de seqüências de ADN-Y não específicos e localizados nos fragmentos com 3,4 kb, na região centromérica dos cromossomos 1, 9, 16 e dos grupos D e G. As seqüências localizadas nos cromossomos dos grupos D e G são distinguíveis das encontradas nos cromossomos 1, 9 e 16, pela estabilidade termal. Estes achados sugerem que seqüências de ADN-Y não específicos e localizados no fragmento com 3,4 kb do cromossomo Y, apresentam homologia com pelo menos duas classes de seqüências de ADNs altamente repetitivos localizados nos autossomos.

CAVALLI e cols. (1981b), analisando quantitativamente as bandas-C dos cromossomos 1, 9, 16 e Y de 27 Caucásios e 27 Japoneses, demonstraram que os Japoneses, tendo em média, a banda-C

do cromossomo Y maior do que os Caucasóides, apresentam, em média, uma menor quantidade de heterocromatina no total dos três pares autossômicos. A quantidade total de heterocromatina constitutiva ($\Sigma H1+9+16+Y$), não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos raciais. Este conjunto de informações não pode ser considerado como resultante de eventos acidentais; ao contrário, sugere a existência de um poderoso controle na natureza e distribuição do ADN repetitivo do genoma humano.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a região eucromática do cromossomo Y, também contribui para a variação do tamanho do referido cromossomo. SCHNEDL (1971), identificando três regiões distintas no cromossomo Y humano: 1) braço curto, 2) região fracamente fluorescente na região proximal do braço longo e 3) região intensamente fluorescente na região distal do braço longo, demonstrou que, a maior parte da variabilidade do tamanho deste cromossomo era devida às variações da região heterocromática, mas que, a região proximal do braço longo, também contribuía para a referida variabilidade, enquanto que o braço curto era invariável. Considerando como provável a localização da fração de ADN-Y com 3,4 kb, como também da fração descrita por BOSTOCK e cols. (1978), com 3,5 kb, na região eucromática distal do braço longo do cromossomo Y (SCHMIDTKE & SCHMID, 1980), as variações da região eucromática podem ser devidas às diferenças do conteúdo de ADN repetitivo nesta região, como foi descrito por MCKAY e cols. (1978), com referência à região heterocromática.

Nas regiões eucromáticas, sem efetivas vantagens seletivas em termos de estabilidade, não estariam localizados importantes fatores genéticos como o(s) determinante(s) do sexo masculino (BÜHLER, 1980; FAGGIANO e cols., 1980; DAVIS, 1981). Apesar disso, a variabilidade da região eucromática, implica numa análise mais rigorosa das implicações clínicas, ou outras que dela possam resultar, e que tem sido descritas como associadas ao aumento do tamanho do cromossomo Y, como por exemplo a associação entre o referido aumento de tamanho e morte fetal, descrita por PATIL & LUBS (1977). BILLERBECK e cols. (1981), estudando o tamanho do cromossomo Y de 80 indivíduos Caucasóides normais, descreveram que os resultados encontrados, sugerem que os indivíduos com cromossomo Y aumentado, apresentam um aumento na estatura e envergadura, uma diminuição na contagem de cristas digitais, com aumento na contagem total de cristas entre os trirrádios digitais a e b, e uma diminuição do ângulo atd.

A diferença estatisticamente significativa encontrada entre o tamanho médio do cromossomo Y de Japoneses e Caucásios, confirma os resultados descritos por outros autores (COHEN e cols., 1966; RIBEIRO, 1977 e RIBEIRO e cols., 1981; MONSALVE e cols., 1980), mas, demonstra que, a referida diferença é devida somente à região heterocromática. Em ambos os grupos raciais, esta região representa cerca de 55% do tamanho total do cromossomo Y. Este resultado, no que se refere à amostra Japonesa, está em desacordo com o descrito por EVANS (1977), que afirma que as bandas-C correspondem à cerca de 70% do comprimento total do cromossomo Y em amostras de populações cujos indivíduos se caracterizam por possuírem um cromossomo Y longo.

Os coeficientes de correlação e regressão para as comparações pai-filho, relativas aos tamanhos das regiões heterocromática, eucromática e do Y total, demonstram não só os valores encontrados nos pais e filhos variam em conjunto (alta correlação), mas também, que a maior parte da variação total observada entre ou nas famílias, pode ser atribuída à diferenças genéticas (alta herdabilidade). Outros autores já haviam demonstrado alta herdabilidade de variantes do cromossomo Y, ou da região heterocromática deste cromossomo (McKENZIE e cols., 1972; BELTRAN e cols., 1979; CAVALLI e cols., 1981b). As únicas informações referentes à herdabilidade das variações da região eucromática, fornecidas por BELTRAN e cols. (1979), não foram conclusivas. Estes autores, analisando 27 pares de pais-filhos normais e 18 pares nos quais os filhos apresentavam malformações congênitas, encontraram uma correlação positiva estatisticamente significativa, na variação da região eucromática entre pais e filhos, somente na amostra constituída pelos pares normais, não ocorrendo o mesmo na segunda amostra, e, nem quando ambas foram consideradas em conjunto.

Finalmente, é importante ressaltar a eficiência do método de correção do estágio de contração dos cromossomos metafásicos, introduzido por ERDTMANN e cols. (1978). Os coeficientes de correlação e de regressão, calculados entre os valores não corrigidos, do comprimento total do cromossomo Y das 30 famílias analisadas, foram 0,58 e 0,65, respectivamente. Com o emprego do método de correção acima referido, os mesmos coeficientes atingiram, respectivamente, 0,82 e 0,81.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Considerando que o cromossomo Y se constitui num excelente material para o estudo do polimorfismo cromossômico no homem, verificamos se as variações nele observadas, são devidas, somente às variações da região heterocromática, ou, se a região eucromática (definida como toda região do cromossomo Y, que não a banda-C terminal) também contribui para que as mesmas ocorram. Estimou-se a herdabilidade através do coeficiente de regressão, das variações do tamanho de ambas as regiões, e do Y total em 30 famílias (15 Japonesas e 15 Caucásoides, cada uma constituída pelo pai e um filho).

A amostra foi constituída por 30 Japoneses e 30 Caucásoides da população de Curitiba. De 15 indivíduos de cada um dos grupos raciais, foi coletado o material de um filho para análise da herdabilidade.

Culturas temporárias de leucócitos de sangue periférico foram feitas segundo o método convencional, e, as bandas-C, analisadas quantitativamente, foram obtidas de acordo com o método de SUMNER (1972). Empregou-se o método desenvolvido por ERDTMANN e cols. (1978), para a correção do estágio de contração dos cromossomos metafásicos.

Os principais resultados e conclusões foram os seguintes:

- 1- Os coeficientes de correlação (r), calculados entre os valores das regiões heterocromática, eucromática e os do Y total, e, entre os de ambas as regiões, foram: 0,91, 0,54 e 0,13 respectivamente. Os dois primeiros significativos a nível de 0,001. Isto demonstra que, as alterações do tamanho do cromossomo Y são devidas tanto às variações da região heterocromática, como da eucromática, sendo menor a contribuição desta última região.

Os tamanhos das regiões heterocromática e eucromática variam independentemente.

- 2- A análise da herdabilidade indicou os seguintes valores: heterocromatina = 0,88; eucromatina = 0,62 e Y total = 0,82 (significativos a nível de 0,001). Da mesma forma, os coeficientes de correlação (r) foram, respectivamente, os seguintes: 0,86; 0,66 e 0,81 (significativos ao nível de 0,001).

Portanto, os valores encontrados nos pais e filhos não só variam em conjunto (alta correlação), como também a maior parte da variação encontrada entre ou nas famílias pode ser atribuída a diferenças genéticas (alta herdabilidade).

- 3- O tamanho absoluto das regiões heterocromática, eucromática e do Y total de Japoneses e Caucasoídes, foram os seguintes: Heterocromatina: Japoneses, $\bar{X} = 1,377 \pm 0,254$; Caucasoídes, $\bar{X} = 1,245 \pm 0,173$. $t = 2,357$, $P < 0,05$; Eucromatina: Japoneses, $\bar{X} = 1,036 \pm 0,121$; Caucasoídes, $\bar{X} = 1,009 \pm 0,105$. $t = 0,931$, $P > 0,05$. Estes resultados permitem concluir que, a diferença entre o tamanho médio do cromossomo Y de Japoneses e Caucasoídes, é devida, somente, às diferenças da região heterocromática.

- 4- Em ambos os grupos raciais, a região heterocromática representa, em média, cerca de 55% do tamanho do cromossomo Y.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10:81-86.
- ARRIGHI, F.E. & SAUNDERS, G.E. (1973). The relationship between repetitious DNA and constitutive heterochromatin with special reference to man. In: PFEIFFER, R.A. (ed.). *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man*. Stuttgart-New York, Schattauer Verlag. pp. 113-133.
- AULA, P. & SAKSELA, E. (1972). Banding characteristics of paracentric marker constrictions in human chromosomes. *Hereditas*, 70:309-310.
- BALÍCEK, P., ZIZKA, J. e SKALSKÁ, H. (1978). Variability and familial transmission of heterochromatin of human chromosomes evaluated by the method of linear measurement. *Hum. Genet.*, 42:257-265.
- BARR, M.L. & BERTRAN, E.G. (1949). A morphological distinction between neurones of male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nuclear protein synthesis. *Nature*, 163:676-677.
- BEIGUELMAN, B. (1977). *Genética Médica*, vol. 2. Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações. São Paulo, Edart e EDUSP. 390 pp.
- BELTRAN, I.C., ROBERTSON, F.W. e PAGE, M.B. (1979). Human Y chromosome variation in normal and abnormal babies and their fathers. *Ann. Hum. Genet.*, 42:315-325.
- BILLERBECK, A.E.C., WAJNTAL, A. e SALDANHA, P.H. (1981). Variabilidade do cromossomo Y a algumas características fenotípicas. *Ciênc. Cult.*, 33(supl.):637.
- BISHOP, A., BLANK, C.E. e HUNTER, H. (1962). Heritable variation in length of the Y chromosome. *Lancet*, ii:18-20.

- BOBROW, M., PEARSON, P.L., PIKE, M.C. e EL-ALFI, O.S. (1971). Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenetics*, 10:190-198.
- BORGAONKAR, D. & HOLLANDER, D.H. (1971). Quinacrine fluorescence of the human Y chromosome. *Nature*, 230:52.
- BOSTOCK, C.J. & SUMNER, A.T. (1978). *The Eukaryotic Chromosome*. Elsevier, North-Holland. 523 pp.
- BOSTOCK, C.J., GOSDEN, J.R. e MITCHELL, A.R. (1978). Localization of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. *Nature*, 272:324-328.
- BOUÉ, J., TAILLEMITE, J.L., HAZAEL-MASSIEUX, P., LÉONARD, C. e BOUÉ, A. (1975). Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. *Humangenetik*, 30:217-224.
- BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. (1979). Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences. *Science*, 204:1052-1059.
- BRÖGGER, A., URDAL, T., LARSEN, F.B. e LAVIK, N.J. (1977). No evidence for a correlation between behaviour and the size of the Y chromosome. *Clin. Genet.*, 11:349-358.
- BROWN, S.W. (1966). Heterochromatin. *Science*, 151:417-425.
- BROWN, W.V. (1972). *Textbook of Cytogenetics*. Saint Louis, C.V. Mosby. 346 pp.
- BUCKTON, K.E., O'RIORDAN, M.L., JACOBS, P.A., ROBINSON, J.A., HILL, R. e EVANS, H.J. (1976). C- and Q- band polymorphisms in the chromosomes of three human populations. *Ann. Hum. Genet.*, 40:99-112.
- BÜHLER, E.M. (1980). A synopsis of the human Y chromosome. *Hum. Genet.*, 55:145-175.
- CASPERSON, T., FARBER, S., FOLEY, G.E., KUDYNOWSKI, J., MODEST, E.J., SIMONSSON, E., WAGH, V. e ZECH, L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosome. *Exptl. Cell Res.*, 49:219-222.
- CASPERSON, T., ZECH, L., MODEST, E.J., FOLEY, G.E., WAGH, V. e SIMONSSON, E. (1969a). Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 58:128-140.
- CASPERSON, T., ZECH, L., MODEST, E.J., FOLEY, G.E., WAGH, V. e SIMONSSON, E. (1969b). DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exptl. Cell Res.*, 58:141-152.

- CASPERSON, T., ZECH, L. e JOHANSSON, C. (1970a). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 60:315-319.
- CASPERSON, T., ZECH, L., JOHANSSON, C., LINDSTEN, J. e HULTEN, M. (1970b). Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in huamn interphase nuclei. *Exptl. Cell Res.*, 61:472-474.
- CASPERSON, T., ZECH, L. e JOHANSSON, C. (1970c). Quinacrine mustard fluorescence of human chromosome 4, 5 and X. *Exptl. Cell Res.*, 61:474-475.
- CASPERSON, T., ZECH, L. e JOHANSSON, C. (1970d). Analysis of the human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exptl. Cell Res.*, 62:490-492.
- CASPERSON, T., ZECH, L., JOHANSSON, C. e MODEST, E.J. (1970e). Identification of human chromosome by DNA reating fluorescent agents. *Chromosoma*, 30:215-227.
- CAVALLI, I. J. (1981). Comunicação pessoal.
- CAVALLI, I. J., MATTEVI, M. S., SBALQUEIRO, I. J. e MAIA, N. A. (1981a). Análise quantitativa das bandas-C de Caucasóides e Japoneses. *Ciêñ. Cult.*, 33(supl.):665.
- CAVALLI, I. J., MATTEVI, M. S., ERDTMANN, E., SBALQUEIRO, I. J. e MAIA, N. A. (1981b). Quantitative analysis of C bands in chromosomes 1, 9, 16 and Y in Caucasian and Japanese males. (Em redação).
- CHAPELLE, A. DE LA, HORTLING, H., EDGREN, J. e RIAINEN, R.K. (1963). Evidence for existence of heritable large Y chromosome unassociated with developmental disorder. A cytogenetical and clinical study of 4 males with hipogonadism, one mongolism and their relatives. *Hereditas*, 50:351-360.
- CHAPELLE, A. DE LA, FELLMAN, J. e UNNERUS, V. (1967). Determination of the human paternity from the lenght of the Y chromosome. *Ann. Génét.*, 10:60-64.
- CHAPELLE, A. DE LA, SCHROEDER, J., STENSTRAND, K., FELLMAN, J., HERVA, R., SAANI, M., ANTTOLAINEN, P.J.L., TALLILA, I., TERVILA, L., HUSA, L., TALLQVIST, G., ROBSON, E.B., COOK, P.J. L. e SANGER, R. (1974). Pericentric inversions of human
- CHUANG, C.R. & SAUNDERS, G.F. (1974). Complexity of human satellite-A DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57:1221-1230.

- COHEN, M.M., SHAW, M.W. e MacCLUER, J.W. (1966). Racial differences in the length of the human Y chromosome. *Cytogenetics*, 5:34-52.
- CONFERÊNCIA DE DENVER (1960). Denver Conference: A proposed standart system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet*, i:1063-1065.
- CONFERÊNCIA DE PARIS (1971). Paris Conference: A standartization in human cytogenetics. *Birth Defects: Orig. Art. Ser.*, VIII (7).
- CONFERÊNCIA DE PARIS (1971), Suplemento (1975). Paris Conference Supplement: Standartization in human cytogenetics. *Birth Defects: Orig. Art. Ser.*, XI(9).
- COOKE, H.J. (1976). Repeated sequence specific to human males. *Nature*, 262:182-186.
- COOKE, H.J. (1978). Evolution of a human Y chromosome - specific repeated sequence. *Cell*, 13:453-460.
- COOKE, H.H. e NOEL, B. (1979). Confirmation of Y/autosome translocations using recombinant DNA. *Hum. Genet.*, 50:45-49.
- CORNEO, G., GINELLI, E. e POLLI, E. (1967). A satellite DNA isolated from human tissues. *J. Molec. Biol.*, 23:619-622.
- CORNEO, G., GINELLI, E. e POLLI, E. (1970). Repeated sequences in human DNA. *J. Molec. Biol.*, 48:319-327.
- CORNEO, G., GINELLI, E. e POLLI, E. (1971). Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNAs. *Bioch. Bioph. Acta*, 247:528-534.
- CORNEO, G., ZARDI, L. e POLLI, E. (1972). Elution of human satellite DNAs on a methylated albumin kieselguh chromatographic column: Isolation of satellite DNA IV. *Bioch. Bioph. Acta*, 269:201-204.
- COURT-BROWN, W.M. (1967). *Human Population Cytogenetics*. Amsterdam, North Holland.
- CRAIG-HOLMES, A.P. (1977). C-band polymorphism in human populations. In: HOOK, E.B. & PORTER, I.H. (ed.). *Population Cytogenetic Studies in Humans*. New York, San Francisco, London, Academic Press. pp. 161-177.
- CRAIG-HOLMES, A.P. & SHAW, M.W. (1971). Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science*, 174:702-704.
- CRAIG-HOLMES, A.P., MOORE, F.B. e SHAW, M.W. (1973). Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *Am. J. Hum. Genet.*, 25:181-192.

- CRAIG-HOLMES, A.P., MOORE, F.B. e SHAW, M.W. (1975). Polymorphism of human C-band heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence of somatic crossing over. *Am. J. Hum. Genet.*, 27:178-189.
- DAVIDSON, E.H. & BRITTEN, R.J. (1979). Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences. *Science*, 204:1052-1059.
- DAVIS, R.M. (1981). Localisation of male determining factors in man: A through review of structural anomalies of the Y chromosome. *J. Med. Genet.*, 18:161-195.
- DRETS, M.E. & SHAW, M.W. (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:2073-2077.
- DUTRILLAUX, B. & LEJEUNE, J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci.*, 272:2638-2640.
- DUTRILLAUX, B., LAURENT, C., COUTURIER, J. e LEJEUNE, J. (1973). Coloration des chromosomes humains par l'acridine orange après traitement par le 5 bromodeoxyuridine. *C.R. Acad. Sci.*, 276:3179-
- ERDTMANN, B. (1979). *Análise Quantitativa das Bandas-C dos Cromossomos A.1, C.9, E.16 e Y em Indígenas e Brancos Brasileiros*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 153 pp.
- ERDTMANN, B., SALZANO, F.M., MATTEVI, M.S. e FLECK, R.D. (1978). Método de classificação das bandas-C em cromossomos humanos. *Ciênc. Cult.*, 30(eupl.):552-553.
- ERDTMANN, B., SALZANO, F.M., MATTEVI, M.S. e FLORES, R.Z. (1981). Quantitative analysis of C bands in chromosomes 1, 9 and 16 of Brazilian Indians and Caucasoids. *Hum. Genet.*, 57:58-63.
- EVANS, H.J. (1977). Some facts and fancies relating to chromosome structure in man. *Adv. Hum. Genet.*, 8:346-438.
- EVANS, H.J., GOSDEN, J.R., MITCHELLE, A.R. e BUCKLAND, R.A. (1974). Location of human satellite DNAs on the Y chromosome. *Nature*, 251:346-347.
- FAGGIANO, M., FERRARO, M., CRISCUOLO, T., SINISI, A.A. e CAPOA, A. DE (1980). Cytological evidence for the location of male-determining and H-Y genes on the short arm of Y chromosome. *Hum. Genet.*, 54:323-326.
- FROTA-PESSOA, O. & ARANTANGY, L.R. (1968). The degeneration of the Y chromosome. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.*, 1:241-244.

- GAGNÉ, R. & LABERGE, C. (1972). Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. *Exptl. Cell Res.*, 73:239-242.
- GERAEDRS, J.P.M., PEARSON, P.L., PLOEG, M. VAN DER e VOSSEPOEL, A.M. (1975). Polymorphisms for human chromosomes 1 and Y. *Exptl. Cell Res.*, 95:9-14.
- GHOSH, P.K. & SINGH, I.P. (1975). Morphological variability of the human chromosomes in two Indian populations - Rajputs and Punjabis. *Humangenetik*, 29:67-78.
- GHOSH, P.K. & SINGH, I.P. (1976). Morphological variability of human chromosomes: Polymorphism of constitutive heterochromatin. *Hum. Genet.*, 32:149-154.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalia chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53:37-50.
- GOSDEN, J.R., MITCHELL, A.R., BUCKLAND, R.A., CLAYTON, R.P. e EVANS, H.J. (1975). The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 92:148-158.
- GROUCHY, J. DE (1977). Annulation de reconnaissance de paternité fondée sur la non identité des chromosomes Y. Un jugement du Tribunal de Paris. *Ann. Génét.*, 20:133-135.
- HOWARD, P.N., STODDARD, G.R. e SELLY, J.R. (1973). Giemsa banding of a human metacentric chromosome number 9. *Humangenetik*, 18:271-272.
- HOWELL, W.M., DENTON, T.E. e DIAMOND, J.R. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*, 31:260-262.
- HUNGERFORD, D.A. (1971). Chromosome structure and function in man. I. Pachytene mapping in the male, improved methods and general discussion of initial results. *Cytogenetics*, 10:23-
- HUNGERFORD, D.A., ASHTON, F.T., BALABAN, G.B., LA BADIÉ, G.V., MESSATZZIA, L., HALLER, G. e MILLER, A.E. (1972). The C-group pachytene bivalent with a locus characteristic for parachromsomally situated particulate bodies: A provisional map in human males. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69:2165-2168.
- JALAL, S.M., PFEIFFER, R.A., PATHAK, S. e HSU, T.C. (1974). Subdivision of the human Y chromosome. *Humangenetik*, 24:59-65.
- KABECK, M.M., SAKSELA, E. e MOEHAN, W.J. (1964). The effect of 5-bromodeoxyuridine of human chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 34:182-186.

- KATO, H. & YOSIDA, T.H. (1972). Banding pattern of Chinese hamster chromosomes revealed by new techniques. *Chromosoma*, 36:272-280.
- KIM, My.A. (1973). Polimorphisms des konstitutiven heterochromatin by menschlichen A 1-metaphasechromosomen. *Humangenetik*, 18: 213-217.
- KNUNTIILA, S. & GRIPPENBERG, V. (1972). The fluorescence pattern of a human Yq⁺ chromosome. *Hereditas*, 70:307-308.
- KUNKEL, L.M., SMITH, K.D. e BOYER, S.H. (1976). Human Y-chromosome-specific reiterated DNA. *Science*, 191:1189.
- KUNKEL, L.M., SMITH, K.D., BOYER, S.H., BORGAONKAR, D.S., WACHTEL, S.S., MILLER, O.J., BREG, W.R., JONES, H.W. e RARY, J.M. (1977). Analysis of human Y chromosome specific DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:1245-1249.
- KUNKEL, L.M., SMITH, K.D. e BOYER, S.H. (1979). Organization and heterogeneity of sequences within a repeating unit of human Y chromosome deoxyribonucleid acid. *Biochemistry*, 18: 3343-3353.
- LABERGE, C. & GAGNÉ, R. (1971). Quinacrine mustard staining solves the lenght variations of the human Y chromosome. *Johns Hopk. Med. J.*, 128:79-83.
- LUBS, H.A. & RUDLE, F.H. (1970). Application of quantitative karyotyping to chromosome variation in 4,400 consecutive newborns. In: JACOBS, P., PRINCE, W.H. e LAW, P., *Human Population Cytogenetics*. Baltimore, Williams and Wilkins. Pp. 119-142.
- LUBS, H.A., PATIL, S.A., KIMBERLING, W.J., BROWN, J., COHEN, M., GERALD, P., HECHT, F., MYRIANTHOPOULOS, N. e SUMMITT, R.L. (1977a). Q and C banding polymorphisms in 7 and 8 year old children: Racial differences and clinical significance. In: HOOK, E.B. & PORTER, I.H. (ed.). *Population Cytogenetics Studies in Human*. New York, San Francisco, London, Academic Press. pp. 133-159.
- LUBS, H.A., KIMBERLING, W.J., HECHT, F., PATIL, S.R., BROWN, J., GERALD, P. e SUMMITT, R.L. (1977b). Racial differences in the frequency of Q and C chromosomal heteromorphisms. *Nature*, 268:631-633.
- LYON, M.F. (1968). Chromosomal and subchromosomal inactivation. *Ann. Rev. Genet.*, 2:31-52.

- MACAYA, G., THIERY, J.P. e BERNARDI, G. (1977). DNA sequence in man. In: YUNIS, J.J. *Molecular Structure of Human Chromosomes*. New York, Academic Press. Pp. 35-58.
- MAKINO, S., SASAKI, M.S., YAMADA, K. e KAJII, T. (1963). A long Y chromosome in man. *Chromosoma*, 14:154-161.
- MAKINO, S. & TAKAGI, N. (1965). Some morphological aspects of the abnormal human Y chromosome. *Cytologia*, 30:274-292.
- MATTEVI, M.S. & SALZANO, F.M. (1975). Effect of sex, age and cultivation time on number of satellites and acrocentric associations in man. *Humangenetik*, 29:265-270.
- MATSUI, S. & SASAKI, M. (1973). Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature*, 246:148-150.
- McKAY, R.D.G., BOBROW, M. e COOKE, H.J. (1978). The identification of a repeated DNA sequences involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 27:19-32.
- McKENZIE, W.H., HOSTETTER, T.L. e LUBS, H.A. (1972). Y family study: Heritable variation in the length of the human Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.*, 24:686-693.
- McKENZIE, W.H. & LUBS, H.A. (1975). Human Q and C chromosomal variations: Distribution and incidence. *Cytogenet. Cell Genet.*, 14:97-115.
- MIKELSAAR, A.V.N., TÜÜR, S.J. e KAOSAAR, M.E. (1973). Human karyotype polymorphism. I. Routine and fluorescence microscopic unvestigation of chromosomes in a normal adult population. *Humangenetik*, 20:89-102.
- MIKELSAAR, A.V. & SCHWARZARCHER, H.G. (1978). Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblast. *Hum. Genet.*, 42:291-299.
- MIKLOS, G.L. & JOHN, B. (1979). Heterochromatin and satellite DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 31:264-280.
- MOAR, M.H., PURDOM, J.F. e JONES, K.W. (1975). Influence of temperature on the detectability and chromosomal distribution of specific DNA sequences by in situ hybridisation. *Chromosoma*, 53:345-359.
- MONSALVE, M.V., ERDTMANN, B., OTTO, P.A. e FROTA-PESSOA, O. (1980). The human Y chromosome: Racial variation and evolution. *Rev. Brasil. Genet. III*, 4:433-446.

- MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.G., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M. e HUNGERFORD, D.A. (1960). Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell Res.*, 20: 613-616.
- NIELSEN, T. & FRIEDRICH, V. (1972). Length of the chromosome in criminal males. *Clin. Genet.*, 3:281-285.
- NOEL, B., ENRERIT, I., LUCIANI, J.M. e QUACK, B. (1971). A familial Y/autosome translocation in man. *Clin. Genet.*, 2: 1-6.
- NUZZO, F., CAVIEZEL, F. e CARLI, L. DE (1966). Y chromosome and exclusion of paternity. *Lancet*, *ii*:260-262.
- OHNO, S., KAPLAN, W.D. e KINOSITA, R. (1957). Heterochromatic regions and nucleolus organizers in chromosomes of the mouse, *Mus musculus*. *Exptl. Cell Res.*, 13:358-364.
- OHNO, S., KAPLAN, W.D. e KINOSITA, R. (1961). X-chromosome behavior in germ and somatic cells of *Rattus norvegicus*. *Exptl. Cell Res.*, 22:535-544.
- PARDUE, M.L. & GALL, J.G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168:1356-1358.
- PASSARGE, E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: Longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.*, 31:106-115.
- PATIL, S.R. & LUBS, H.A. (1977). A possible association of long Y chromosomes and fetal loss. *Hum. Genet.*, 35:233-235.
- PHILLIPS, R.B. (1977). Inheritance of Q and C band polymorphisms. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19:405-413.
- PODUGOLNIKOVA, O.A., SUSHANLO, H.M., PARFENOVA, I.V. e PROKOFIEVA-BELGOVSKAJA, A.A. (1979). The quantitative analysis of polymorphism of human chromosomes 1, 9, 16 and Y. II. Comparison of the C segments in male and female individuals (group characteristics). *Hum. Genet.*, 49:251-260.
- RIBEIRO, L.R. (1977). *Estudo do Comprimento do Y de Índios*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- RIBEIRO, L.R., CAVALLI, I.J., FONTOURA Jr., E., SBALQUEIRO, I.J., MAIA, N.A. e MUNIZ, E.C.N. (1981). The human Y chromosome: Racial variation. *Rev. Brasil. Genet.* (No prelo).
- RIBEIRO, L.R., ABÉ, K., SILVA, M.E.T., AZEVEDO, E.S. e FERNANDES Jr., H. (1981). O comprimento do cromossomo Y de negros. *Ciênc. Cult.*, 3(supl.):702.

- ROBINSON, J.A. & BUCKTON, K.E. (1971). Quinacrine fluorescence of variant and abnormal human Y chromosomes. *Chromosoma*, 35: 342-352.
- SAUNDERS, G.F. (1974). Human repetitious DNA. *Adv. Biol. Med. Phys.*, 15:19-46.
- SAUNDERS, G.F., HSU, T.C., GETZ, M.J., SIMIEN, E.L. e ARRIGHI, F. E. (1972). Locations of a human satellite DNA in human chromosomes. *Nature New Biol.*, 236:244.
- SAUNDERS, G.F., CHUANG, G.R. e SAWADA, H. (1975). Genome complexity and in vivo transcription in human leukemic leucocytes. *Acta Haematol.*, 54:227-233.
- SCHMIDTKE, J. & SCHMIDT, M. (1980). Regional assignment of a 2.1-kb repetitive sequence to the distal part of the human Y heterochromatin. *Hum. Genet.*, 55:255-257.
- SCHNEIDL, W. (1971). Fluoreszenzuntersuchungen über die Längevariabilität des Y-Chromosoms beim Menschen. *Humangenetik*, 12:188-194.
- SCHNEIDL, W. (1973). Analysis of the human karyotype by the recent banding techniques. *Archiv. Genetik*, 46:65-98.
- SCHWARZACHER, H.G. (1976). *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 1/3. Chromosome. Berlin, Springer-Verlag. 182 pág.
- SEABRIGHT, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, ii:971-972.
- SMITH, G.P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossing-over. *Science*, 191:528-535.
- SOUDEK, D., LANGMUIR, V. e STEWART, D.J. (1973). Variation in the nonfluorescent segment of long Y chromosome. *Humangenetik*, 18:285-290.
- SOUDEK, D. & SROKA, H. (1977). C-bands in seven cases of accessory small chromosomes. *Clin. Genet.*, 12:285-289.
- SOUDEK, D. & SROKA, H. (1978). Inversion of fluorescent segment in chromosome 3. A polymorphic trait. *Hum. Genet.*, 44:109-115.
- STAHL, A., LUCIANI, J.M., DEVICTOR, M., CAPADANO, A.H. e GAGNÉ, R. (1975). Constitutive heterochromatin and micronucleoli in human oocyte at the diplotene stage. *Humangenetik*, 26: 315-327.

- STARKMAN, M.N. & SHAW, M.W. (1967). Atypical acrocentric chromosomes in Negro and Caucasian mongols. *Am. J. Hum. Genet.*, 19:162-173.
- STEFFENSEN, D.M. (1977). Human gene localization by RNA: DNA hybridization in situ. In: YUNIS, J.J. (ed.). *Molecular Structure of Human Chromosomes*. New York, Academic Press. Pp. 58-88.
- SUMNER, A.T., EVANS, H.J. e BUCKLAND, R.A. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature*, 232: 31-32.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple method for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, 75:304-306.
- SZABO, P., KUNKEL, L., YU, L.C., GEORGE, D. e SMITH, K.K. (1979). Chromosomal distribution of DNA sequences derived from the human Y chromosome in huam higher primates. *Cytogenet. Cell Genet.*, 25:212-213.
- TISHLER, P.V., LAMBOROT-MANZUR, M. e ATKINS, L. (1972). Polymorphism of the human Y chromosome. Fluorescence microscopic studies on the sites of morphologic variation. *Clin. Genet.*, 3:116-122.
- UNNERUS, V., FELLMAN, J. e CHAPELLE, A. DE LA (1967). The length of the human chromosome. *Cytogenetics*, 6:213-227.
- VAN DYKE, D.L., PALMER, C.G., NANCE, W.E. e YU, P.L. (1977). Chromosome polymorphism and twin zygosity. *Am. J. Hum. Genet.*, 29:431-447.
- VERMA, R.S., DOSIK, H., SCHARF, T. e LUBS, H.A. (1978). Length heteromorphisms of fluorescent (f) and non-fluorescent (nf) segments of human Y chromosome: Classification, frequencies and incidence in normal Caucasians. *J. Med. Genet.*, 15: 277-281.
- VERMA, R.S. & DOSIK, H. (1980). Human chromosomal heteromorphisms: Nature and clinical significance. *Int. Review Cytogenet.*, 62:361-383.
- WALZER, S., BREAU, G. e GERALD, P.S. (1969). A chromosome survey of 2,400 normal newborn infants. *J. Pediatrics*, 74:438-448.
- YAMADA, K. & HASEGAWA, T. (1978). Types and frequencies of Q-variant chromosomes in a Japanese population. *Hum. Genet.*, 44:89-98.

- ZANKL, H. & ZANG, K.D. (1971). Structural variability of normal human karyotype, *Humangenetik*, 13:160-162.
- ZECK, L. (1969). Investigation of metaphase chromosomes with DNA-banding fluorochromes. *Exptl. Cell Res.*, 58:463.

