

Francisco José Chagas Pisaní

ANÁLISE DO CARIÓTIPO HUMANO
EM CÉLULAS DO BULBO CAPILAR

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas de Universida-
de Estadual de Campinas, para a
obtenção do grau de Doutor.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

Campinas, SP

1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman
Universidade Estadual de Campinas

Dr. José Fernando Pereira Arena
Universidade Estadual de Campinas

Sr. Roberto Bueno de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas

Sra. Geralda Luzia Alves
Universidade Estadual de Campinas

Sra. Ivone Aparecida Onisto Tasso

Sr. José Roberto Hoffling

Funcionários do Departamento de Genética Médica da
Universidade Estadual de Campinas

Alunos do terceiro ano da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

ÍNDICE

	pag.
I. Introdução	1
II. Material e Métodos	8
III. Resultados	15
IV. Discussão e Conclusões	34
V. Sumário	41
Referências Bibliográficas	42

I. INTRODUÇÃO

Para que uma preparação citológica seja adequada à análise do cariótipo de um indivíduo é necessário que ela apresente um grande número de células em metáfase, que os cromossomos metafásicos estejam dispersos nas células em divisão e que o conjunto celular se distribua em uma camada única.

Os cromossomos metafásicos das células somáticas constituem excelente material para os estudos citogenéticos, pois durante a mitose, a condensação progressiva das cromátides faz com que, na metáfase, a constrição primária se torne mais evidente, definindo a forma dos cromossomos com base na posição do centrômero. Tal constrição também é nítida durante a anáfase mas, nessa fase da mitose, os cromossomos são unifilamentosos, ao passo que durante a metáfase eles são constituídos por duas cromátides.

Tendo em vista a natureza difilamentosa dos cromossomos metafásicos, e considerando que, durante a metáfase, a relação de tamanho existente entre os pares cromossômicos pode ser estabelecida com grande facilidade, torna-se possível, nessa fase, classificá-los de acordo com o seu tamanho relativo e a posição do centrômero. Isso favorece o reconhecimento não apenas de eventuais aberrações numéricas do cariótipo, como também de aberrações cromossômicas estruturais.

É suficientemente conhecido que as divisões celulares não são sincrônicas, mesmo nos tecidos com alto índice mitótico natural, ou induzido (BEIGUELMAN, 1974). Portanto, para que se possa obter um número apreciável de metáfases, capaz de permitir a análise cariotípica, é necessário que se empregue substâncias que tenham a propriedade de impedir que as células em divisão ultrapassem essa fase

do período mitótico. Em qualquer tecido com alta taxa de mitoses natural ou induzida é necessário, portanto, intervir artificialmente, para que seja obtido um acúmulo de metáfases.

O acúmulo de metáfases é conseguido, geralmente, por intermédio da colquicina, alcalóide extraído da liliácea *Colchicum autumnale*, a qual impede a formação do fuso citoplasmático, permitindo que os cromossomos metafásicos fiquem dispersos no citoplasma da célula. Embora venha sendo empregada, há tanto tempo, com essa finalidade, principalmente em citogenética vegetal (SÁEZ, 1948) não se conhece o mecanismo pelo qual essa substância atua. Sabe-se apenas que, na presença da colquicina, o fuso citoplasmático não se forma.

A dispersão dos cromossomos metafásicos provocada pela colquicina é, entretanto, insuficiente para propiciar a separação dos cromossomos de modo a permitir a análise desses elementos nucleares. Em grande número de tecidos vegetais, e em alguns tecidos animais, o simples esmagamento, entre lâmina e lamínula, de um fragmento fixado, permite a obtenção de preparações cromossômicas com os cromossomos metafásicos bem distanciados entre si. Entretanto, na maioria dos tecidos humanos o volume celular é relativamente pequeno em comparação ao número de cromossomos contidos no núcleo. Essa dificuldade é vencida provocando-se, antes da fixação, o aumento do volume das células em estudo, por intermédio do emprego de soluções hipotônicas de composição química, graus de hipotonicidade e tempos de atuação diferentes, de acordo com o tecido tratado (MAKINO & NISHIMURA, 1951; HSU, 1952). Assim, por exemplo, podem ser empregadas soluções hipotônicas de citrato de sódio ou de potássio (FORD *et al.*, 1956; FORD *et al.*, 1958; HUNGERFORD & DI BERNARDINO, 1958; SHARMA & SHARMA, 1965), também utilizadas para prevenir a formação de grumos celulares, bem como soluções hipotônicas de cloreto de potássio (OHNU-

KI, 1965), que aliam à sua ação hipotônica um efeito desespiralizante sobre os cromossomos ou, uma solução constituída por quatro partes de água tridestilada e uma parte de solução fisiológica de Hanks.

Quando o material celular é constituído por uma suspensão de células, como no caso de cultura de leucócitos, é relativamente fácil obter preparações citológicas em uma camada celular única. Nesse caso, é suficiente distribuir gotas da suspensão celular em um fixador alcoólico sobre lâminas secas ou umedecidas (ROTHFELS & SIMINOVITCH, 1958; TJIO & PUCK, 1958). Em fragmentos de tecidos, a obtenção de células em uma camada única pode ser conseguida pelo esmagamento, entre lâmina e lamínula, do material fixado (HEITZ, 1936; KOLLER, 1942; SACHS, 1953).

Uma outra maneira de obter uma camada unicelular a partir de fragmentos de tecido, consiste em tratá-los antes da fixação, com enzimas proteolíticas (LUBS & CLARK, 1963; KOTLER & LUBS, 1967) ou soluções salinas, como as de citrato de sódio, as quais atuando sobre o cimento intercelular ou a membrana celular, provocam a dispersão das células (FORD *et al.*, 1956, 1958; HUNGERFORD & DI BERNARDINO, 1958; SHARMA & SHARMA, 1965). Assim, a utilização de um tecido com alto índice mitótico, embora seja uma condição necessária não é suficiente para a obtenção de preparações cromossômicas de boa qualidade.

No homem são poucos os tecidos acessíveis que apresentam alto índice mitótico natural. Por isso, a introdução do uso de fitohemaglutinina extraída do feijão, como um agente mitogênico para os linfócitos do sangue periférico (RIGAS & OSGOOD, 1955; NOWELL, 1960; MOOREHEAD *et al.*, 1960), possibilitou o surgimento de uma técnica fácil para a obtenção de um grande número de células em divisão, em um período de incubação relativamente curto.

Com isso, a metodologia dos estudos de Citogenéti

ca Humana avançou consideravelmente, de modo a consagrá-la, definitivamente, como uma nova especialidade da Genética Humana.

Em 1912 von WINIWARTER, a partir de contagens feitas em metáfases de espermatogônias e espermatócitos, concluiu que a mulher tinha 48 cromossomos e o homem 47, e que o sexo na espécie humana era determinado pela presença de um ou de dois cromossomos X.

Quase dez anos de passaram até que PAINTER(1921) identificasse, em material testicular, o cromossomo Y humano e deduzisse, corretamente, que o mecanismo de determinação do sexo na espécie humana também estava, normalmente, na dependência de o indivíduo possuir dois cromossomos X ou um cromossomo X e um cromossomo Y. Entretanto, as dificuldades existentes, na época, para a análise de cariótipo levaram PAINTER (1923) a concluir que o número diplóide de cromossomos na espécie humana era 48 e, até 1956(TJIO & LEVAN, 1956), esse número foi aceito sem contestação.

É fácil vislumbrar a razão pela qual durante tanto tempo tal engano foi aceito sem discussão. De fato, nas observações feitas em cortes histológicos era difícil visualizar perfeitamente os cromossomos, em consequência da espessura das secções e da sobreposição do material celular. Por outro lado, nas análises cromossômicas feitas durante a espermatogênese humana, sabe-se atualmente, que, na diacinese, quando é possível reconhecer os cromossomos bivalentes, tem-se que os cromossomos X e Y se separam precocemente(FERGUSON SMITH, 1971). Assim, os pioneiros da citogenética humana, contavam 24 bivalentes ao invés de 22 bivalentes mais um cromossomo X e um Y.

Com a introdução de técnicas que utilizam células cultivadas *in vitro*, e que possibilitam a observação de uma camada celular única, iniciou-se uma nova fase no estudo dos cromossomos humanos.

Assim, TJIO & LEVAN (1956) demonstraram que era possível obter preparações cromossômicas nas quais todos os cromossomos individualizados podiam ser contados e analisados, segundo a sua forma e tamanho. As contagens feitas por esses autores em culturas de células somáticas provenientes de fibroblastos de embriões humanos demonstraram, sem sombra de dúvida, que o número diplóide da espécie humana é de 46 cromossomos. Ainda em 1956, FORD & HAMERTON trabalhando com material testicular humano, confirmaram os achados de TJIO & LEVAN (1956).

A partir de 1956 foram, então, descritos vários métodos de cultura de células obtidas de outros tecidos. Entretanto, as grandes facilidades para o estudo dos cromossomos humanos só foram conseguidas, como já se mencionou anteriormente, após a publicação do trabalho de NOWELL (1960), que introduziu o uso da fitohemaglutinina como um agente mitogênico para o linfócito e do trabalho de MOOREHEAD *et al.* (1960), que consagrou o uso da técnica de secagem das lâminas ao ar (ROTHFELS & SIMINOVITCH, 1958; TJIO & PUCK, 1958), permitindo a obtenção de preparações cromossômicas com um alto padrão técnico.

A cultura de linfócitos de sangue periférico passou, então, a ser largamente empregada, em vista da facilidade de obtenção do material celular, do curto período de incubação necessário, bem como, do grande número de células em metáfase, que podem ser obtidas pelo tratamento adequado dos linfócitos.

Entretanto, em situações especiais, há a necessidade de se analisarem células de outros tecidos. Nesses casos utiliza-se a cultura de fibroblastos (HAYFLICK & MOOREHEAD, 1961; HAYFLICK, 1965; HARNDEN & BRUNTON, 1965; HAMERTON, 1971), técnica que requer períodos de incubação mais longos e um laboratório mais sofisticado. Além disso, a não ser que se trate de tecidos obtidos de embriões, fe-

tos, natimortos ou de pacientes falecidos, o método requer uma pequena biópsia de pele, exigência essa que é sempre desagradável para os pacientes.

Visto que a medula óssea constitui, além do testículo, o único tecido acessível que, seguramente, apresenta um alto índice mitótico *in vivo*, o material obtido por punção esternal permite preparações diretas que não necessitam propriamente de cultura (BOTTURA & FERRARI, 1960; TJIO & WHANG, 1965). Entretanto, a punção de medula óssea requer ambiente hospitalar, é desagradável para o indivíduo em estudo e dificilmente justificável, quando puramente experimental.

O mesmo acontece em relação à biópsia de testículo. Embora seja possível a obtenção de excelentes preparações diretas de cromossomos meióticos a partir de tecido testicular, são óbvias as inconveniências dessa técnica.

Apesar de os progressos técnicos terem sido muitos, no sentido de simplificar as técnicas utilizadas rotineiramente e de introduzir técnicas novas e sofisticadas que permitem o estudo mais pormenorizado dos cromossomos, as fontes de material celular disponíveis permaneceram as mesmas desde 1960. Por isso, a obtenção de cromossomos metafásicos a partir de um tecido que não seja de origem mesodérmica, como os comentados anteriormente torna-se imprescindível.

Em 1970, o autor comunicou a possibilidade de utilização de células obtidas do bulbo capilar para o estudo dos cromossomos metafásicos humanos (PISANI, 1970) e, no mesmo ano, DAKER (1970) em uma carta ao editor da revista *Lancet*, após uma descrição resumida da técnica com a qual obteve contagens cromossômicas em células da raiz de fios de bigode, ressaltou a necessidade de aperfeiçoá-la para promover o espalhamento cromossômico. Na mesma revista e, em outra carta ao editor SPERLING (1971) confirmou as ob-

servações feitas por DAKER (1970) e descreveu sumariamente outra técnica. A partir daí o autor, que não parou de se dedicar ao desenvolvimento da técnica de obtenção de metafases em bulbos capilares humanos, não teve outra notícia sobre esse assunto, na literatura pertinente.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Descrever uma técnica que permitisse a obtenção de cromossomos metafásicos humanos a partir de células do bulbo capilar.
2. Aplicar essa técnica em uma amostra de caucasóides saudáveis, para a verificação das possibilidades de uso dessa técnica para fins práticos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foram sorteados 20 indivíduos do sexo masculino e 20 do sexo feminino, dentre os alunos da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, todos caucasóides e pertencentes à mesma faixa etária. Assim, a média (\bar{x}) e o desvio padrão (s) das idades dos alunos foram $\bar{x} = 20,35$ e $s = 1,27$ anos e das alunas foram $\bar{x} = 20,75$ e $s = 1,26$ anos.

De cada indivíduo sorteado foi extraído manualmente um número variável de fios de cabelo, sem escolha preferencial de uma região do couro cabeludo. Isso porque o interesse precípua do autor era a obtenção de 10 bulbos capilares de cada indivíduo, que fossem ricos em material celular da bainha radicular epitelial e contivessem parte da matriz germinativa. A fim de evitar o dessecação dos bulbos, os fios de cabelo eram transferidos imediatamente para tubos de ensaio (9mm x 34mm) contendo 2 ml de uma solução hipotônica recém-preparada, na temperatura de 37°C , e colquicina para provocar o acúmulo de metáfases. Esse meio hipotônico consistiu de 31% de solução fisiológica equilibrada de Hanks, contendo 5 μg de colquicina (Houdé) e de 60% de solução de ágar (Oxóid nº 3) a 0,3% em água tridestilada.

A solução fisiológica de Hanks tem a seguinte composição na quantidade de um litro:

Na Cl	8,00 g
KCl	0,40 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0,12 g
Dextrose	1,00 g
Fenol vermelho	2 ml
Ca Cl ₂	0,14 g

Mg SO₄ 7H₂O 0,20 g
Na HCO₃ 0,35 g
H₂O tridestilada q.s.p. ... 1.000 ml

Os componentes dessa solução eram dissolvidos separadamente em água tridestilada e vertidos em um balão de vidro, na sequência apresentada acima. O fenol vermelho, usado como indicador de pH, era preparado a partir da dissolução de uma grama dessa substância em 28 ml de Na OH 0,1N, completando-se o volume de 200 ml com água tridestilada. Depois de preparada, essa solução era filtrada sob pressão positiva, através de um filtro Seitz munido de placa esterilizante, e distribuída em alíquotas de 50 ml em frascos do tipo "vidro de xarope" com capacidade de 90 ml, os quais eram vedados com rolhas de borracha esterilizadas, para serem armazenados em geladeira.

O ágar foi preparado em frascos do tipo "vidro de xarope", contendo 20 ml de água tridestilada e 0,06g de ágar, vedados com rolhas de algodão e gaze protegidas por papel impermeável.

Após serem autoclavados durante 30 minutos, a 125^oC e sob pressão de 1,5 atmosferas, os frascos foram mantidos em estufa a 37^oC a fim de evitar a solidificação do ágar. Com o objetivo de prevenir a perda de água e eventual contaminação tomou-se sempre o cuidado de substituir as rolhas de algodão e gaze por rolhas de borracha, previamente esterilizadas.

No preparo do meio hipotônico, a solução fisiológica de Hanks contendo colquicina era aquecida a 37^oC antes de vertê-la no frasco contendo ágar. Após agitar vigorosamente a mistura da solução fisiológica de Hanks e de ágar, ele era distribuída nos tubos de ensaio medindo 9mm x 34mm, mantidos a 37^oC em banho-maria.

Como se verá, mais adiante, esses cuidados de assepsia foram tomados apenas para evitar a contaminação do

material armazenado, já que, durante o desenvolvimento da técnica propriamente dita não se fazem necessários esses cuidados.

Os bulbos foram selecionados por exame macroscópico. Assim, somente foram utilizados os fios de cabelo, distribuídos em número de dois por tubo, que apresentassem raiz observável, de modo a garantir, à vista desarmada, boa quantidade de material celular em cada um deles.

Caso contrário, novos fios de cabelo eram extraídos. A figura 1 apresenta as fotos de um bulbo considerado bom para prosseguimento do trabalho (Fig.1a) e de um que deve ser desprezado (Fig.1b).

Os bulbos considerados ricos em material celular eram mantidos imersos na solução hipotônica com ágar e colquicina (pH 6,5-6,8) durante uma hora e quarenta e cinco minutos, incubados a 37°C. Decorrido esse tempo, eles eram transferidos para tubos com outra solução hipotônica (solução fisiológica de Hanks e água tridestilada estéril, na proporção de 1:4), continuando-se a incubação a 37°C por mais quinze minutos, a fim de intensificar o procedimento da hipotonia à qual se deve submeter o material celular.

O passo seguinte consistia da fixação dos bulbos capilares em metanol acético (metanol e ácido acético glacial na proporção 3:1), durante um tempo mínimo de quinze minutos e um tempo máximo de uma hora.

Decorrido o tempo de fixação, os bulbos foram submetidos durante quinze minutos a uma hidrólise ácida, em HCl 1N, recém-preparado e à 37°C.

Após a hidrólise, o bulbo capilar era imerso em uma gota do fixador diluído a 50% em água destilada colocada em uma lâmina disposta sobre fundo preto. A fim de evitar que o fixador diluído se dispersasse ao longo da haste do cabelo, interpunha-se, entre ela e a lâmina, um pe

Fig.1 - Bulbos capilares com quantidade de material celular suficiente(a) e insuficiente(b) para a aplicação da técnica e os estiletos(c,d e e) utilizados para remover o material celular da bainha radicular epitelial. Aumento 3x.

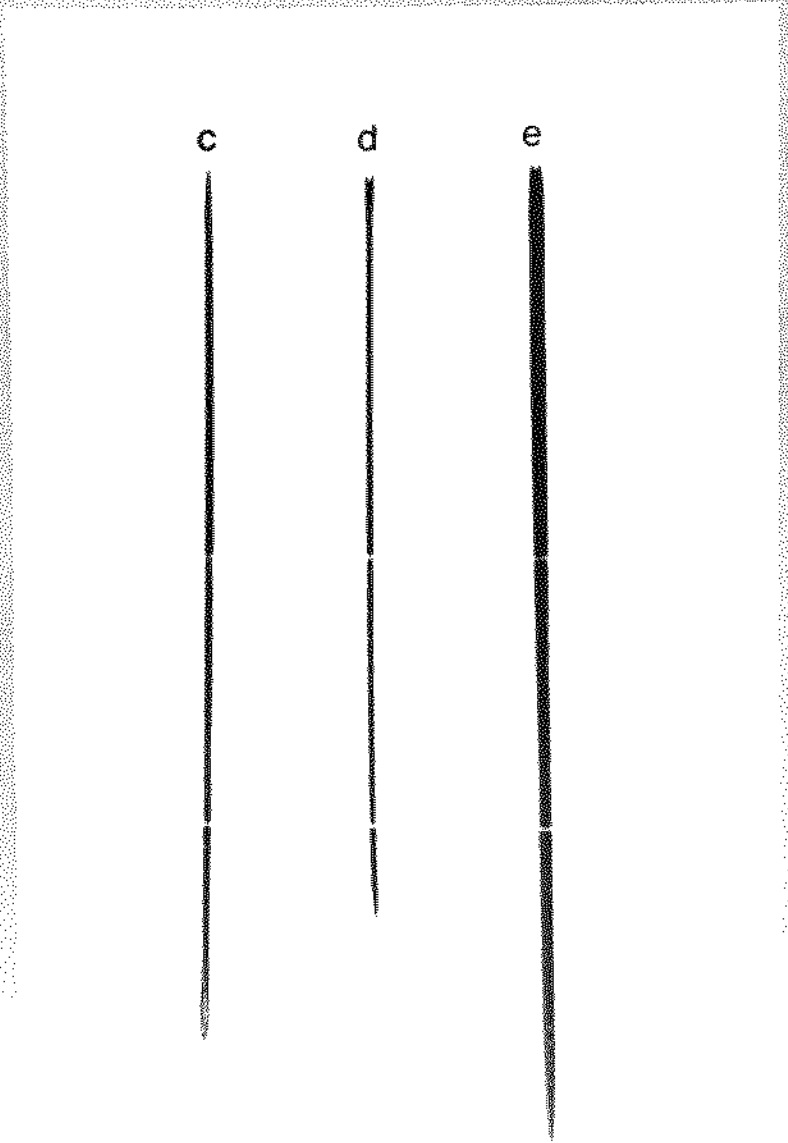
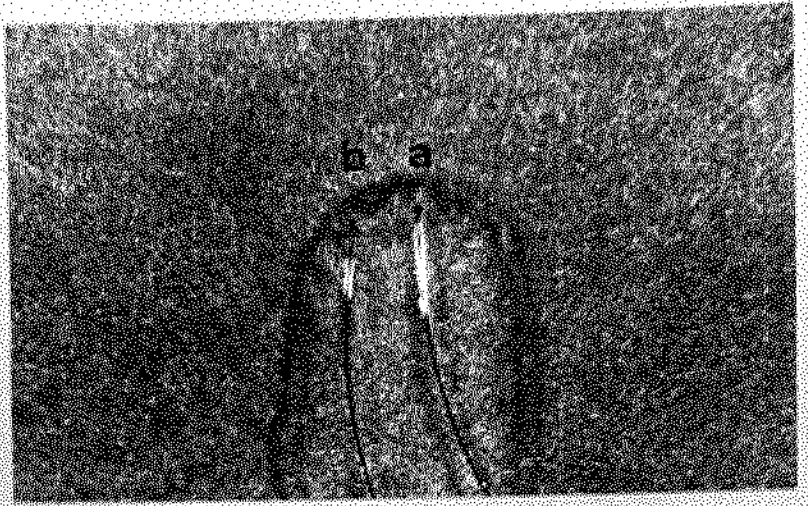


fig. 1

daço de palito de fósforo. Decorridos dois minutos ou, o tempo suficiente para que o bulbo de translúcido passasse a transparente, imobilizava-se a haste do cabelo, numa região próxima ao bulbo, com o auxílio de um estilete pontegudo (Fig.1c). Um outro estilete, terminado em forquilha (Fig.1d,e) era utilizado para destacar o bulbo da haste. Isso era feito apoiando a forquilha do estilete no terço superior do bulbo e deslizando-a delicadamente no sentido da sua base.

Com esse procedimento garantia-se, não apenas a retirada de, praticamente, todo o material celular pertencente à bainha radicular epitelial e à parte da matriz germinativa como, também, a integridade do mesmo, sem contaminá-lo com fragmentos da bainha radicular interna, bastante queratinizada. A haste era, então, desprezada e, sobre o bulbo destacado colocava-se uma lamínula (24mm x 32mm), tendo-se o cuidado de impedir a formação de bolhas de ar. O tempo decorrido entre a imersão do bulbo capilar no fixador diluído e a montagem da lamínula oscilava entre 5 e 6 minutos.

A dispersão das células, bem como dos cromossomos metafásicos, presentes, era obtida por compressão do material entre lâmina e lamínula (técnica de "squash"). Depois de lutar as lamínulas com cera de abelha, as preparações estavam prontas para serem examinadas sob microscopia de contraste de fase.

As preparações celulares foram analisadas quanto ao número total de metáfases observadas e quanto ao número de metáfases analisáveis, ou seja, daquelas que se prestavam à avaliação do número cromossômico, bem como das que apresentavam condições de serem fotografadas para posterior emparelhamento dos cromossomos.

Visto que o número de metáfases observadas, de metáfases analisáveis e de fios arrancados devem seguir, a-

proximadamente, a distribuição de Poisson, esses valores foram transformados antes de serem analisados. Tal transformação consistiu em somar 0,5 a cada valor observado, extraindo-se a raiz quadrada de cada adição.

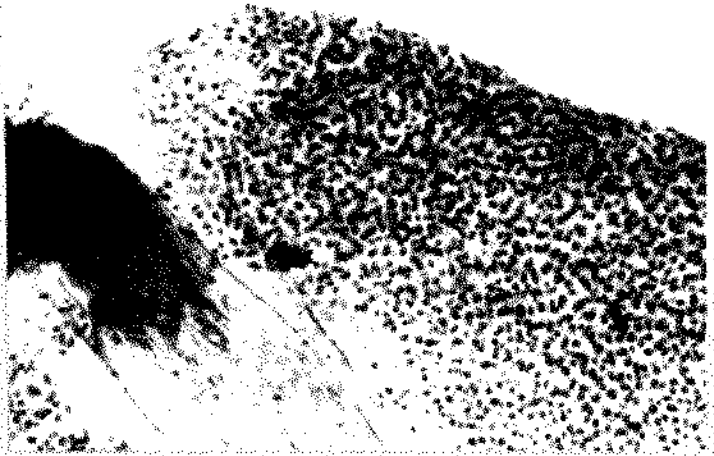
A partir desses valores transformados foram calculadas as médias e o erro da média para cada série de valores representativos de um indivíduo, bem como, para os totais individuais, a fim de obter as médias amostrais e os respectivos erros da média.

O intervalo de confiança da média com probabilidade de 95% foi calculado a partir dos dados transformados pela fórmula $\bar{x} \pm [2,262.s(\bar{x})]$ para os totais de bulbos por indivíduo, e $\bar{x} \pm [2,093.s(\bar{x})]$ para os totais de indivíduos, tendo em vista o tamanho amostral permitir considerar o valor de t , ao nível de 5% com 9 e 19 graus de liberdade como sendo respectivamente, $t = 2,262$ e $t = 2,093$.

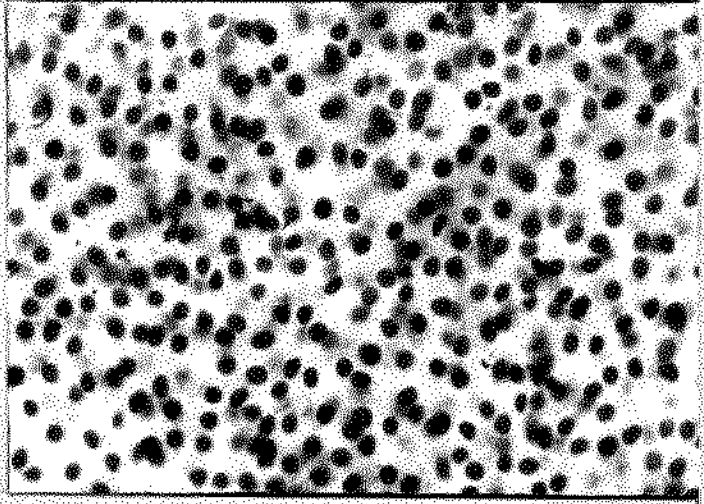
Fig.2 - Células da bainha radicular epitelial de um bulbo capilar não tratado por colquicina.

- a - aumento: 240x
- b - aumento: 612x
- c - aumento: 1.536x.

a



b



c

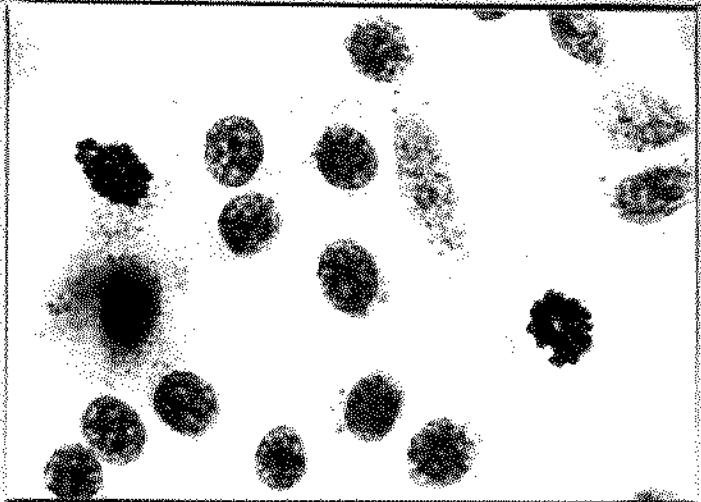


fig. 2

III. RESULTADOS

Nas tabelas I e III são apresentados os valores correspondentes ao número de metáfases encontradas nas amostras feminina e masculina, respectivamente, enquanto os dados das tabelas II e IV se referem ao número observado de metáfases analisáveis (Fig.3) nas amostras feminina e masculina.

As tabelas V e VII mostram a distribuição das amostras feminina e masculina, segundo o número médio de metáfases por bulbo capilar em cada indivíduo. Nessas tabelas são expressos as médias e erros da média, calculados a partir dos dados transformados, bem como os valores reconvertidos, das médias e dos respectivos intervalos de confiança.

A distribuição das amostras feminina e masculina, segundo o número médio de metáfases analisáveis por bulbo capilar em cada indivíduo é apresentada nas tabelas VI e VIII. Da mesma forma que nas tabelas V e VII, os valores apresentados se referem às médias e erros da média, obtidos com os dados transformados, e aos valores reconvertidos das médias e dos intervalos de confiança correspondentes.

Na tabela IX estão representadas as médias amostrais de metáfases observadas, metáfases analisáveis, metáfases estouradas e de fios arrancados, obtidas a partir da transformação dos totais individuais correspondentes, bem como os valores reconvertidos das médias amostrais e de seus respectivos intervalos de confiança.

Os dados expressos na tabela X mostram que não houve diferença significativa quando se comparam, quanto ao sexo, os valores das médias amostrais de metáfases

Fig.3 - Fotomicrografias de metáfases consideradas analisáveis.

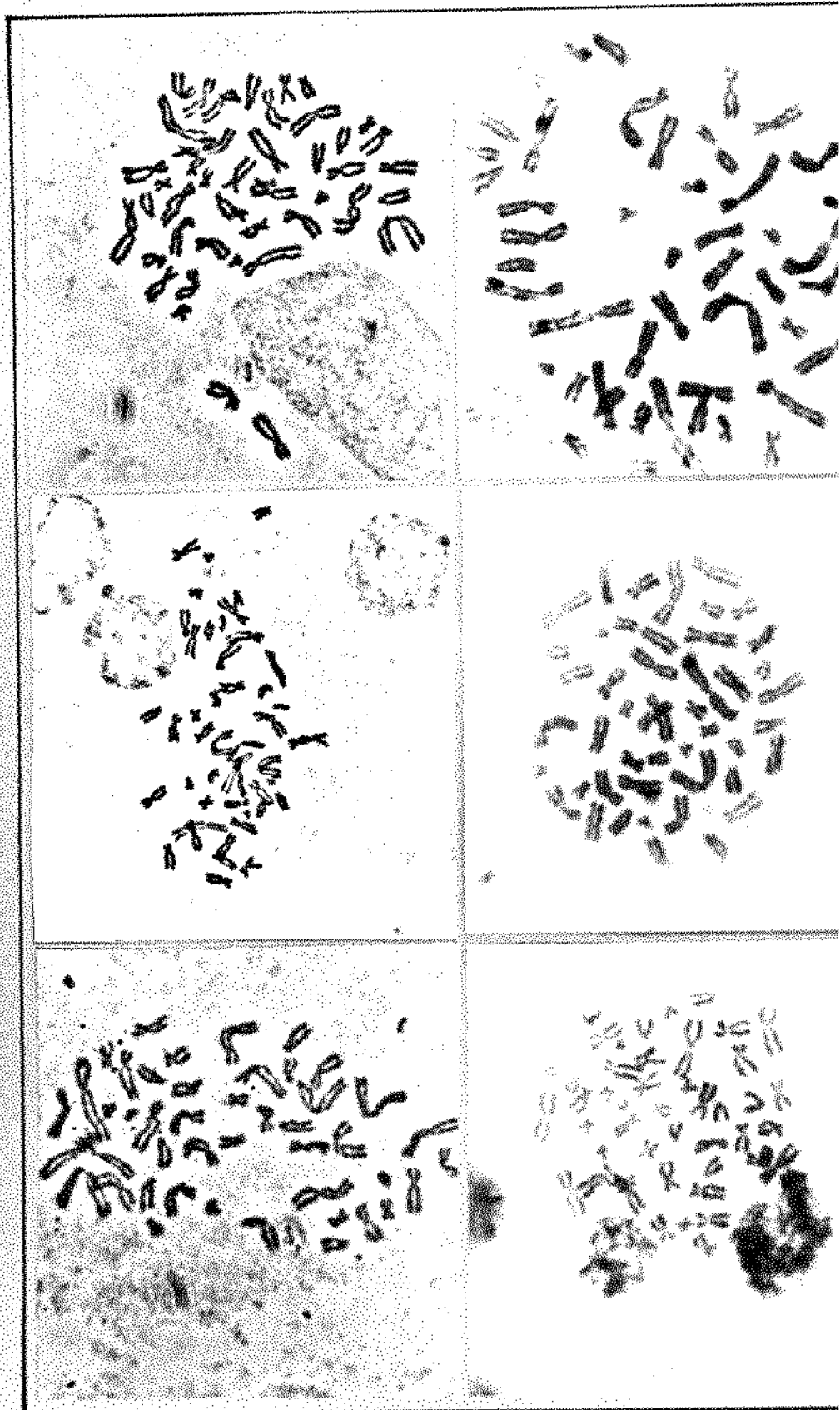


fig. 3

encontradas, de metáfases analisáveis e de fios arrancados.

A distribuição dos quatrocentos bulbos capilares segundo o número de metáfases por bulbo é apresentada na ta bela XI.

A tabela XII expressa o resultado da distribuição dos 40 indivíduos da amostra, segundo as diferentes classes de proporção de bulbos ativos e inativos. Para o estabelecimento das classes foram considerados como ativos os bulbos com pelo menos uma metáfase, e como inativos os bulbos nos quais não foram observadas metáfases.

A tabela XIII mostra a variação da amostra, segun do o rendimento da técnica expresso em porcentagem de metáfases analisáveis, tomadas em relação às metáfases observadas e a tabela XIV mostra a distribuição dos 40 indivíduos da amostra de acordo com diferentes classes de rendimento da técnica.

Tabela I. Número de metáfases encontradas em cada bulbo e nos dez bulbos de cada indivíduo do sexo feminino

INDIVÍDUO	Nº DE METÁFASES POR BULBO										TOTAL
1	2	10	8	3	5	8	1	7	2	5	51
2	3	0	0	1	2	1	1	0	5	3	16
3	0	1	0	0	0	1	0	0	1	4	7
4	7	1	2	0	5	2	6	2	0	6	31
5	10	16	11	6	6	4	14	0	6	10	83
6	4	5	0	0	0	2	9	2	4	6	32
7	0	1	4	6	11	1	0	2	10	0	35
8	4	0	8	7	4	1	1	6	3	5	39
9	0	0	3	0	1	3	0	3	1	0	11
10	0	4	6	0	3	0	2	6	5	2	26
11	1	0	0	5	0	0	1	0	0	0	7
12	0	8	1	8	1	0	0	8	1	0	27
13	3	1	6	4	1	5	1	4	2	6	33
14	12	0	3	1	3	11	3	7	1	0	41
15	1	0	4	3	7	0	10	8	0	2	35
16	6	6	2	7	7	0	9	18	14	7	76
17	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	6
18	1	0	3	0	2	1	2	0	0	3	12
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	2	5	4	0	10	0	10	5	11	1	48
TOTAL											618

Tabela II. Número de metáfases analisáveis obtido em cada bulbo e nos dez bulbos de cada indivíduo do sexo feminino.

INDIVÍDUO	Nº DE METÁFASES ANALISÁVEIS POR BULBO										TOTAL
1	2	2	6	1	3	4	1	4	2	4	29
2	2	0	0	1	1	1	1	0	1	1	8
3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
4	5	0	1	0	3	1	4	0	0	5	19
5	6	8	4	4	3	2	8	0	2	4	41
6	2	1	0	0	0	1	5	0	3	4	16
7	0	1	3	6	9	1	0	2	6	0	28
8	1	0	4	4	1	1	0	4	1	4	20
9	0	0	1	0	0	2	0	3	0	0	6
10	0	1	2	0	1	0	1	4	4	0	13
11	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
12	0	3	0	5	0	0	0	6	1	0	15
13	0	0	2	1	0	2	0	1	2	2	10
14	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	4
15	1	0	4	1	4	0	7	7	0	1	25
16	2	2	2	0	6	0	7	7	8	3	37
17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	2	1	0	5	0	8	1	5	0	23
TOTAL											302

Tabela III. Número de metáfases encontradas em cada bulbo e nos dez bulbos de cada indivíduo do sexo masculino.

INDIVÍDUO	Nº DE METÁFASES POR BULBO										TOTAL
21	8	5	4	15	9	7	8	6	2	0	64
22	1	0	9	5	9	3	12	5	5	13	62
23	3	0	5	6	6	0	1	2	0	0	23
24	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
25	3	2	2	0	0	0	0	1	0	0	8
26	1	3	8	0	1	6	0	0	0	0	19
27	3	7	1	6	3	7	0	0	2	0	29
28	6	2	3	0	0	0	0	0	1	1	13
29	0	0	2	0	6	0	1	1	2	1	13
30	0	5	9	1	2	0	0	1	0	1	18
31	8	0	8	0	3	1	5	4	5	3	37
32	1	10	9	2	3	7	0	0	1	1	34
33	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	5
34	4	7	1	6	5	3	1	2	7	5	41
35	3	2	1	8	6	1	0	1	2	3	27
36	3	3	5	1	2	12	1	6	12	5	50
37	0	3	6	2	11	11	14	2	0	0	49
38	4	6	4	5	2	3	5	4	4	5	42
39	3	2	13	1	0	0	1	0	0	0	20
40	3	0	2	5	0	1	0	0	0	5	16
TOTAL											573

Tabela IV. Número de metáfases analisáveis obtido em cada bulbo e nos dez bulbos de cada indivíduo do sexo masculino.

INDIVÍDUO	Nº DE METÁFASES ANALISÁVEIS POR BULBO										TOTAL
21	2	2	1	9	4	2	3	0	0	0	23
22	1	0	5	2	4	2	9	3	4	11	41
23	0	0	0	3	4	0	1	1	0	0	9
24	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
25	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	5
26	0	3	4	0	1	1	0	0	0	0	9
27	2	3	1	5	2	4	0	0	0	0	17
28	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	8
29	0	0	1	0	4	0	0	0	1	1	7
30	0	5	8	1	0	0	0	0	0	1	15
31	6	0	4	0	2	0	4	2	3	2	23
32	0	6	4	1	0	5	0	0	1	0	17
33	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	3
34	3	5	0	3	2	2	1	2	6	2	26
35	1	2	0	4	0	0	0	0	0	3	10
36	2	2	2	0	0	9	0	5	8	4	32
37	0	3	4	1	5	8	10	1	0	0	32
38	2	3	1	2	0	2	1	4	1	4	20
39	0	0	6	1	0	0	1	0	0	0	8
40	1	0	2	4	0	0	0	0	0	2	9
TOTAL											315

Tabela V. Número médio de metáfases por bulbo capilar dos indivíduos do sexo feminino. Valores obtidos com os dados transformados ($\sqrt{x + 0,5}$) e reconvertidos (x).

INDIVÍDUO	$\sqrt{x + 0,5}$		x		
	\bar{x}	$s(\bar{x})$	\bar{x}	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}	
1	2,2757	0,2161	4,7	2,7	7,1
2	1,3464	0,1787	1,3	0,4	2,6
3	1,0038	0,1462	0,5	0,3	1,3
4	1,7564	0,2391	2,6	1,0	4,8
5	2,8216	0,3050	7,5	4,0	11,8
6	1,7501	0,2659	2,6	0,8	5,0
7	1,7453	0,3254	2,5	0,5	5,6
8	1,9818	0,2290	3,4	1,6	5,7
9	1,1598	0,1684	0,8	0,1	1,9
10	1,6718	0,2367	2,3	0,8	4,4
11	0,9744	0,1668	0,4	-	1,3
12	1,5248	0,3117	1,8	0,2	4,5
13	1,8812	0,1701	3,0	1,7	4,6
14	1,9142	0,3225	3,2	0,9	6,5
15	1,7813	0,3031	2,7	0,7	5,6
16	2,6794	0,3198	6,7	3,3	11,0
17	0,9226	0,1662	0,3	-	1,2
18	1,2182	0,1550	1,0	0,2	2,0
19	0,707	-	-	-	-
20	1,9902	0,2963	3,5	1,2	6,6

Tabela VI. Número médio de metáfases analisáveis por bulbo capilar dos indivíduos do sexo feminino. Valores obtidos com os dados transformados ($\sqrt{x+0,5}$) e reconvertidos (x).

INDIVÍDUO	$\sqrt{x + 0,5}$		x		
	\bar{x}	$s(\bar{x})$	\bar{x}	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}	
1	1,7976	0,1366	2,7	1,7	3,9
2	1,1052	0,0936	0,7	0,3	1,2
3	0,8106	0,0691	0,1	-	0,4
4	1,3960	0,2239	1,4	0,3	3,1
5	2,0482	0,2118	3,7	2,0	5,9
6	1,3196	0,1996	1,2	0,2	2,6
7	1,6203	0,2737	2,1	0,5	4,5
8	1,4798	0,1856	1,7	0,6	3,1
9	0,9626	0,1388	0,4	-	1,1
10	1,2326	0,1765	1,0	0,2	2,2
11	0,8234	0,1164	0,2	-	0,7
12	1,2232	0,2365	1,0	-	2,6
13	1,1602	0,1307	0,8	0,2	1,6
14	0,8980	0,1020	0,3	-	0,8
15	1,5516	0,2567	1,9	0,4	4,0
16	1,8970	0,2585	3,1	1,2	5,6
17	0,7588	0,0518	0,1	-	0,3
18	0,8106	0,0691	0,1	-	0,4
19	0,7070	-	-	-	-
20	1,4982	0,2483	1,7	0,4	3,7

Tabela VII. Número médio de metáfases por bulbo capilar dos indivíduos do sexo masculino. Valores obtidos com os dados transformados ($\sqrt{x + 0,5}$) e reconvertidos (x).

INDIVÍDUO	$\sqrt{x + 0,5}$		\bar{x}	x	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}
	\bar{x}	$s(\bar{x})$			
21	2,4891	0,2796	5,7	2,9	9,2
22	2,4211	0,3050	5,4	2,5	9,2
23	1,4948	0,2506	1,7	0,4	3,7
24	0,7944	0,0874	0,1	-	0,5
25	1,0500	0,1481	0,6	-	1,4
26	1,3320	0,2636	1,3	-	3,2
27	1,6696	0,2609	2,3	0,7	4,6
28	1,1986	0,2009	0,9	-	2,2
29	1,2214	0,1850	1,0	0,1	2,2
30	1,3511	0,2526	1,3	1,1	1,5
31	1,9022	0,2541	3,1	1,3	5,6
32	1,7602	0,2985	2,6	0,7	5,4
33	0,9002	0,1451	0,3	-	1,0
34	2,0740	0,1821	3,8	2,3	5,7
35	1,6750	0,2092	2,3	0,9	4,1
36	2,2082	0,2631	4,4	2,1	7,3
37	2,0293	0,3773	3,6	0,9	7,8
38	2,1520	0,0868	4,1	3,3	10,7
39	1,3111	0,2946	1,2	-	3,4
40	1,2902	0,2199	1,2	0,1	2,7

Tabela VIII. Número médio de metáfases analisáveis por bulbo capilar dos indivíduos do sexo masculino. Valores obtidos com os dados transformados ($\sqrt{x + 0,5}$) e reconvertidos (x).

INDIVÍDUO	$\sqrt{x + 0,5}$		x		
	\bar{x}	$s(\bar{x})$	\bar{x}	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}	
21	1,5163	0,2356	1,8	0,5	3,7
22	2,0025	0,2559	3,5	1,5	6,2
23	1,0684	0,1695	0,6	-	1,6
24	0,7588	0,0518	0,1	-	0,3
25	0,9336	0,1194	0,4	-	0,9
26	1,0684	0,1695	0,6	-	1,6
27	1,3552	0,2009	1,3	0,3	2,8
28	0,9786	0,1949	0,4	-	1,5
29	1,0038	0,1462	0,5	-	1,3
30	1,1952	0,2519	0,9	-	2,6
31	1,5526	0,2078	1,9	0,7	3,6
32	1,3000	0,2379	1,2	1,0	1,3
33	0,8462	0,0965	0,2	-	0,6
34	1,6892	0,1654	2,3	2,2	2,5
35	1,1040	0,1767	0,7	-	1,8
36	1,7327	0,2783	2,5	0,7	5,1
37	1,7063	0,2959	2,4	0,6	5,1
38	1,5238	0,1406	1,8	0,9	2,9
39	0,9948	0,1856	0,5	-	1,5
40	1,0750	0,1647	0,6	-	1,6

Tabela IX. Médias amostrais de metáfases, metáfases analisáveis, metáfases estouradas e de fios arrancados. Valores obtidos com os dados transformados ($\sqrt{x + 0,5}$) e reconvertidos (x).

A - SEXO FEMININO

VARIÁVEL	$\sqrt{x + 0,5}$		x		
	\bar{x}	$s(\bar{x})$	\bar{x}	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}	
Nº de fios arrancados	4,6547	0,2330	21,2	16,9	25,9
Nº total de metáfases	5,2036	0,4769	26,6	17,2	36,0
Nº de metáfases analisáveis	3,5820	0,3817	12,3	7,2	18,7
Nº de metáfases estouradas	1,4442	0,1563	1,6	0,7	2,6

B - SEXO MASCULINO

VARIÁVEL	$\sqrt{x + 0,5}$		x		
	\bar{x}	$s(\bar{x})$	\bar{x}	INTERVALO DE CONFIANÇA DE \bar{x}	
Nº de fios arrancados	5,2178	0,2924	26,7	20,7	33,5
Nº total de metáfases	5,1086	0,4008	25,6	17,7	34,9
Nº de metáfases analisáveis	3,8008	0,3082	14,0	9,4	19,3
Nº de metáfases estouradas	1,5615	0,1380	1,9	1,1	2,9

Tabela X. Comparação das médias amostrais masculina e feminina (valores transformados).

VARIÁVEL	SEXO MASCULINO		SEXO FEMININO		<i>t</i>	<i>P</i>
	\bar{x}	<i>s(x)</i>	\bar{x}	<i>s(x)</i>		
Nº de metáfases	5,1086	1,7925	5,2036	2,1327	0,152	>0,00
Nº de metáfases analisáveis	3,8008	1,3781	3,5820	1,7072	0,446	>0,60
Nº de fios de cabelos arrancados	5,2178	1,3077	4,6547	1,0422	1,506	>0,10

Tabela XI. Distribuição das frequências dos bulbos capilares segundo o número de metáfases por bulbo.

Nº DE METÁFASES	FREQUÊNCIA DE BULBOS		
	SEXO MASCULINO	SEXO FEMININO	TOTAL
0	68	69	137
1	28	28	56
2	20	17	37
3	19	15	34
4	8	12	20
5	17	12	29
6	12	14	26
7	7	8	15
8	6	7	13
9	5	2	7
10	1	7	8
11	2	4	6
12	3	1	4
13	2	0	2
14	1	2	3
15	1	0	1
16	0	1	1
17	0	0	0
18	0	1	1

Tabela XII. Distribuição da frequência de indivíduos segundo o número de bulbos ativos e inativos.

BULBOS		Nº DE INDIVÍDUOS
ATIVOS	INATIVOS	
0	10	1
1	9	1
2	8	2
3	7	1
4	6	2
5	5	5
6	4	5
7	3	7
8	2	5
9	1	6
10	0	5

Tabela XIII. Distribuição dos indivíduos de acordo com o rendimento da técnica.

SEXO FEMININO		SEXO MASCULINO	
INDIVÍDUO	RENDIMENTO (%)	INDIVÍDUO	RENDIMENTO (%)
1	56,86	21	35,94
2	50,00	22	66,13
3	28,57	23	39,13
4	61,29	24	50,00
5	49,40	25	62,50
6	50,00	26	47,37
7	80,00	27	58,62
8	51,28	28	61,54
9	54,54	29	53,85
10	46,43	30	78,95
11	42,86	31	62,16
12	55,55	32	50,00
13	30,30	33	60,00
14	9,76	34	63,41
15	71,43	35	37,04
16	48,68	36	64,00
17	16,67	37	65,31
18	16,67	38	47,62
19	0,0	39	40,00
20	47,92	40	56,25

Tabela XIV. Distribuição dos indivíduos segundo as classes de rendimento

CLASSES DE RENDIMENTO (%)	FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS
0 - 10	2
10 - 20	2
20 - 30	1
30 - 40	4
40 - 50	8
50 - 60	11
60 - 70	9
70 - 80	2
80 - 90	1

Figs.4 e 5 - Fotomicrografias de cromossomos metafásicos de um homem(4) e de uma mulher(5) normais e os respectivos cariogramas preparados a partir dessas metáfases.

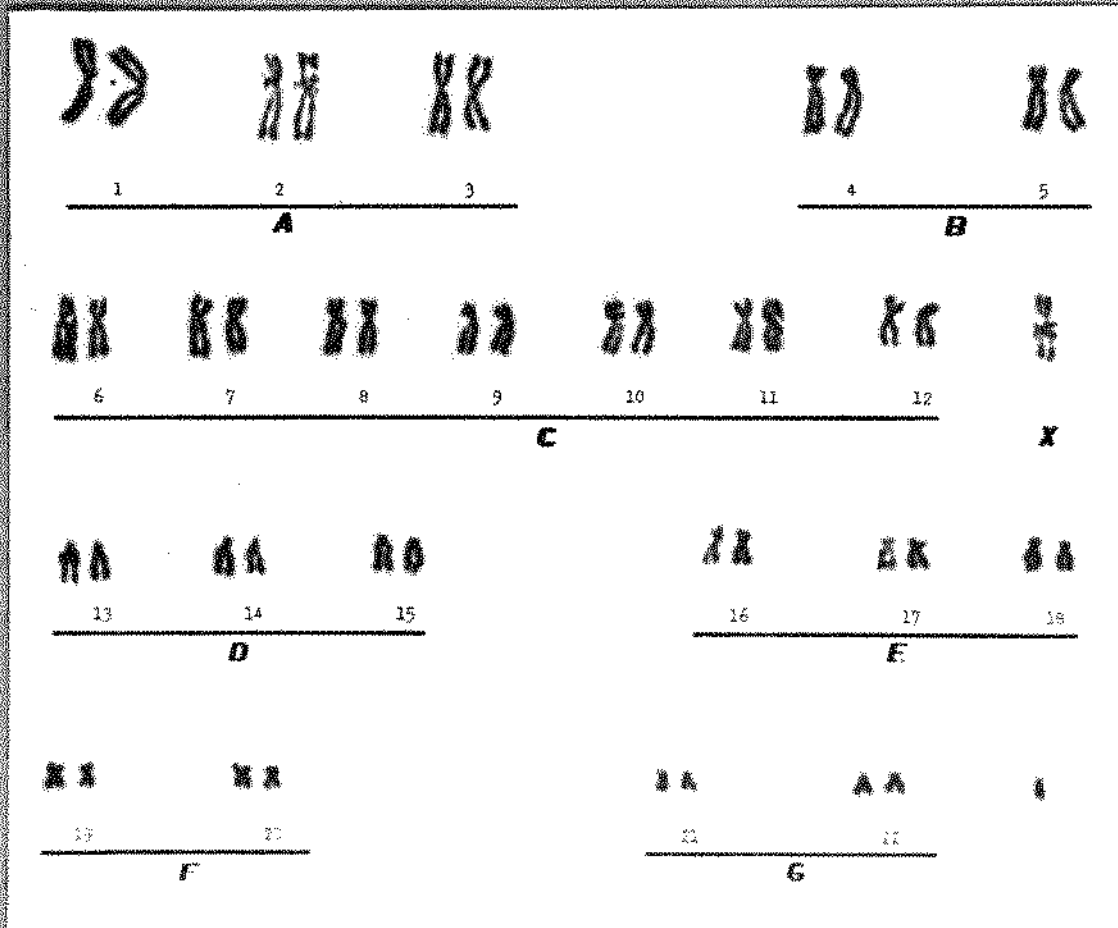
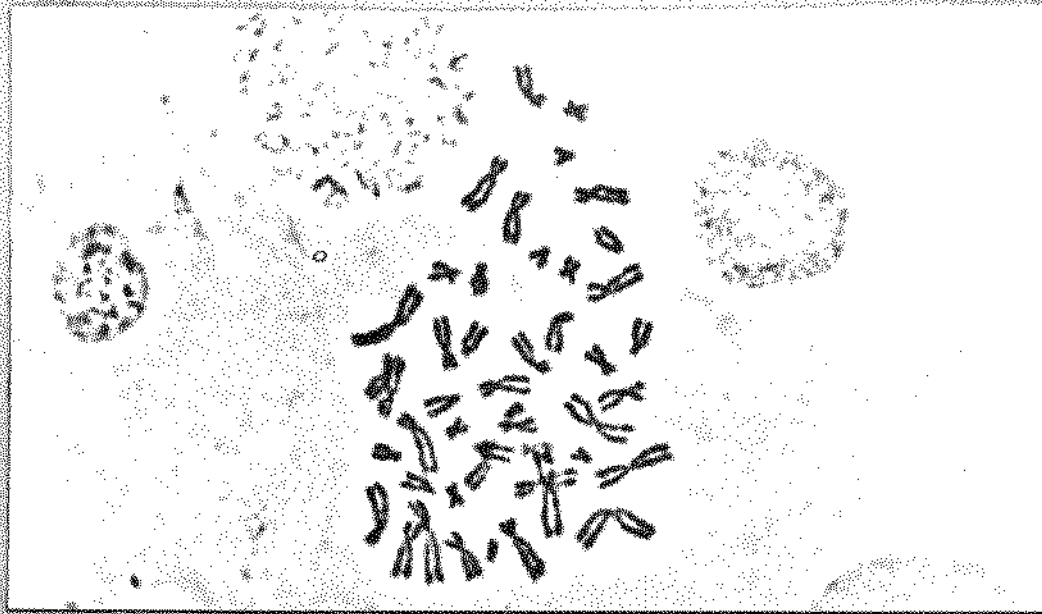


fig 4

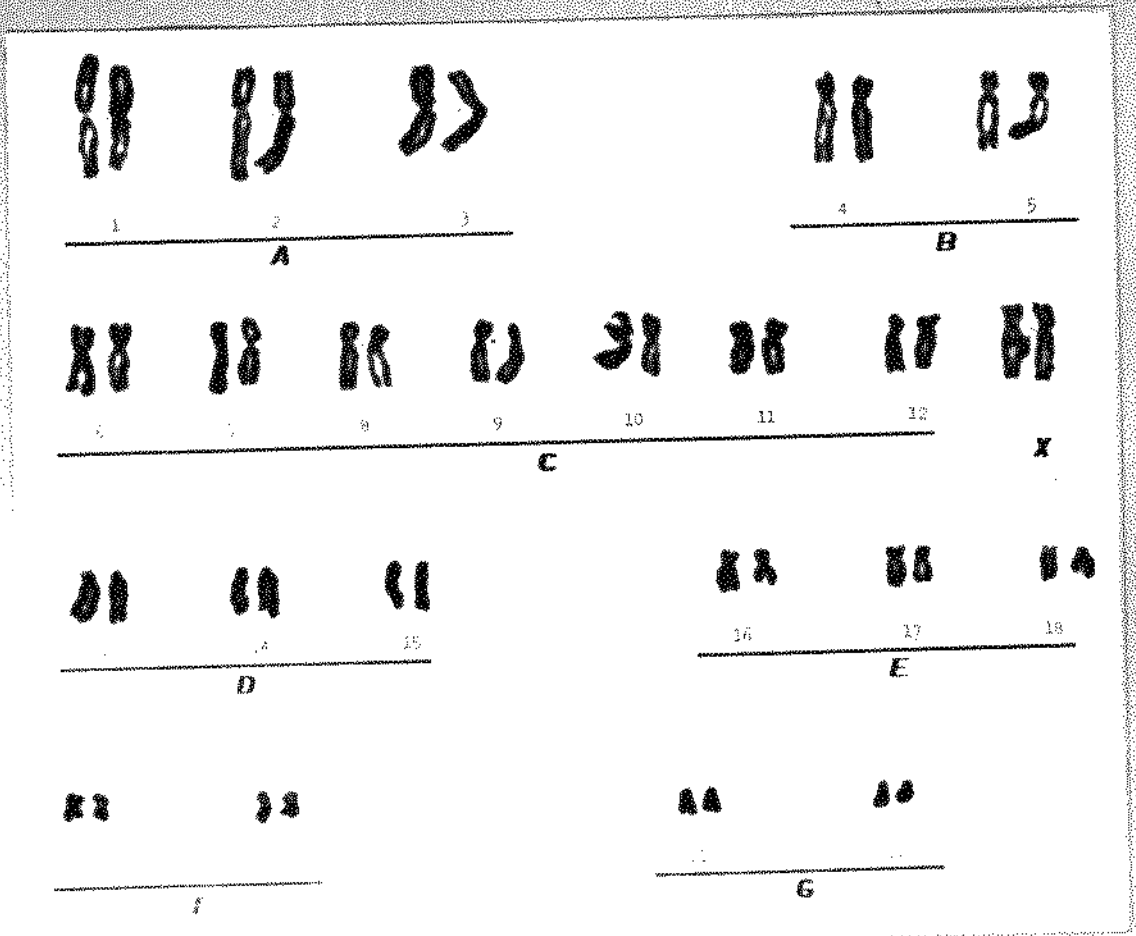


fig 5

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Analisando os dados expressos nas tabelas nº I, III, V e VII verifica-se que o número de metáfases por bulbo apresenta grande variabilidade intra-individual. Assim, por exemplo, em uma amostra de bulbos capilares de um único indivíduo podem ser encontrados valores desde zero até 18 metáfases (indivíduo nº 16, da tabela I). Aliás, a distribuição das frequências dos bulbos capilares segundo o número de metáfases, obtida a partir das tabelas I e III (tabela XI) confirma a sugestão de distribuição de Poisson, bem como justifica o tipo de transformação empregado para a análise dos dados.

A grande variabilidade intra-individual quanto à atividade mitótica observada nos bulbos capilares não é de surpreender pois, na espécie humana, cada folículo tem uma certa autonomia de crescimento (TROTTER, 1924), um ritmo individual (EBLING, 1965) e, conseqüentemente, o seu próprio ciclo (SAVILL & WARREN, 1964). Por outro lado, esses ciclos não são os mesmos em todas as regiões do corpo e parecem ser influenciados por diversos fatores tais como a saúde geral, o estado de nutrição e as condições do sistema endócrino do indivíduo (SAVILL & WARREN, 1964 ; ALEXANDER, 1965; ECKERT *et al.*, 1967; GRIFFITHS, 1973), de sorte que o mesmo folículo pode ter ciclos diferentes.

O cabelo tem ciclos mais longos do que os pelos de outras regiões do corpo, e o folículo que lhe dá origem não está em contínua atividade, mas alterna períodos de crescimento com períodos de repouso.

O primeiro estágio no ciclo de um cabelo é o de proliferação ou fase anagênica, durante a qual há grande

atividade mitótica do folículo. Essa fase é seguida pela fase catagênica, na qual deve ocorrer a parada da atividade mitótica, enquanto a matriz do bulbo se desliga da papila dérmica. Durante essa fase, o aparente crescimento do cabelo se faz à custa do envoltório de células epiteliais, que se estende até o nível das glândulas sebáceas, fazendo com que a haste caminhe em direção a superfície da epiderme. Na fase que se segue, a telogênica, o bulbo capilar se localiza mais superficialmente, ao nível dos músculos eretores do pelo, e o folículo descansa. Quando ocorre a formação de um outro cabelo, ele empurra para a superfície da epiderme o cabelo velho, o qual pode ser visto durante alguns dias, emergindo junto com a nova haste, antes de ser expulso (SAVILL & WARREN, 1964).

De acordo com van SCOTT *et al.* (1957), em amostras de cabelos arrancados, deve-se esperar que 15% dos bulbos estejam na fase telogênica. Entretanto, considerando os 400 bulbos examinados pelo autor no presente trabalho, verifica-se que 34,25% deles não mostraram atividade mitótica. Isso sugere, portanto, que a grande variação intra-individual encontrada, no concernente ao número de metáfases por bulbo capilar deva ser decorrente da presença de duas populações de bulbos, quanto à possibilidade de apresentar metáfases. Uma, cujos folículos estavam na fase anagênica, e outra, cujos folículos estavam na fase catagênica ou na fase telogênica. Infelizmente, apenas pelo exame do couro cabeludo, não existe um critério que permita o reconhecimento de cabelos pertencentes a folículos em fase anagênica.

No cabelo, a razão de crescimento varia principalmente com a idade do fio e de acordo com o seu comprimento característico. Cabelos mais longos são continuamente mais ativos, pois são de ciclo mais longo do que os cabelos curtos, como os fios que margeiam o couro cabelu

do (SAVILL & WARREN, 1964). Quando o cabelo atinge a superfície da pele, ele cresce cerca de dois centímetros por mês, mas esse crescimento se reduz, praticamente, à metade, quando o fio, mede aproximadamente, 25 centímetros de comprimento.

No presente trabalho o autor não teve a preocupação de escolher os cabelos a serem arrancados, mesmo sendo possível durante um certo tempo distinguir, pela extremidade pontiaguda da haste, os fios que emergiram recentemente (SAVILL & WARREN, 1964). É possível que, se durante a coleta, tivesse havido uma preferência pelos fios curtos que se situam nas regiões da cabeça, onde os ciclos de crescimento dos folículos são longos, um número maior de bulbos na fase anagênica e, portanto, com maior número de metáfases teria sido encontrado.

Os dados apresentados nas tabelas V a IX mostram que existe grande variação, quanto ao número de metáfases encontradas e quanto ao número de metáfases analisáveis, entre os indivíduos das amostras masculina e feminina. O número de fios arrancados para a obtenção de dez bulbos analisáveis também varia bastante, tanto nos indivíduos do sexo masculino quanto nos do sexo feminino.

Entretanto, pelos dados apresentados na tabela X, verifica-se que, apesar de a variabilidade das amostras masculina e feminina ser grande, as médias amostrais do número total de metáfases encontradas por indivíduo, do número total de metáfases analisáveis por indivíduo e do número de fios de cabelos arrancados por indivíduo não mostram diferenças significativas segundo o sexo.

Visto que na tabela XII é possível constatar que 70% dos indivíduos que constituíram a amostra apresentaram, pelo menos, 6 bulbos em atividade mitótica, a coleta de, pelo menos, 15 bulbos capilares de cada indivíduo levaria, teoricamente, à obtenção de 10 bulbos ativos em

70% dos casos.

Por outro lado, considerando a amostra como um todo, tem-se, com base nas tabelas XIII e XIV que o rendimento da técnica expresso em porcentagem de metáfases analisáveis tomadas em relação as metáfases encontradas, foi de 51,80%. A distribuição da amostra segundo classes de rendimento da técnica mostrou que 80% dos indivíduos se situam no intervalo de 30% a 70% de rendimento.

A técnica proposta pelo autor não oferece, evidentemente, o mesmo rendimento da cultura de linfócitos, no que se refere ao número total de metáfases analisáveis por operação de colheita de material. Apesar disso, ela apresenta proporção superior à obtida pelo cultivo de linfócitos, quanto ao número de metáfases analisáveis, **tomadas em relação ao número total de metáfases encontradas**. De fato, ao examinar 30 células em metáfase, obtidas por cultura de linfócitos, de cada elemento de uma amostra constituída por 20 indivíduos do sexo masculino e 20 do sexo feminino, o autor teve a oportunidade de constatar que o rendimento médio, calculado com base no mesmo critério, foi de 31,58%.

De qualquer modo, porém, parece pertinente assinalar que a técnica do autor permite, pela primeira vez, a análise de cariótipos a partir de células de origem ectodérmica. Tal inovação permite vislumbrar a utilização dessa técnica não apenas para a complementação das informações fornecidas pela cultura de linfócitos, mas a resolver algumas questões de importância prática.

Assim, por exemplo, os estudos citogenéticos para a investigação de mosaicismos são feitos a partir das informações obtidas da cultura de linfócitos, de material de medula e de fibroblastos da pele.

Entretanto, a frequência das diferentes linhagens celulares, bem como a extensão do mosaicismos, no que

concerne à origem embriológica dos tecidos atingidos, deve estar na dependência da época da embriogênese, durante a qual ocorreu o aparecimento da linhagem com número cromossômico diferente daquele do zigoto (VALENCIA *et al.*, 1963). Por outro lado, as proporções entre as estirpes celulares presentes nos indivíduos podem variar em um mesmo tecido (LINDSTEN *et al.*, 1962; CHAUDHURI & CHAUDHURI, 1965), e em tecidos diferentes (LINDSTEN *et al.*, 1962; CHAUDHURI & CHAUDHURI, 1965; ROSTI, 1968; SMITH, 1970; HAMERTON, 1971).

Além disso, a frequência dessas células, pode sofrer modificação, em decorrência de multiplicação diferencial, de sorte que, em tecidos diferentes ou em um mesmo tecido, em épocas distintas, essas frequências se alteram. Em alguns casos, a frequência da linhagem anormal pode diminuir (TAYLOR, 1968; TAYSI *et al.*, 1970; GROSSE *et al.*, 1971) enquanto em outros essa frequência pode aumentar (TAYLOR, 1968; TAYSI *et al.*, 1970; GROSSE *et al.*, 1971) ou permanecer inalterada (TAYLOR, 1968; FRACCARO, 1969; PETIT & GALLET, 1969). Assim, na literatura pertinente, existem situações nas quais as células anormais chegam a não serem mais detectadas em culturas de linfócitos (LA MARCHE *et al.*, 1967; NEU *et al.*, 1969) e de fibroblastos da pele (PORTER *et al.*, 1969) após algum tempo. Do exposto, parece fácil concluir que o estudo dos indivíduos mosaicos nem sempre constitui uma tarefa simples. É difícil estabelecer, com base apenas nas informações obtidas de células de tecidos de origem mesodérmica, como é o caso das culturas de linfócitos e de pele, qual a linhagem celular que predomina no indivíduo (LINDSTEN *et al.*, 1962; LEJEUNE, 1964; CHU & CHUNG, 1966; FINLEY *et al.*, 1966; SHIPE *et al.*, 1968; GROSSE *et al.*, 1971). Parece óbvio, também, que se nos basearmos apenas nos resultados obtidos em cultura de linfócitos, as

possibilidades de detecção de mosaicismos ficariam bastante diminuídas (HAYASHI, 1963).

A frequência das linhagens celulares presentes em um mosaico pode variar *in vitro* durante o tempo de cultura (LINDSTEN *et al.*, 1962; ROSECRANS, 1968). Em culturas de fibroblastos de pele pode ocorrer, em determinados casos, um aumento das células cromossomicamente anormais (TAYSI *et al.*, 1970) enquanto que, em outros, a frequência dessas células pode sofrer uma diminuição (BOOK *et al.*, 1962; PATAU, 1964; CHANG *et al.*, 1969).

Dessa forma, uma técnica que possibilita estudos citogenéticos em um tecido de origem embriológica diferente de sangue e pele, pela utilização de células que *in vivo* já estavam em divisão ou prestes a iniciá-la, e que não envolve períodos longos de incubação, parece ser de aplicação prática importante, principalmente no estudo de mosaicos.

Além disso, as observações feitas em embriões humanos mostraram que o folículo piloso começa a se organizar por volta da oitava semana de gestação, a partir de brotamentos compactos da epiderme de revestimento os quais crescem para dentro da derme subjacente originando a matriz germinativa e a bainha radicular epitelial (MULLER, 1971; CARLSEN, 1974). Portanto, se admitirmos a existência de um período crítico na embriogênese para que a linhagem cromossomicamente anormal se estabeleça (FINLEY *et al.*, 1966; BENDA, 1969), a fase na qual se deve iniciar a organização dos folículos estaria situada dentro desse período do desenvolvimento embrionário, durante o qual, segundo BENDA (1969) a ocorrência de aberrações cromossômicas traz consequências aos processos de diferenciação e desenvolvimento do embrião.

Em vista do exposto, a maior aplicação que o autor vislumbra, no momento, para a sua técnica é a investi

gação da constituição cromossômica das células dos bulbos capilares de pacientes com síndrome de Down e com mosaicismo 46,(XX ou XY)/47,(XX ou XY)+21, e de tais mosaicos que são clinicamente normais. Isso porque, dada a origem ectodérmica, tanto do sistema nervoso central, quanto do material dos bulbos capilares examinados é possível que, nos mosaicos com síndrome de Down, o cariótipo obtido a partir de células dos bulbos capilares seja 47,(XX ou XY)+21 e nos normais ele seja 46,(XX ou XY).

Caso essa hipótese seja confirmada, poder-se-á, ao nível de berçário, fazer-se o prognóstico dos mosaicos mencionados.

V. SUMÁRIO

Neste trabalho o autor descreveu uma técnica que possibilita, pela primeira vez, a utilização de células de origem ectodérmica do bulbo capilar para a análise do cariótipo humano.

O rendimento médio dessa técnica aplicada a uma amostra de quarenta indivíduos foi de 51,80%.

A técnica padronizada é rápida (3 horas e meia), de execução relativamente fácil e poderá ser empregada na pesquisa de mosaicismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, S.- Diffuse alopecia in women. *Trans.St.Johns Hosp.Dermatol.Soc.*, 51: 99, 1965.
- BEIGUELMAN, B.- *Genética Médica: Citogenética Humana*. São Paulo, EDART, 1974.
- BENDA, C.E.- *Down's Syndrome: mongolism and it's management*. New York, Grune & Stratton, 1969. pp.121-133.
- BOOK, J.A.; MASTERSON, J.G. & SANTESSON, B.- Malformation syndrome associated with triploidy-further chromosome studies of the patient and his family. *Acta Genet. Stat.Med.*, 12: 193, 1962.
- BOTTURA, C. & FERRARI, I.- A simplified method for the study of chromosome in man. *Nature*, 186: 904, 1960.
- CARLSEN, R.A.- Human fetal hair follicles: the mesenchymal component. *J.Invest.Dermatol.*, 63: 206, 1974.
- CHANG, T.D.; NIEWCZAS-LATE, V. & UCHIDA, I.A.- Selection for trissomic cells in a mosaic fibroblast culture. *Cytogenetics*, 8: 410, 1969.
- CHAUDHURI, A. & CHAUDHURI, K.C.- Chromosome mosaicism in an Indian child with Down's syndrome. *J.Med.Genet.*, 2: 131, 1965.
- CHU, C.N. & CHUNG, L.Y.- Chromosomal mosaicism and Down's syndrome. *Chinese Med.J.*, 85: 337, 1966.

- DAKER, M.G.- Chromosomes from hairs. *Lancet*, *I*, 1174, 1970.
- EBLING, F.J.- *apud* SAITOH, M.; UZUKA, M.; SAKAMOTO, M.-
Human hair cycle. *J.Invest.Dermatol.*, 54: 65, 1970.
- ECKERT, J.; CHURCH, R.E.; EBLING, F.J. & MUNRO, D.S.- Hair
loss in women. *Br.J.Dermatol.*, 79: 543, 1967.
- FERGUSON-SMITH, M.A.- *Proc.Int.Cong.Human Genet.*, Paris,
1971. *Excerpta Medica, Int.Cong.Series*, 195, 1972.
- FINLEY, W.H.; FINLEY, S.C.; ROSECRANS, C.J. & TUCKER, C.C.-
Normal/21-trisomy mosaicism. *Am.J.Dis.Child.*, 112:
444, 1966.
- FORD, C.E. & HAMERTON, J.L.- A colchicine, hypotonic
citrate, squash sequence for mammalian chromosomes.
Stain.Technol., 31: 247, 1956.
- FORD, C.E.; JACOBS, P.A. & LAJTHA, L.G.- Human somatic
chromosomes. *Nature*, 181: 1565, 1958.
- FRACCARO, M.; LINDSTEN, J.; MANNINI, A.; SCAPPATICCI, S. &
TIEPOLO, L.- Stability of abnormal karyotype in cell
culture. *Hereditas*, 62: 105, 1969.
- GRIFFITHS, W.A.D.- Diffuse hair loss and oral contraceptives.
Brit.J.Dermatol., 88: 31, 1973.
- GROSSE, K.P.; GORSSE, G.; SCHWANITZ, G. & ROTT, H.D.-
Mosaikmongolismus. *Z.Kinderheilkd*, 110: 293, 1971.
- HAMERTON, J.L.- *Human Citogenetics*, New York, Academic Press,
1971. pp.290-309.

- HARNDEN, D.G. & BRUNTON, S.- The skin culture technique. In: *Human Chromosome Methodology*, New York, J.J. Yunis ed., Academic Press, 1965.
- HAYASHI, T.- Karyotype analysis of 83 cases of Down's syndrome in Harris County, Texas. *Tex.Rep.Biol.Med.*, 21: 28, 1963.
- HAYFLICK, L.- The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp.cell.Res.*, 37: 614, 1965.
- HAYFLICK, L. & MOOREHEAD, P.S.- The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.cell.Res.*, 25: 585, 1961.
- HEITZ, E.- Die nucleal-Quetschmethode. *Ber.d.bot.Ges.*, 53: 870, 1936. *apud*: EGOZCUE, J. In: *Técnicas em Citogenética*, Barcelona-Editorial Espaxs, 1971.
- HSU, T.C.- Mammalian chromosomes *in vitro*. The karyotype of man. *J.Hered.*, 43: 167, 1952.
- HUNGERFORD, D.A. & DI BERNARDINO, M.- Cytological effects of prefixation treatment. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 4: 391, 1958.
- KOLLER, P.C.- A new technique for mitosis in tumours. *Nature*, 149: 193, 1942.
- KOTLER, S. & LUBS, H.A.- Comparison of Direct and short term tissue culture techniques in determining solid tumor karyotypes. *Cancer Res.*, 27: 1861, 1967.
- LEJEUNE, J.- The 21 trisomy. Current stage of chromosomal

- research. *Prog.Med.Genet.*, 3: 144, 1964.
- LINDSTEN, J.; ALVIN, A.; GUSTAVSON, K.H. & FRACCARO, M.- Chromosomal mosaic in a girl with some features of mongolism. *Cytogenetics*, 1: 20, 1962.
- LA MARCHE, P.H.; HEISLER, A.B. & KRONEMER, N.S., 1967 *apud* FORD, C.E.- Mosaic and chimaeras. *Br.Med.Bull.*, 25: 104, 1969.
- LUBS, H.A. & CLARK, R.- The chromosome complement of human solid tumors. *New Engl.J.Med.*, 268: 907, 1963.
- MAKINO, S. & NISHIMURA, I.- Water pre-treatment squash technique. *Stain Technol.*, 27: 1, 1951.
- MODREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M. & HUNGERFORD, D.A.- Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. cell.Res.*, 20: 613, 1960.
- MULLER, S.A.- Hair neogenesis. *J.Invest.Derm.*, 56: 1, 1971.
- NEU, R.L.; BARGMAN, G.J. & GARDNER, L.I.- Disappearing abnormal cell line in mosaicism. *Pediatrics*, 43: 623, 1969.
- NOWELL, P.C.- Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 20: 462, 1960.
- OHNUKI, Y.- Demonstration of the spiral structure of human chromosomes. *Nature*, 208: 916, 1965.

- PAINTER, T.S.- *Science*, 53: 503, 1921. *apud* FORD, E.H.R.-
Human Chromosomes, Londres, Academic Press, 1973. pp.5.
- PAINTER, T.S., 1923. *apud* FORD, E.H.R.- *Human chromosomes*,
Londres, Academic Press, 1973. pp.5.
- PATAU, K., 1964. *apud* PORTER, I.H.; BROWN, C.D.; GERGOSIAN,
L.A. & PAUL, B.A.- Evidence of selection in mosaicism.
J.Med.Genet., 6: 310, 1969.
- PETIT, P. & GALLEZ, A.- Étude clinique et cytogénétique
longitudinale d'un cas de mosaïque 46,XX/47,XX,+G
(mosaïque de trisomie 21). *Helv.Paediatr.Acta*, 24:
582, 1969.
- PISANI, F.J.C.- Preparação rápida de cariogramas a partir
de células de bulbo piloso. *Resumos da XXII Reunião
Anual da S.B.P.C.*, 1970. pp. 107.
- PORTER, I.H.; BROWN, C.D.; GERGOSIAN, L.A. & PAUL, B.A.-
Evidence of selection in mosaicism. *J.Med.Genet.*, 6:
310, 1969.
- RIGAS, D. & OSGOOD, E.E.- Purification and properties of
the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J.Biol.
Chem.*, 212: 607, 1955.
- ROSECRANS, C.J.- The relationship of normal/21-trisomy
mosaicism and intellectual development. *Am.J.Ment.
Defic.*, 72: 562, 1968.
- ROSTI, D.- Un caso di mosaicismo 21 in soggetto con al cuni
caratteri mongoloidi e varie malformazioni. *Atti.Accad.
Med.Lomb.*, 23: 309, 1968.

- ROTHFELS, K.H. & SIMINDVITCH, L.- An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain.Technol.*, 33: 73, 1958.
- SACHS, L.- Polyploid evolution and mammalian chromosomes. *Heredity*, 6: 357, 1953.
- SÁEZ, F.A., 1948 *apud* DE ROBERTIS, E.J.P., NOWINSKI, W.W. & SÁEZ, F.A.- *Citologia General*, Buenos Aires, Libreria "El Ateneo" Editorial, 1955.
- SAVILL, A. & WARREN, N.C.- *The Hair and scalp*, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1934. pp.10-22.
- SHARMA, A.K. & SHARMA, A.- Study of cancer chromosomes. In: *Chromosomes Techniques*, Washington, Butterworths, 1965.
- SHIPE, D.; REISMAN, L.E.; CHUNG, C.Y.; DARNELL, A. & KELLY, S.- The relationship between cytogenetic constitution, physical stigmata and intelligence in Down's syndrome. *Amer.J.Ment.Defic.*, 72: 789, 1968.
- SMITH, G.F.- Analysis of clinical features of Down's syndrome in relation to chromosomal changes. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, 171: 587, 1970.
- SPERLING, K.- Cytogenetic studies from the hair-root. *Lancet*, I, 753, 1971.
- TAYLOR, A.I.- Cell selection *in vivo* in normal/G trisomic mosaics. *Nature*, 219: 1028, 1968.
- TAYSI, K.; KOHN, G. & MELLMAN, W.J.- Mosaic mongolism.II. Cytogenetic studies. *J.Pediatr.*, 76: 880, 1970.

TJIO, J.H. & LEVAN, A.- The chromosome number of man.
Hereditas, 42: 1, 1956.

TJIO, J.H. & PUCK, T.T.- Genetics of somatic mammalian hair cells.II-Chromosome constitution of cells in tissue culture. *J.Exp.Med.*, 108: 259, 1958.

TJIO, J.H. & WHANG, J.- Chromosome preparations of bone marrow cells without prior *in vitro* culture or *in vivo* colchicine administration. *Stain Technol.*, 37: 17, 1962.

TROTTER, M., 1924 *apud* SAITOH, M.; UZUKA, M. & SAKAMOTO, M.
Human hair cycle. *J.Invest.Dermatol.*, 54: 65, 1970.

VALENCIA, J.I.; DE LOZZIO, C.B. & DE CORIAT, L.F.- Heterosomic mosaicism in mongoloid child. *Lancet*, II: 488, 1963.

van SCOTT, E.J.; REINERTSON, R.P. & STEINMULLER, R.R.- The growing hair roots of the human scalps and morphologic changes therein following amethopterin therapy.
J.Invest.Dermatol., 29: 197, 1957.

von WINIWARTER, H., 1912 *apud* FORD, E.H.R.- *Human Chromosomes*, Londres, Academic Press, 1973. pp.5.