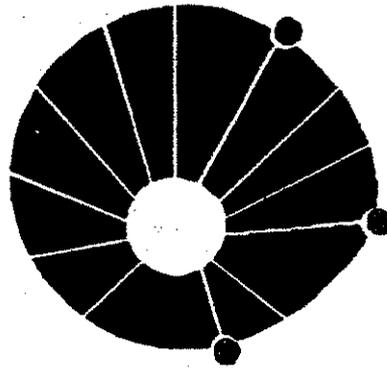


---

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**UNICAMP**

**Sérgio Duz**  
Cirurgião-Dentista

**A DETERMINAÇÃO DO SEXO ATRAVÉS DA  
CROMATINA SEXUAL NA POLPA DENTÁRIA  
E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Legal e Deontologia.

**PIRACICABA - SP**  
**- 2000 -**

---



218.0002

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**UNICAMP**

**Sérgio Duz**  
Cirurgião-Dentista

**A DETERMINAÇÃO DO SEXO ATRAVÉS DA  
CROMATINA SEXUAL NA POLPA DENTÁRIA  
E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL**

**ORIENTADORA : Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano**  
**BANCA EXAMINADORA: Prof. Dr. Eduardo Daruge**  
**Prof. Dr. Roberto José Gonçalves**  
**Profa. Dra. Gláucia M.B. Ambrosano**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
CPG, 35/05/2000

  
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do grau  
de Mestre em Odontologia Legal  
e Deontologia.

**PIRACICABA - SP**  
**- 2000 -**

UNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
T/UNICAMP  
D958d  
V. 4  
TOMOS RE. 41466  
PREG. 278/00  
S  D   
PREÇO 2511,00  
DATA 11-07-00  
N.º CPD

CM-00142724-3

### Ficha Catalográfica

D958d Duz, Sérgio.  
A determinação do sexo através da cromatina sexual na polpa dentária e sua importância pericial. / Sérgio Duz. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.  
161p. : il.

Orientadora : Profª Drª Gláucia Maria Bovi Ambrosano.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Diferenciação dos Sexos. 2. Homem – Identificação. 3. Cromatina. 4. Polpa dentária. I. Ambrosano, Gláucia Maria Bovi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2000, considerou o candidato SERGIO DUZ aprovado.

1. Profa. Dra. GLAUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

Handwritten signature of Gláucia Maria Bovi Ambrosano in black ink.

2. Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

Handwritten signature of Roberto José Gonçalves in black ink.

3. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

Handwritten signature of Eduardo Daruge in black ink.

*Dedico este trabalho*

*A minha mãe Ermelinda (in memoriam), que  
com doçura e sabedoria ensinou-me a lutar pelos meus  
ideais.*

*Ao meu pai Valentim, pelo exemplo constante  
de que a conduta humana deve sempre buscar a  
plenitude da capacidade que Deus deu ao homem.*

*A minha esposa Pámar, sempre presente em todos os momentos de minha vida.*

*Aos meus filhos Allan e Lana, pela solidariedade.*

*Ao digno Mestre*

*Prof. Dr. Eduardo Daruge*

*A luz de sua sabedoria iluminou o meu  
 caminho e guiou-me com segurança pelos caminhos da  
 ciência.*

*Sua dedicação à pesquisa científica será sempre  
 um marco na Odontologia Legal.*

*A demonstração de sua amizade sincera faz as  
 pessoas sentirem-se verdadeiros irmãos.*

*Minha eterna gratidão.*

# AGRADECIMENTOS

# *Agradecimentos*

*A Deus,*

*Fonte Suprema da Bondade e da Justiça, é o manancial onde bebemos as forças que carecemos para o desenvolvimento das nossas faculdades intelectuais e morais.*

*A*

*Profa. Dra.*

*Gláucia Maria Bovi Ambrosano*

*Sua orientação, precisa e competente, foi o guia  
que amenizou os percalços desta laboriosa caminhada.*

*Seu inestimável apoio, fundamental para que  
este trabalho pudesse ser concluído, torna-me eternamente  
grato.*

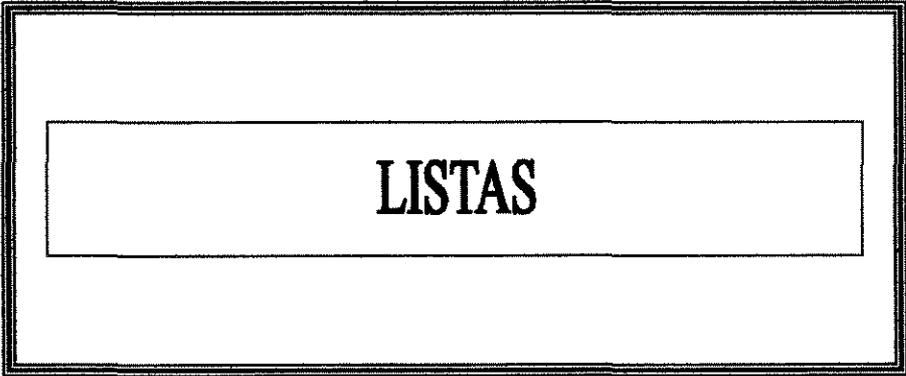
## AGRADECIMENTOS

- ❖ À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. Wilson Antonio Sallum e Diretor associado, Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.
- ❖ A Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury, Coordenadora Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.
- ❖ À amiga Profa. Dra. Heloisa Amélia de Lima Castro, pelo incentivo e preciosa colaboração.
- ❖ Ao amigo Prof. Dr. Roberto José Gonçalves, Professor Titular da FOP, Unicamp, pela amizade e estímulo.
- ❖ Ao amigo Prof. Dr. Eduardo Daruge Jr., pelo carinho e pelos muitos préstimos a mim ofertados.
- ❖ Aos Professores do Curso de Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia, pela confiança e apoio a mim dispensados.
- ❖ Às Bibliotecárias Sueli Duarte Oliveira Soliani e Eloisa Ceccoti, pela presteza e orientação.
- ❖ Aos grandes amigos, Luiz Francesquini Júnior e Célia Regina Manesco, pela constante demonstração de companheirismo.
- ❖ Aos colegas Fernando Celso Moraes Antunes e José Josefran Berto Freire, pela fraternal amizade.

- ❖ Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia pelas horas de conforto e pela amizade a mim demonstrada,
- ❖ À querida amiga Dinoly Albuquerque Lima, meu especial agradecimento por ter sido premiado com sua preciosa amizade e pelos inúmeros momentos de convívio.
- ❖ Aos funcionários desta Faculdade, que em várias oportunidades dispensaram-me valiosa atenção.
  - João Batista Leite de Campos
  - Paulo do Amaral
  - Pedro Sérgio Justino
  - Paulo Roberto Rizzo do Amaral
- ❖ Ao meu cunhado Wilibaldo Amaru Maximiano, amigo e colaborador, pela solidariedade e presteza.
- ❖ Aos pacientes que, anonimamente, num gesto de desprendimento, amizade e sobretudo confiança, doaram o material, permitindo assim, a realização deste trabalho.
- ❖ À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelo incentivo e a confiança depositada em nosso trabalho.
- ❖ Ao colega Nobel de Almeida Jr., à minha equipe de trabalho, e à Márcia Valéria da Silva, pela insubstituível ajuda.
- ❖ Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTAS</b>	<b>21</b>
<b>TABELAS E FIGURAS</b>	<b>23</b>
<b>RESUMO</b>	<b>25</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>33</b>
<b>REVISTA DA LITERATURA</b>	<b>45</b>
<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>95</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>99</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>119</b>
<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>149</b>



**LISTAS**

## **LISTAS**

### **I – FIGURAS E TABELAS**

<b>NÚMERO</b>	<b>ASSUNTO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 01</b>	Dente retirado do frasco	<b>103</b>
<b>Figura 02</b>	Abertura de sulco longitudinal	<b>105</b>
<b>Figura 03</b>	Cinzel adaptado em morsa	<b>107</b>
<b>Figura 04</b>	Retirada de polpa dentária	<b>109</b>
<b>Figura 05</b>	Célula feminina com cromatina sexual	<b>115</b>
<b>Tabela 01</b>	Tabela de freqüência (sexo masculino)	<b>121</b>
<b>Tabela 02</b>	Tabela de freqüência (sexo feminino)	<b>122</b>
<b>Tabela 03</b>	Tabela de freqüência ( em classes ) do sexo masculino	<b>123</b>
<b>Tabela 04</b>	Tabela de freqüência ( em classes ) do sexo feminino	<b>124</b>

**RESUMO**

# **A DETERMINAÇÃO DO SEXO ATRAVÉS DA CROMATINA SEXUAL DA POLPA DENTÁRIA E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL**

Autor: SERGIO DUZ

Orientadora: Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

## **RESUMO**

Desde 1949, quando BARR e BERTRAM descobriram incidentalmente, ao examinarem os neurônios de gatos, que havia um grânulo heteropicnótico, cujos estudos posteriores levaram à descoberta de que o cromocentro era peculiar ao núcleo neural das fêmeas, vários estudos foram desenvolvidos para investigar a presença da cromatina sexual em outros animais e no homem.

Esta descoberta tem sido de inegável importância para a clínica e a prática médica. Assim considerada, sua contribuição à Odontologia Legal não poderia ser menosprezada, visto que a identificação sexual é um tópico relevante para essa Ciência.

O escopo da presente pesquisa foi o de procurar determinar, através de exames histológicos da polpa dentária em dentes íntegros e hígidos, de pacientes jovens com idade entre 10 e 30 anos de idade, a existência de uma diferenciação quantitativa e qualitativa significativa de

cromatina sexual em pessoas de ambos os sexos, de tal modo que fosse possível determinar o sexo pelo exame desse material.

As pessoas das quais foram colhidas as polpas dentárias eram clinicamente saudáveis e, aparentemente, sem qualquer evidência para desvio sexual.

Assim, foram examinadas 50 polpas dentárias de pessoas do sexo masculino e 50 polpas dentárias oriundas de pessoas do sexo feminino, retiradas de pré-molares e terceiros molares que, por indicação ortodôntica, foram submetidos à extração.

Os cortes histológicos dessas polpas dentárias, depois de fixados, foram corados pela hematoxilina férrica de HENDENHAIN. Um número de 100 células foi contado em cada preparo, determinando-se a presença de fibroblastos que continham ou não a presença de cromatina sexual.

Os resultados encontrados permitiram concluir que é possível a determinação do sexo em seres humanos, através da frequência da incidência da cromatina sexual pelo exame microscópico de fibroblastos da polpa dentária, tornando-se mais um dado pericial a ser adicionado aos procedimentos de identificação do indivíduo.

**ABSTRACT**

# **SEX DETERMINATION THROUGH SEX CHROMATIN IN TEETH PULP CELLS AND YOUR PERICIAL IMPORTANCE**

Author: SERGIO DUZ

Adviser: Profa. DRA. GLÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

## **ABSTRACT**

In 1949, BARR and BERTRAM accidentally discovered the presence of heteropycnotic granules in neurones of cats. Further studies revealed that chromocenter was peculiar to the neural nucleus of females. Since then, several studies were made to investigate the presence of sex chromatin in other animals and in human beings.

Such findings have been of utmost importance to medical practice. The contribution of such investigations to Forensic Odontology should not be underestimated, given the relevance of sex identification to this Science.

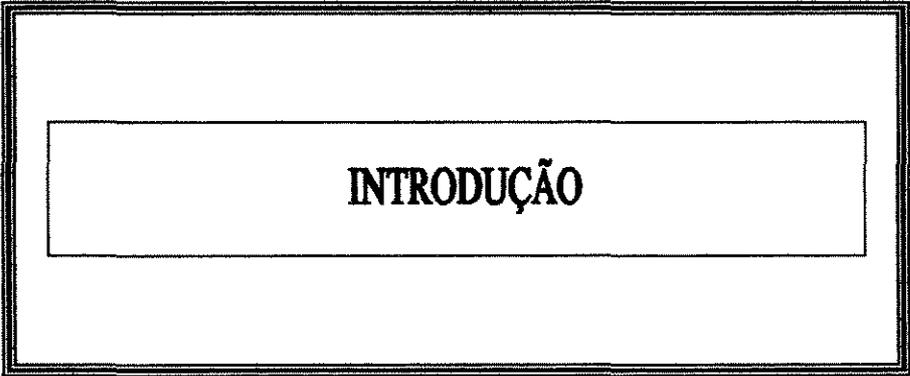
The present study had the scope of determining the existence of significant qualitative and quantitative differentiation in the sex chromatin in a sample of white male and female subjects. The ultimate objective was to determine sex through analysis of that material.

Histological tests were performed in the dental pulp of 50 male subjects and 50 female subjects, of ages between 10 and 30. The subjects in this sample were in good medical condition, without any visible sign of sexual abnormality. The teeth from which the pulp was extracted were in perfect condition. The pulp was extracted from premolars and third molars removed after orthodontic evaluation.

Histological samples of the pulps, after fixation, were stained with HERDENHAIN'S ferric hematoxylin. One hundred cells were counted in each slide. In these cells the presence or absence of sex chromatin in fibroblasts was determined.

Results allow the conclusion that human sex determination is possible when the incidence of sex chromatin in fibroblasts of dental pulp is analyzed in the microscope.

**Key words: Sex identification, Sex chromatin, dental pulp**



**INTRODUÇÃO**

## **INTRODUÇÃO**

Quando GLEITER, citado por BARR, (1966), demonstrou em 1937, a propriedade de heteropicnose dos cromossomos X, em células somáticas de insetos, descortinava-se um novo e vasto campo de pesquisa que só adquiriu sua verdadeira posição de destaque quando BARR, em 1949, realizou estudos com neurônios de gatos, que o levaram a descobrir a cromatina sexual.

Tal descoberta viria satisfazer não somente uma antiga curiosidade sobre o diagnóstico pré-natal mas, também, oferecer solução a diversos problemas de identificação sexual.

BESSAS & MICHALAS relataram que os primeiros métodos para diagnóstico pré-natal do sexo estavam descritos no papiro médico de Kahoum, no papiro de Carlsberg e no grande papiro do museu de Berlim. Escritos há 4.500 anos, esses métodos foram transmitidos aos gregos e Hipócrates mencionou alguns, baseados na cultura de grãos de diferentes cereais com urina de mulheres grávidas, sendo o sexo do embrião determinado a partir da espécie do cereal que ali germinasse.

Nessa última metade do século XX, houve considerável avanço no estudo das células somáticas, graças ao poder de resolução dos microscópios eletrônicos, assim como ao desenvolvimento de uma variedade de técnicas de preparação e preservação de amostras que viabilizaram um maior entendimento do dimorfismo sexual.

A cromatina sexual tem sido objeto de amplas pesquisas sob diversos pontos de vista. Tendo sido demonstrado, inicialmente, que este corpúsculo ocorria só nas fêmeas de animais (BARR & BERTRAM, 1949; GRAHAM, 1954; PRINCE et al., 1955), os pesquisadores buscaram confirmar essa descoberta em humanos (MOORE & BARR, 1955; BARR, 1959; GRIGNASCHI, 1960), e, a partir daí, as pesquisas buscaram estudar a cromatina sexual sob os mais diversos aspectos, tais como a análise do líquido amniótico para diagnóstico pré-natal do sexo (BESSAS & MICHALAS, 1968; SIEBERS, 1975; QUEZADA et al., 1976;), variação da incidência (LEVIJ & CAREL, 1981; 1968; DOLAN, 1968; ROEDE, 1977; GARZA-CHAPA et al., 1977; Yen et al.), métodos de identificação da cromatina sexual (BLANCO DE DEL CAMPO & RAMIREZ, 1965; ARAGONES & ECOZCUE, 1973;

BLANCO & MACAGNO, 1984;), a freqüência da cromatina sexual nas diferentes amostragens (DULANTO, 1970), métodos de coloração (PANSENGRAU & PETERSON, 1964; NAGAMORI, 1986), avaliação das diferenças de porcentagens encontradas pelos diferentes autores (LASO et al., 1966; LOCKHART, 1966), entre muitos outros.

Tais estudos têm contribuído com detalhadas informações para a Odontologia e para a Medicina Legal, mormente quando são sumários os materiais de restos humanos para identificação.

A determinação sexual é, para INTRONA et al. (1998), um dos maiores desafios para antropologia forense, dentro do contexto da medicina legal.

A determinação do sexo é mais confiável se o esqueleto disponível para análise está completo, mas, como pode ocorrer em casos forenses, muitas vezes os restos de esqueletos humanos estão incompletos ou avariados, dependendo de suas condições de sepultamento, avarias causadas pela atividade de algum animal, circunstâncias de preservação ou cobertura do corpo.

É conhecido o importante papel da determinação sexual em uma perícia, e o dente, dada a sua preservação mais prolongada que outras partes do corpo humano, é um elemento de vital importância quando são limitadas as amostras a serem investigadas.

Para o legista, nenhum material pode ser desprezado ou considerado insignificante, pois todos os elementos encontrados numa cena de crime contém informações que fornecem subsídios imprescindíveis ao desenvolvimento do seu trabalho, como observou NAGAMORI (1989).

A Odontologia Legal tem demonstrado sua valiosa participação na identificação de corpos que, principalmente em acidentes com aeronaves, ficam extremamente mutilados.

Em muitos casos, a identificação dental é o primeiro, quando não o único, recurso disponível, e a literatura científica tem demonstrado a sua importância nas mais diversas circunstâncias.

CLARK (1986), relatando os problemas de identificação no acidente aéreo em Abu Dhabi, em 1983, em que morreram 112 pessoas, descreveu que metade das identificações foram obtidas

pelos dentes, ainda que representasse 6,24% do número total de vítimas.

Identificar é determinar o conjunto de caracteres que individualizam uma pessoa, tornando-a distinta das demais, (OLIVEIRA, 1997) e os seres humanos demonstram, desde os mais remotos tempos, a sua preocupação com a questão da identificação.

GALVÃO (1996), fez um esboço histórico desse enfoque e salientou a importância dos relevantes serviços prestados pela Odontologia Legal ao Poder Judiciário, enfatizando a necessidade da presença do Odontologista em todo Instituto Médico Legal.

O caminho de perspectivas mais amplas para a Odontologia, sobretudo nos domínios da tanatoscopia forense, foi aberto pelo Cônsul do Paraguai, na França, Dr. ALBERT HANS, citado por LEITE (1962), quando aconselhou que se consultassem os dentistas das vítimas do grande incêndio do Bazar da Caridade, em Paris, na data de 4 de maio de 1897. Através de métodos puramente odontológicos, DAVENPORT, GODON, BRAULT, DUCOURNEAU, e outros profissionais ilustres, também citados

por LEITE (1962), demonstraram a sua alta capacitação na identificação de cadáveres carbonizados, o que foi sumamente importante, tanto do ponto de vista legal, quanto do ponto de vista psicológico, para os parentes das vítimas.

PUEYO, em 1994, apresentou uma tabela de casuística citada na literatura por vários autores, relativa a dezoito acidentes aéreos, com um total de 1.893 vítimas, no período de 1963 a 1985, em que 553 identificações foram efetuadas somente com a ajuda da Odontologia Legal e, 177 identificações efetuadas com a ajuda da Odontologia Legal e outras técnicas periciais. Seu objetivo foi o de mostrar a aplicação dos conhecimentos odontológicos com a finalidade de resolver numerosos problemas jurídicos.

“A identificação dos indivíduos é imprescindível em todas as circunstâncias que ocorrem nas relações humanas, seja no âmbito civil, seja no âmbito criminal, e pode ser realizada no vivo, no cadáver e no esqueleto” (ARBENZ, 1959).

De acordo com GOMES (1997), destina-se a identificar a raça, o sexo, a idade, a altura, o peso, os sinais individuais que incluem as malformações e as cicatrizes, os sinais profissionais e as tatuagens.

Trilhando um longo caminho para ser reconhecida como uma especialidade odontológica independente, a Odontologia Legal tem, na atualidade, autonomia científica.

O processo de identificação odonto-legal, em que se busca determinar a identidade de uma pessoa, tem um valor indiscutível.

Quando o legista tem diante de si, um ser que ainda não teve o sexo determinado pela perícia, dado o limite imposto pelo estado do corpo, ou a precariedade do material a ser examinado, a determinação do sexo é uma etapa importante, pois, como se trabalham com apenas duas variáveis, é possível reduzir o campo de pesquisa numa considerável proporção.

Evidentemente, a determinação do sexo é uma tarefa rotineira, extremamente simples, quando o exame é feito num ser normal, vivo ou morto recentemente.

As primeiras dificuldades para determinar o sexo começam a surgir quando o cadáver já se encontra em putrefação, com destruição da genitália externa, mutilações ou estados intersexuais.

Mesmo com essas restrições, é possível, contudo, constatar a existência de útero, ovários ou próstata, e ainda pesquisar a existência ou não do corpúsculo de BARR e, desse modo, determinar corretamente o sexo.

As dificuldades aumentam, nesse aspecto, quando o corpo está reduzido a um esqueleto, e ainda assim, graças aos incessantes estudos de medidas corpóreas desenvolvidos pela Antropometria, é possível estabelecer diferenças características segundo o sexo.

A situação torna-se ainda mais complexa, quando os materiais disponíveis para uma perícia resumem-se a fragmentos ósseos e dentes, ou corpos carbonizados.

É nesse crucial momento que a Odontologia disponibiliza recursos exclusivos de sua área, pois que os dentes são importantes elementos para determinação de vários aspectos periciais, não sendo poucos os casos em que a identificação só se tornou possível pelo exame da arcada dentária.

Considerando-se a duração quase que infinita dos dentes, por serem extremamente resistentes às ações mecânicas,

térmicas, químicas e físicas, verifica-se a relevante contribuição que a Odontologia Legal pode oferecer às perícias.

Estando a polpa dentária protegida por esse arcabouço mineral, esta representa o último reduto a sofrer interferências desses fatores externos, preservando, assim, informações periciais de vital importância que ainda não foram totalmente decodificadas pela ciência moderna.

A partir dos estudos de BARR e colaboradores, pode-se observar a existência de cromatina sexual nos núcleos das células e assim determinar-se o sexo genético.

Unindo-se esses dois elementos, cromatina sexual e polpa dentária, evidencia-se a importância de se pesquisar a determinação do sexo através da cromatina sexual na polpa dentária.

A propositura do trabalho da presente pesquisa foi embasada na importância da determinação do sexo em qualquer processo de identificação e, principalmente, no processo de identificação em situações de disponibilidade precária de materiais para perícia, situações estas que enfatizam a importância dos

elementos dentários, pois que, em muitas situações, são eles os únicos recursos disponíveis para fornecerem dados conclusivos.

Conseqüentemente, é através da Odontologia Legal que se buscam elementos periciais, destacando-se assim, de forma inequívoca, a sua inestimável participação científica e pericial no processo de determinação sexual.

**REVISTA DA LITERATURA**

## **REVISTA DA LITERATURA**

BARR & BERTRAM, em 1949, observaram que o núcleo das células nervosas de fêmeas de gato continha um proeminente nucléolo, inexistente no macho, que apresentava intensa coloração com tinturas básicas, tais como violeta de Cresyl e tionina. A diferença observada na estrutura nuclear entre neurônios do gato adulto macho e da fêmea estava no grau de desenvolvimento de um segundo corpúsculo, que era bem menor que o nucléolo. O corpúsculo posterior era mais ou menos intimamente associado com o nucléolo, também colorido com tinturas básicas. Assim, os autores o designaram como “satélite nucleolar”. As células nervosas de gatas fêmeas o continham, em regra, imediatamente adjacente ao nucléolo e, embora o normal fosse apenas um único satélite, também podiam ser encontrados dois desses corpúsculos. O satélite era visto em aproximadamente 30 a 40% das células, sendo invisível quando eclipsado pelo nucléolo. Em regra, as células nervosas do gato macho continham um satélite nucleolar pouco desenvolvido, visto com baixa

freqüência, e que, quando visível, estava adjacente ao nucléolo. A diferença morfológica entre neurônios de gatos machos e fêmeas adultas era claramente detectada em cortes do cérebro, cordão espinhal e gânglios simpáticos, de tal modo que era possível separar dois grupos sem conhecimento prévio do sexo, simplesmente por este caráter morfológico que os distinguia. Observaram que o cromossomo nuclear era freqüentemente o cromossomo sexual e que poderia ser derivado de sua heterocromatina. Relataram uma diferença sexual similar em humanos através da análise dos gânglios simpáticos e alertaram para uma possível distinção nuclear, de acordo com o sexo, em função da composição entre cromossomos X e Y. Os autores concluíram que era possível diferenciar o sexo de uma célula somática sem equipamento mais elaborado do que um microscópio, combinado com a coloração de tecidos pelo rotineiro método de Nissil.

GRAHAM, em 1954, estudando 39 embriões de gatos, em vários estágios de desenvolvimento, observou que o sexo do embrião podia ser identificado pelo núcleo das células da

membrana embrionária, independentemente desses embriões apresentarem características sexuais no sistema reprodutivo. A autora concluiu que a diferenciação sexual podia ser identificada desde a fase embrionária, porque os embriões, cujos núcleos continham cromatina sexual, eram visivelmente de gatas fêmeas, e os embriões nos quais a cromatina sexual era imperceptível, eram masculinos. Desse modo, considerou que, se a diferença sexual estivesse presente no embrião, seria impossível que a cromatina sexual, a nível morfológico, fosse influenciada por hormônios sexuais.

PRINCE *et al.*, em 1955, realizaram um estudo comparativo do núcleo intermitótico em primatas machos e fêmeas, da espécie *Macacus rhesus*. Observaram a incidência de 76% da cromatina sexual nas células nervosas das macacas fêmeas, com variadas localizações de um neurônio para outro. Em algumas regiões estava na membrana nuclear e, em outras, como nos nervos faciais, estava adjacente ao nucléolo, sendo demonstrável na maior parte dos tecidos e órgãos dos primatas. Nos machos encontraram uma incidência de 10% de núcleos que continham partículas

semelhantes à cromatina derivada de cromossomos sexuais ou de um autossomo original. Todavia, somente um pequeno número de núcleos celulares masculinos continham a massa cromatínica com características semelhantes à cromatina sexual do núcleo feminino. Consideraram, também, que a cromatina sexual encontrada era mais granulosa e abundante no primata em comparação com o gato. Concluíram que a cromatina sexual podia ser identificada em 80% dos núcleos celulares femininos, geralmente adjacente à membrana nuclear, com exceção do epitélio transitório da bexiga. As medidas da cromatina sexual variavam de um tipo de célula para outra, sendo maiores nas células de cartilagem ( $1.04 \times 1.3\mu$ ), e menores nas células da mucosa gástrica ( $0.7 \times 1.04\mu$ ) e em músculos lisos ( $0.8 \times 0.9\mu$ ).

HUNT & GLEISER, em 1955, relataram suas observações de que, apesar da notória dificuldade em se determinar o sexo de crianças pré-adolescentes, a partir dos exames de restos ósseos, esse método tornava-se mais produtivo quando se examinava a pequena diferença que existia na calcificação dentária que ocorria entre meninos e meninas. Fizeram, também, a

observação de que esses exames eram impraticáveis nos ossos da mão, como um determinador do sexo da criança, por serem pequenos e quebradiços. Por outro lado, ao método de exame dos dentes podiam ser adicionadas descobertas relatadas em atlas radiográficos do joelho. Assim, concluíram que, se fosse conhecido o sexo do esqueleto era possível determinar a idade da criança pré-adolescente, a partir do exame da calcificação dentária.

MOORE & BARR, em 1955, analisando o esfregaço da mucosa oral de 140 pessoas (81 homens e 59 mulheres), cujas amostras foram coradas com cresyl violeta, observaram claramente a cromatina sexual no núcleo das células epiteliais femininas. Ao mesmo tempo, notaram que a massa de cromatina não era visível nas células masculinas. Sugeriram que este método, pela vantagem da facilidade de sua execução, era uma alternativa a ser usada em substituição às biópsias de pele realizadas para detectar o cromossomo sexual em anomalias congênicas de desenvolvimento sexual. Segundo suas experiências, os testes com biópsia de pele eram confiáveis se as seções fossem de boa qualidade técnica e, algumas vezes, era difícil obter seções que mostrassem um correto

detalhe do núcleo. Observaram que era mais fácil reconhecer a cromatina sexual quando localizada periféricamente, tendo sido identificada, nesta localização, em 40 a 60% dos núcleos das células femininas, e uma massa cromatínica similar não foi observada nas células das amostras masculinas. Nessa experiência, o sexo foi corretamente diagnosticado em 100% dos casos, pelos dois examinadores. Desse modo, acreditaram que o cromossomo sexual podia ser diagnosticado pelo esfregaço de mucosa oral, com uma pequena margem de erro.

BARR, em 1959, afirmou que já estava definitivamente estabelecido que havia duas formas distintas na estrutura do núcleo intermitótico do homem e de outros mamíferos, evidenciadas pela presença da cromatina sexual na mulher, e pela ausência no homem, possivelmente relacionadas ao complexo cromossômico sexual XX das mulheres e XY dos homens. A existência de anomalias sexuais fenotípicas levou o autor a pesquisar o relacionamento existente entre estes casos e o sexo nuclear. Preliminarmente, estabeleceu que, para indivíduos normais havia correlação entre a presença de cromatina sexual e cromossomos

sexuais XX, ou a ausência de cromatina sexual com cromossomos sexuais XY.

GRIGNASCHI *et al.*, em 1960, planejaram seu trabalho com a finalidade de determinar a quantidade mínima de elementos celulares que se devia observar e tabular para obter porcentagens que fossem a expressão da realidade, que não conduzissem a erro, e também o critério a ser empregado para o reconhecimento da cromatina sexual. Coletaram 4 amostras de sangue de um grupo de 40 seres humanos (20 de cada sexo), 4 preparados de raspagem da mucosa bucal (2 do lado direito e 2 do lado esquerdo) e 1 biópsia de pele do lado ântero-externo da coxa. Os autores concluíram que a cromatina sexual não necessitava de procedimentos e nem de corantes especiais, sendo que qualquer corante nuclear podia ser empregado com êxito para o seu reconhecimento. Acerca dos critérios para o reconhecimento da cromatina sexual, optaram, por ser mais seguro, considerar apenas os corpúsculos marginais localizados sobre a membrana, no contorno nuclear, considerando o núcleo como disco, e não como esfera. Consideraram que, desse modo, as cifras de cromatina sexual seriam inferiores às obtidas por

alguns observadores, mas teriam um critério referencial seguro, com resultados altamente satisfatórios. Sobre a quantidade de núcleos, a partir da qual se estabilizaria a porcentagem do corpúsculo de Barr, não encontraram diferenças significativas entre a contagem de 1000 e de 400 núcleos, tendo sido possível concentrar-se a contagem a 100 núcleos para preparados em cujas células abundasse a exteriorização da cromatina sexual. O estudo comparativo de cada um dos diferentes materiais demonstrou que há correspondência entre eles para determinar o sexo, com um índice de 100% de segurança na determinação do sexo em pessoas normais. Consideraram, também, que a taxa mínima de 4% de corpúsculos de Barr, em 400 núcleos, para diagnosticar o sexo feminino, era um valor correto, porque nenhum indivíduo deste grupo tinha apresentado freqüência inferior a esta. Quanto à observação de porcentagens, ainda que mínimas, de cromatina sexual no lote de amostras masculinas, os autores consideraram que não poderiam omitir esses achados, visto que não havia maneira de determinar, morfológicamente, se seria uma formação cromatínica inespecífica que simularia o corpúsculo de Barr.

BEREMBAUM, em 1960, examinando ratos e camundongos, concluiu que o sexo desses roedores podia ser determinado pela localização periférica de corpos de cromatina sexual, tendo encontrado uma incidência de 30 a 52% para fêmeas, e abaixo de 2% para machos. O autor considerou que, na contagem, apenas as células que mostravam cromatina sexual suficientemente dispersa tornavam possível uma observação do corpúsculo de cromatina sexual, tendo desprezado as células em que a cromatina sexual não podia ser identificada com confiança. Isso ocorreu quando os núcleos estavam danificados ou sobrepostos, inclinados ou dobrados de tal forma, que não fora possível identificar, com precisão, um corpo de cromatina. O autor concluiu que o sexo de camundongos e ratos podia ser determinado pela incidência da localização periférica do corpúsculo de cromatina.

JACOBS *et al.*, em 1960, estudaram as anormalidades envolvendo o cromossomo X nas mulheres, e presumiram que a existência de células com corpúsculos duplos de cromatina sexual podia estar associada com a amenorréia. Eles usaram o método do esfregaço da mucosa bucal para determinação de anomalias

cromatínicas encontradas nessas células, comparando o relato com os casos clínicos em estudo. Estudaram a proporção de células que apresentavam mais de uma cromatina sexual. Em um dos casos examinados encontraram um único corpúsculo em 52% das células, enquanto que, em 37% dessas células foram encontrados dois corpúsculos. No segundo caso examinado, em três ocasiões diferentes da vida do paciente, dentre 500 células estudadas, somente em 36 células foram encontrados corpúsculos de cromatina sexual, demonstrando assim, com seus estudos, a validade do uso de cromatina sexual para avaliação do quadro clínico genético anormal.

LYON, em 1961, relatou que Ohno e Hauschka, interpretaram o cromossomo heteropicnótico de células de carcinoma de mamas e células diplóides normais do ovário como um cromossomo X, sugerindo que a cromatina sexual era composta de apenas um cromossomo X heteropicnótico. Baseando-se nesses relatos, a autora sugeriu que o cromossomo X heteropicnótico era geneticamente inativo e que poderia ter origem materna ou paterna, em diferentes células do mesmo animal. A cromatina sexual seria

formada por um cromossomo X, e um cromossomo X ativo seria necessário ao desenvolvimento normal, incluindo o sexual.

SMITH *et al.*, em 1962, estudaram a incidência da cromatina sexual nas amostras bucais de recém-nascidos do sexo feminino e de mães entre 24 horas antes do momento do parto. Notaram a baixa incidência da massa da cromatina sexual durante o primeiro ou segundo dia de vida pós-natal, se comparada com as idades posteriores, e o mesmo fenômeno foi observado em mães durante o dia anterior ao parto e 1 a 2 dias após, o que lhes permitiu concluir que estes resultados podiam conduzir a uma interpretação errônea, quando este teste fosse usado para diagnóstico nos recém-nascidos. Os autores aventaram a possibilidade de que a frequência mais baixa nas meninas recém-nascidas poderia ser induzida por medicação recebida pela mãe ou pelo bebê. Como ocorria o mesmo fenômeno de uma incidência mais baixa em mães durante o dia anterior ao parto, e 1 a 2 dias após, sugeriram que poderia ocorrer uma etiologia comum para este efeito em ambos: mãe e recém-nascido. Contudo, esta correlação não foi objeto do estudo dos autores.

TAYLOR, em 1963, observou que meninas recém-nascidas mostravam uma baixa incidência de cromatina sexual em amostras de descamações bucais, durante os primeiros dias de vida, principalmente nos dois primeiros dias, continuando abaixo dos níveis de adultos até os nove dias após o nascimento, tendo sido, ainda, encontrados bebês que não apresentaram nenhuma cromatina sexual. Embora um dos bebês apresentasse síndrome testicular de feminização, os outros, posteriormente, apresentaram desenvolvimento normal. A autora desconhecia a razão dessa baixa incidência em meninas recém-nascidas, mas presumiu que isso ocorria em decorrência da alteração metabólica existente nesse período, como, por exemplo, a elevação do estrógeno. Foi observado que 50 natimortas e 1 natimorto apresentavam uma forte incidência de cromatina sexual, tanto quanto mulheres normais adultas. A autora sugeriu estudos adicionais sobre as mudanças metabólicas com as adaptações dos recém-nascidos, possivelmente relacionadas com os altos níveis de estrógeno nesta fase.

PANSEGRAU & PETERSON, em 1964, estudaram métodos de coloração em 75 amostras bucais de diferentes homens

e mulheres, encontrando 100% de correlação dos resultados dos testes para cromatina sexual com o fenótipo sexual, com uma taxa de 97,6% das células femininas e 9% das células masculinas contendo um corpúsculo de cromatina. A menor incidência de cromatina sexual em amostras femininas foi de 92% em uma amostra, enquanto que a mais alta incidência nas amostras masculinas foi de 14% em uma amostra. Os autores concluíram que a proporção de cromatina periférica para a cromatina central devia ser considerada como uma variação adicional para a exatidão da determinação genética do sexo, especialmente em mulheres, pois em todos os casos havia um número maior de cromatina sexual periférica do que central, e havia um número maior de cromatina sexual central do que periférica em todos os homens. Encontraram um número maior de cromatina central em todos os homens e relacionaram essa presença a grumos de cromatina e não como sendo realmente cromatina sexual. Analisando as possibilidades de interpretação acerca da natureza da cromatina sexual em amostras de indivíduos masculinos, os autores observaram que a incidência de 11,7% de 2 cromatinas em células femininas, aproximava-se da incidência de 9% de uma cromatina em células de amostras

masculinas Concluíram, também, que é extremamente simples o teste para a cromatina sexual, sendo satisfatório para a seleção de um grande número de pessoas.

BLANCO DE DEL CAMPO & RAMIREZ, em 1965, estudaram as variações da freqüência da cromatina sexual durante o ciclo menstrual, coletando esfregaço bucal de 17 mulheres entre 24 e 38 anos de idade, durante um ou mais ciclos menstruais. Foram observadas variações no número das massas de cromatina sexual em três fases distintas, sendo encontrados os seguintes resultados nas elevações: 9,2% no 1<sup>a</sup> dia do ciclo menstrual, 16% no meio do ciclo e 12% na última metade do ciclo. O meio do ciclo foi considerado mais ou menos 14 ou 13 dias antes do próximo ciclo e a última metade foi determinada aplicando a fórmula:  $28 : D : 5 : X$ , onde:

28 = dias em um ciclo menstrual padrão;

D = duração atual do ciclo menstrual da voluntária;

5 = dia do meio no ciclo menstrual padrão

X = dia do meio no ciclo menstrual da voluntária.

A porcentagem mais alta foi encontrada no 12° dia após a menstruação, com uma ocorrência média de 17% de cromatina sexual. Os autores descartaram a possibilidade de haver um fator extra-genético como indutor da presença do corpúsculo de Barr, e consideraram que técnicas inadequadas são responsáveis pelas discrepâncias entre sexo genético e sexo anatômico. Preferiram usar o termo “corpúsculo de Barr” para designar a cromatina sexual, devido à controvérsia existente sobre a localização exata do satélite nucleolar. Pelos resultados encontrados, relacionaram a evidência dos corpúsculos de Barr a um fator não genético, e isto era compatível com as discrepâncias encontradas entre esfregaços bucais, sangue e outros resultados, como os comparativos em casos de malignidade. Quanto à incidência de proporções de células em que encontraram o corpúsculo de Barr, detectaram valores acima do padrão, encontrados pelos autores na literatura, de 20% para o sexo genético feminino, exceto nas contagens no meio do ciclo menstrual. Concluíram que as variações da frequência da cromatina sexual, ao longo dos ciclos menstruais de mulheres normais, sugeriam que fatores extra-genéticos estariam envolvidos na determinação de sexo genético em células somáticas, e

recomendaram que se realizassem exames consecutivos de esfregaço bucal para determinar o verdadeiro sexo genético.

LASO *et al.*, em 1966, através de amostras de sangue para determinar o grupo sangüíneo, e de amostras de raspagem da mucosa bucal, coletados de 213 jovens universitárias e 560 recrutas militares, buscaram avaliar as diferenças das porcentagens de cromatina sexual encontradas por diferentes autores. Comprovaram que não havia qualquer relação entre um determinado grupo sangüíneo com a maior ou menor positividade cromatínica.

LOCKHART, em 1966, inicialmente estudou grupos de mulheres, de várias idades, para determinar seus próprios valores normais de positividade da cromatina sexual, pois a série de valores normais de positividade variava dependendo do tecido usado, da técnica de coloração e do método de contagem. Um grupo de 26 jovens na pré-puberdade apresentou de 22 a 68% de suas amostras com uma massa de cromatina periférica. Outro grupo, formado por 30 mulheres adultas, saudáveis, em idade reprodutiva, sem medicações, apresentou uma taxa de 60 a 87% de positividade. O terceiro grupo, formado por 40 homens de várias idades, mostrou

uma positividade abaixo de 7%. Após determinar esses valores, a autora iniciou seus estudos com 3 casos de síndrome adrenogenital em mulheres, tendo encontrado uma massa cromatínica periférica em somente 20 a 40% das células de amostras bucais. Como a literatura apresentava valores discrepantes com os valores encontrados, a autora realizou estudos sobre a cromatina sexual para avaliar a influência de fatores extra-genéticos na incidência da cromatina sexual. Analisando relatos sobre a influência da hidrocortisona, do ciclo menstrual, do estrógeno e da terapia com prednisona, na incidência da cromatina sexual, a autora resolveu estudar 10 mulheres grávidas, tendo notado que havia um aumento de positividade na incidência da cromatina sexual da 4<sup>a</sup>. até a 5<sup>a</sup>. semana antes do nascimento do bebê, seguido de um declínio no mês seguinte e retornando aos níveis mais altos na época do nascimento. Notou que os altos níveis de estrógeno, durante a gravidez, coincidiam com a queda da positividade da cromatina sexual X no último mês de gestação.

CECI & SARNELLA, em 1966, examinaram 5 mulheres, para verificar a variação na incidência da cromatina

sexual durante o ciclo menstrual visando estabelecer uma comparação com dois pólos antagônicos verificados na literatura presente: um que sustentava que ocorria uma elevação na contagem da cromatina sexual durante o período pré-ovulatório e pré-menstrual, e outro, oposto, que negava qualquer variação percentual da cromatina de Barr durante o ciclo menstrual. A experiência foi realizada no período ovulatório do ciclo menstrual, e os autores concluíram que não ocorria variação significativa da presença da cromatina de Barr.

KEYNES, em 1967, relatou estudos realizados para determinação do sexo sob a ótica da agricultura e pecuária, visto ser um assunto economicamente importante e cientificamente interessante, tendo em vista ser de grande utilidade a seleção sexual para criadores de gado de corte ou gado leiteiro. O autor sugeriu a possibilidade de se remover os primeiros embriões da mãe e determinar o sexo sem danificá-los, recolocando no útero somente os embriões do sexo desejado. A determinação do sexo seria realizada pela observação da presença ou não do corpúsculo de Barr, que deveria estar presente somente nas células femininas.

LEVIJ & CAREL, em 1968, testaram a variação da incidência da cromatina sexual sob a análise de dois fatores: a variação no tamanho do satélite nucleolar, e a inclusão ótica causada pelo poder limitado de resolução da luz microscópica. Escolheram amostras bucais de 20 enfermeiras, com idade abaixo de 23 anos, durante o ciclo menstrual, pois os relatos demonstravam variações na incidência de cromatina sexual periférica nas amostras bucais neste período. Foram contadas 100 células em cada amostra e puderam observar a ausência ou a presença da cromatina sexual periférica. No período do 1° ao 7° dia do ciclo menstrual, foi observada uma freqüência de 46% a 68%, no período do 8° ao 10° dia, uma freqüência de 51% a 76% e, no último período, do 11° ao 28° dia, a freqüência foi de 46% a 67% por amostra. Concluíram que as partículas de cromatina estariam sempre ligadas à membrana nuclear; que a incidência de cromatina sexual periférica no epitélio oral mostrava-se diferente em vários estágios do ciclo menstrual; que havia diferenças concomitantes em tamanho nuclear e, que existia uma relação altamente significativa entre esse tamanho e a contagem da cromatina sexual. Desse modo, uma baixa contagem de cromatina sexual, em fêmeas, não

justificava a conclusão de que tivessem ocorridas mudanças no cariótipo.

DOLAN, em 1968, realizou um estudo com o objetivo de determinar se a flutuação hormonal que ocorre durante o ciclo menstrual tinha qualquer efeito sobre a incidência da cromatina sexual. O autor estudou amostras bucais colhidas da mucosa da bochecha de 102 mulheres fenotipicamente normais, com idade variando de 18 a 65 anos. As amostras foram obtidas no segundo dia do ciclo menstrual, duas semanas antes do ciclo seguinte e uma semana antes do próximo ciclo, durante três ciclos menstruais. Como grupo de controle, foram coletadas amostras de 8 mulheres com 2 anos de menopausa e de 7 mulheres em pré-menopausa. O autor concluiu que esse estudo demonstrava que as condições fisiológicas pré-menopausa tinham um efeito definido nos valores da cromatina sexual e que ocorria uma incidência variada durante a menstruação, mas que a identificação dos fatores específicos que a teriam influenciado necessitavam de maiores investigações.

BESSAS & MICHALAS, em 1968, desenvolveram uma técnica para diagnóstico pré-natal do sexo, revelando a cromatina

sexual nos núcleos das células descamadas do líquido amniótico retirado durante a segunda metade da gestação. A pesquisa foi efetuada com 75 gestantes, através de 28 punções por via abdominal, e 47 punções por via vaginal. Os autores relataram que 5 punções foram desprezadas pelo insucesso na coleta de material e, dos 70 casos examinados, o diagnóstico foi correto em 60 deles, sendo o erro de diagnóstico, em 4 casos, atribuído à contaminação do líquido amniótico pelas células da mãe, e, à citólise, nos outros 6 casos. Os autores não encontraram cromatina sexual em 10 casos e haviam previsto um indivíduo do sexo masculino, o que foi confirmado após o nascimento do bebê.

CURTIS, em 1969, investigou a freqüência da cromatina sexual em mulheres normais para obter resultados que servissem de controle para trabalhos posteriores. Coletou amostras de esfregaço bucal de 20 mulheres clinicamente normais, entre 18 e 20 anos de idade e, um ano mais tarde, usou um grupo menor de 5 mulheres similares, tendo usado, nas duas ocasiões, o mesmo método de contagem. Estabeleceu como medida de controle, para mulheres normais, uma média de 40,8% de cromatina sexual, com uma

variação de 38,3% a 43,4%, pois este valor permaneceu consistente nas duas contagens.

CASPERSSON *et al.*, em 1970, estudaram a coloração fluorescente em regiões de cromossomos humanos heteropicnóticos em núcleos durante a interfase, observando que uma parte fortemente fluorescente da cromatina Y era constante na interfase como um corpúsculo fluorescente heteropicnótico. Este fenômeno foi considerado uma boa ajuda na determinação do sexo genético dos núcleos em repouso. Os autores sugeriram que uma determinação precisa do sexo poderia ser obtida através de uma combinação com a análise do corpúsculo de Barr, porque outros cromossomos produziam regularmente corpúsculos similares na interfase, que podiam ser confundidos com a cromatina Y.

DULANTO, em 1970, estudando a distribuição das freqüências da cromatina sexual em diferentes regiões do corpo feminino providas de pêlos, não encontrou diferenças significativas entre as freqüências da cromatina sexual em bulbos pilosos de três regiões do corpo humano: cabeça, axila direita e púbis. O mesmo

resultado foi observado quanto à freqüência da cromatina sexual no sedimento urinário e salivar.

TOWNSEND *et al.*, em 1970, realizaram um estudo destinado a determinar a relação entre as contagens de cromatina sexual e as mudanças dos níveis do estrógeno, progesterona e gonadotropina, durante o ciclo menstrual e a gravidez. Os autores coletaram amostras da mucosa bucal de 44 mulheres grávidas e registraram os resultados da contagem da cromatina sexual do primeiro, segundo e terceiro trimestre. As contagens positivas de cromatina sexual nas células femininas ficaram entre 20% e 80%, enquanto que as masculinas ficaram entre 0% e 5%. Do ponto de vista dos autores, o aparecimento de estruturas semelhantes aos corpos de cromatina sexual em células masculinas, poderia ocorrer em função de material nuclear agregado, de tal modo, que simularia o aparecimento visto nas células femininas. A análise da variação entre os grupos de cada trimestre demonstrou uma contagem decrescente de cromatina sexual na gravidez, associada à elevação dos níveis de estrógeno.

WYANDT & HECHT, em 1971, observaram, em fibroblastos de pele humana, que o corpúsculo de cromatina X apresentava fluorescência com quinacrina, embora menos intensamente que o corpúsculo Y. A amostra de um indivíduo XXYY, colorida com quinacrina, apresentou dois corpúsculos Y fluorescentes e um corpo maior, menos fluorescente. Após a recoloração pelo método de Faelgen, observaram que o corpúsculo maior correspondia à cromatina sexual X. A amostra de um segundo indivíduo XXY, apresentou apenas um corpo Y intensamente fluorescente e uma cromatina sexual X menos fluorescente, também confirmada pelo método de Faelgen, localizada freqüentemente na membrana nuclear e, aparentemente, numa posição mais central. Os autores não encontraram o mesmo resultado em células femininas e, concluíram que, através de técnicas apropriadas, era possível exibir, pela fluoromicroscopia, os corpúsculos X e Y e que, presumivelmente, só um X, mais fluorescente na interfase de indivíduos poli-X, relacionava-se com uma maior condensação.

KEGEL & CONEN, em 1972, aplicando a técnica do uso de fluorescência obtida com quinacrina, realizaram estudos histológicos que lhes permitiram observar uma diferença sexual nos núcleos de seções congeladas de tecidos humanos masculinos e femininos, em microscópios fluorescentes. Essa técnica permitiu aos autores identificar o cromossomo Y em 70% dos núcleos masculinos em interfase, enquanto que, nos núcleos femininos, a incidência encontrada foi de 9%. Citaram que, em seus estudos, Moore e Barr descobriram a cromatina sexual em 68 a 80% de todos os tipos de células estudadas de mulheres, enquanto que era observada a presença de uma estrutura similar em apenas 2 a 21% nos núcleos de células masculinas. Os autores sugeriram que poderiam ser encontradas as mesmas variações de cromatina sexual após a coloração com quinacrina. Concluíram que a técnica da fluorescência poderia ser útil em casos em que o diagnóstico do sexo nuclear fosse equivocado, como no caso de tecidos de certos tumores ou de indivíduos com mosaicismo sexual cromossômico.

SENO & ISHIZU, em 1973, estudaram a identificação sexual, especialmente a do sexo masculino, identificando o

cromossomo Y no núcleo das células da polpa dental de um único dente. Os autores confirmaram que não o sexo, masculino ou feminino, podia ser diferenciado através do cromossomo Y, em um único dente, fosse ele decíduo, permanente, incisivo, canino ou molar, até 5 meses depois de sua extração.

ARAGONES & EGOZCUE, em 1973, descreveram dois métodos para identificar a cromatina sexual masculina, ou corpúsculo Y, e a cromatina sexual feminina, ou corpúsculo de Barr, em manchas velhas de uma gota de sangue em diversos materiais, absorventes e não absorventes, como metal, madeira, vidro, papel, roupas, etc., por terem considerado de interesse ao trabalho policial e à medicina forense. Analisaram as amostras, coloridas com quinacrina, que haviam sido colocadas nos diferentes materiais e, observando 100 núcleos de células, verificaram que continham um grande número de células com núcleos bem preservados, mesmo após 90 dias, embora ocorresse uma queda de concentração após aproximadamente 30 dias, o que tornava mais laboriosa a determinação do sexo. A cromatina Y era mais facilmente identificável em células de sangue, tendo apresentado

uma incidência mínima de 30%. Encontraram maiores dificuldades para detectar o corpúsculo de Barr, porém, usaram o método de exclusão para identificar o sexo feminino, ou seja, pela ausência do corpúsculo Y. Citaram, também, que poderiam ocorrer identificações errôneas, como fêmeas, quando faltava a região altamente fluorescente nos braços longos do cromossomo Y.

BIANCHI, em 1973, relatou que foi no período entre 1921 a 1928, que os trabalhos de Painter demonstraram que a constituição cromossômica sexual dos mamíferos machos é XY (sexo heterozigoto) e, das fêmeas, XX (sexo homozigoto). Determinação sexual, em linhas gerais, é a constituição genética sexual originada durante a fecundação do óvulo pelo espermatozóide. O processo que produz a transformação da gônada indiferenciada, em testículo ou ovário, dá origem à diferenciação sexual. Nesse intervalo de tempo, entre a fecundação e a diferenciação gonadal, atuam os mecanismos que dão origem às diferenças genotípicas sexuais. Antes do processo de mitose, as células devem duplicar todos os seus componentes e, durante um determinado período pré-mitótico, denominado período S, é

duplicado o ácido desoxirribonucleico (DNA). Os diferentes cromossomos e as diferentes regiões dentro de um mesmo cromossomo, começam e terminam a duplicação em momentos diferentes, sendo as regiões heterocromáticas, geneticamente inativas, as últimas a terminar a síntese do DNA. Nas fêmeas, é o cromossomo X que finaliza a duplicação tardiamente e, nos machos, o cromossomo Y. O surgimento da cromatina sexual, ou seja, a inativação genética de um cromossomo X, acontece em um estágio embrionário, variável de acordo com a espécie e o tecido estudado. No ser humano, a cromatina sexual aparece entre os 14 a 16 dias da vida embrionária, enquanto que a diferenciação gonadal é detectável prematuramente nos embriões de 7 semanas.

WHITTAKER *et al.*, em 1975, pelo exame de polpa dentária, demonstraram que a determinação do sexo masculino está relacionada com a incidência de cromossomos Y, que se tornam fluorescentes quando coloridos com quinacrina mostarda. Embora tenham concluído que seu método demonstrasse ser mais fidedigno que as técnicas que usavam o crânio ou as características dos dentes, para estimativa do sexo, evidenciaram a

necessidade de estudos adicionais para o exame da incidência de cromossomos Y em polpas de dentes, assim como, a devida precaução na interpretação dos resultados, pois que analisaram tecido pulpar oriundos de dentes putrefatos, após a exposição em atmosfera úmida por períodos de 10 a 4 semanas.

QUEZADA *et al.*, em 1976, estudaram a presença de cromatina sexual no líquido amniótico de 25 mulheres grávidas, retirado por punção, após anestesia local no abdômen. O tempo de gravidez, variava entre 27 e 42 semanas. Encontraram corpúsculos de Barr nas células do líquido amniótico nos 25 casos. Em 22 dos casos estudados, o sexo resultante correspondeu ao sexo previsto, tanto para o masculino quanto para o feminino.

ROEDE, em 1977, coletou amostras da mucosa oral e da raiz do cabelo de mulheres durante um ou dois ciclos menstruais e, em todos os casos, a incidência da cromatina sexual era 20% maior na raiz de cabelo, do que na correspondente amostra de mucosa bucal da mesma mulher. Esse resultado sugeria que o uso da raiz do cabelo representava um papel mais importante na contagem da cromatina sexual em comparação com a correspondente amostra de

mucosa bucal, porque esta apresentava outras partículas de cromatina que impediam o reconhecimento da cromatina sexual. A cromatina sexual presente na raiz do cabelo era claramente identificável, ocorrendo um aumento na contagem se, além das cromatinas sexuais localizadas perifericamente, fossem também incluídas as não periféricas. O autor concluiu que a raiz do cabelo era um material que apresentava vantagens para verificar a incidência da cromatina sexual, pois as lâminas podiam ser rapidamente preparadas, o método rendia preparações de boa qualidade, a cromatina sexual era exibida com considerável clareza e o procedimento permitia um alto grau de precisão e simplicidade. Estes fatores permitiram uma contagem rápida, com uma pequena margem de erro.

GARZA-CHAPA *et al.*, em 1977, efetuaram um estudo com o fim de analisar a influência dos fatores hormonais na frequência da cromatina sexual. Foram coletadas amostras de esfregaço da mucosa bucal de pacientes selecionadas segundo o seguinte critério: 20 mulheres clinicamente sadias, com períodos normais de menstruação, com idade entre 15 a 46 anos; 20

mulheres normais, em menopausa, com 45 a 78 anos de idade; 20 mulheres com insuficiência renal crônica; 20 mulheres com “diabetes mellitus”, com idade de 47 a 78 anos, medicadas com 40 a 150 unidades de insulina intramuscular por dia, e 5 mulheres com síndrome de hiperplasia supra-renal congênita, cuja idade variava de um mês a 18 anos, medicadas com prednisona. Em todos os grupos de idade, as mulheres que estavam recebendo insulina apresentaram as porcentagens mais altas de cromatina sexual, assim como as mulheres, em todos os grupos de idade, que estavam na fase média do ciclo menstrual, compreendida entre o 13<sup>o</sup>. ao 15<sup>o</sup>. dia do ciclo. Os autores observaram que, quando os níveis de estrógeno se elevavam, havia uma notória diminuição da cromatina sexual, e que mulheres menopáusicas, com ou sem tratamento, e mulheres com hiperplasia supra-renal congênita, não apresentavam diferenças da frequência da cromatina sexual. Entretanto, todas apresentavam porcentagens maiores de cromatina sexual que as verificadas nas fases inicial e final do ciclo menstrual. Em seus estudos encontraram a seguinte variação da frequência da cromatina sexual em amostras de epitélio bucal durante o ciclo

menstrual : 21,20% na fase média ( do 13<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia), 18,30% na fase inicial e 16,50% na fase final.

DANGE *et al.*, em 1978, examinaram amostras de polpa dentária, que haviam sido coloridas com quinacrina, para determinar a origem sexual pelos dentes, através da detecção da presença de corpúsculos de cromatina sexual X ou de corpos fluorescentes Y.

Consideraram que os resultados de 82 dentes examinados permitiam a identificação inequívoca dos corpúsculos de cromatina sexual e, afirmaram, também, que cerca de 1/4 da quantidade normal de polpa disponível era suficiente para a aplicação do método.

NAGAMORI, em 1978, estudou a possibilidade de determinar o sexo, observando a frequência da cromatina Y no núcleo das células do cabelo humano destituído de envoltura da raiz epitelial, tendo verificado que este método de exame era dificultado pela deposição de melanina. Contudo, a diferença da ocorrência do corpúsculo fluorescente no material dos dois sexos permitia seu uso como um critério para determinação do sexo.

MUKHERJEE & SANSEBASTIAN, em 1978, relataram suas descobertas de que a freqüência dos corpúsculos de cromatina X fluorescentes aumentava de 51 a 94%, assim que a densidade das células aumentava em torno de 1 a 8 células por 0,01 mm<sup>2</sup> na superfície da cultura, evidenciando a relação entre ambos os dados, enquanto que, nas células masculinas, a freqüência dos corpúsculos Y fluorescentes manteve o mesmo padrão em diferentes densidades de células. Os autores encontraram uma alta proporção (51 a 94,3%) de núcleos de células femininas com cromatina sexual e não identificaram nenhuma cromatina sexual nas células dos homens adultos. Sugeriram que a diferença desses resultados, com os de outros autores, poderia ser causada por diferentes processos de coloração, ou pelos procedimentos de contagem usados.

PEARSON & BOBROW, em 1979, investigaram a possibilidade de se identificar núcleos masculinos positivos durante a interfase, em virtude da propriedade do cromossomo Y apresentar fluorescência pela coloração com quinacrina. Foi demonstrado apenas um corpo fluorescente em homem XY normal

e dois corpos em homem XYY. Não foi observada nenhuma fluorescência semelhante em células de origem feminina. Demonstraram que, devido à dimensão física do corpo da cromatina, havia a necessidade de um sistema óptico de alta qualidade e de uma eficiente fonte de iluminação para sua identificação. Complementando esta técnica com a de Barr e Bertram, os autores concluíram que era possível diagnosticar o cromossomo sexual de uma grande parte da população, principalmente com relação às anormalidades numéricas do cromossomo Y. Salientaram, também, que a coloração da cromatina sexual, nos núcleos em interfase, fornecia um volume de informações que atestavam a utilidade de um método rápido de diagnóstico da constituição do cromossomo sexual. Observaram que era desconhecido o motivo pelo qual ocorria uma reação heterogênea entre a cromatina humana e a quinacrina, o que, provavelmente, refletia diferenças químicas nos cromossomos.

YEN *et al.*, em 1981, através de amostras de mucosa bucal, compararam as frequências de cromatina X em mulheres idosas, de meia idade e jovens. A frequência média de cromatina

sexual encontrada no grupo das idosas foi de 24,14 %, no grupo de meia idade foi de 27,37% e, no grupo jovem, na faixa etária de 5 a 24 anos de idade, foi de 28,46%. Encontraram um declínio, estatisticamente significativo, nas mulheres idosas, quando comparadas com as mulheres de meia idade e com as jovens.

DAVIS & PENNY, em 1981, descreveram as características da cromatina sexual do seguinte modo: a cromatina X heteropicnótica, no núcleo XX, era do tamanho de  $1\mu$ , firmemente aderida à face interna da membrana nuclear, sendo que tinha uma suave fluorescência, homogênea e moderada. Descreveram, também, que o corpúsculo fluorescente Y, no núcleo XY, era de  $1/3$  a  $1/4$  do tamanho do corpúsculo de Barr, e que estava localizado ao acaso, apresentando uma fluorescência mais intensa. Observaram que o reconhecimento da cromatina sexual, em núcleos em interfase, dependia da intensidade da coloração fluorescente.

BISHUN & SMETHURST, em 1983, estudaram o valor da análise da cromatina sexual na neoplasia humana. De suas conclusões, selecionamos os seguintes relatos: 1- era incomum

encontrar corpúsculos de cromatina sexual em tumores de indivíduos do sexo masculino, com exceção dos teratomas; 2- muitos tumores benignos tinham uma frequência de cromatina sexual similar àquela do tecido de hospedeiro normal; 3- muitas amostras de tumores malignos de indivíduos do sexo feminino também tinham frequências de cromatina sexual similares ou inferiores àsquelas observadas em tecidos normais; 4- havia evidências de que pacientes com câncer de seio, com altas contagens de cromatina sexual, sobreviveram mais do que pacientes com baixas contagens; 5- as diferenças encontradas pelos grupos que relatavam frequências e proporções da cromatina sexual podiam não estar relacionadas com a variabilidade dos tumores e, sim, com as diferenças em métodos, e o fato de que a interpretação do que constituía um corpúsculo de cromatina sexual variava levemente entre diferentes pesquisadores. Os autores, em consequência de suas observações, avaliaram que não era totalmente válido relacionar frequências de cromatina sexual de outros pesquisadores aos dados obtidos em suas pesquisas, devendo os pesquisadores estabelecer seus principais critérios a respeito da proporção das contagens de cromatina

sexual encontradas em tecido normal e de tumores, para, então, estabelecer suas próprias divisões em grupos de alta e baixa frequência.

CHOWDHURY & CHOWDHURY JR., em 1984, relataram suas observações relativas ao seu trabalho com epidemiologia, quando estudaram, em células esfoliadas, sob diferentes condições fisiológicas e durante a neoplasia, na pré e pós-menopausa, a ocorrência e padrão da distribuição da cromatina sexual.

Coletaram múltiplas amostras cervicais de 250 mulheres normais, com idade entre 25 a 40 anos, com ciclos menstruais normais; de 40 mulheres grávidas, onde estudaram a cromatina sexual em diferentes estágios da gravidez; de 40 mulheres com amenorréia lactacional; de 39 casos de cessação do ciclo menstrual; de 116 casos de displasia do útero cervical, subdivididos em 78 casos moderados e 38 casos severos, subagrupados em casos pré e pós-menopausa. Os estudos revelaram que a cromatina sexual se apresentava, freqüentemente, na periferia da membrana nuclear, e que uma cromatina sexual se apresentava,

regularmente, em um núcleo vesicular normal em interfase. Esse estudo levou os autores a várias conclusões, dependendo de cada caso, como a relação da freqüência da cromatina sexual com os níveis de esteróides em mulheres; o crescimento, em número, de células com cromatina sexual, durante o período da gravidez e da amenorréia lactacional, quando os níveis de estrogênio e progesterona são elevados; a diminuição do número de cromatina sexual em displasia severa, pré e pós-menopausa, o que indicava a dupla influência dos hormônios e da neoplasia na cromatina sexual e, que a ausência dos corpúsculos X podia ser devido ao ciclo das células, associado com malignidade, o que poderia explicar as alterações com o estado hormonal. Concluíram, assim, que a freqüência da cromatina sexual poderia ser um indicador adicional no diagnóstico de diferentes estados hormonais em mulheres, e do progresso da displasia para a malignidade.

BLANCO & MACAGNO, em 1984, empreenderam o seu trabalho com a finalidade de selecionar o método mais adequado para a determinação da cromatina sexual, analisando os valores normais para cada um deles, e estabelecendo um estudo

comparativo do uso de métodos citoquímicos e morfológicos. Selecionaram os métodos: Feulgen, Teste de Brachet, hematoxilina de Harris e o método de Guard. As autoras coletaram amostras de mucosa bucal de 32 mulheres sadias, com idade compreendida entre 23 e 34 anos, e observaram que, quando se trabalha com métodos de coloração morfológica, devem ser contados apenas os corpúsculos de Barr que estiverem aderidos à membrana nuclear, para não serem confundidos com outras estruturas nucleares. Concluíram que a eleição de um determinado método para diagnóstico de cromatina sexual depende fundamentalmente das preferências e possibilidades metodológicas do pesquisador, porque, se de um lado os métodos citoquímicos apresentavam um diagnóstico confiável, por outro lado, apresentavam maiores dificuldades metodológicas, e a simplicidade metodológica da hematoxilina de Harris a tornava recomendável em rastreamento de rotina.

BOURGEOIS *et al.*, em 1985, pesquisaram a posição do cromossomo X no núcleo em interfase de fibroblastos humanos. Estudaram núcleos contendo um corpúsculo de Barr e, embora a

posição dos nucléolos em relação ao corpúsculo variasse de um núcleo para outro, o cromossomo X inativo era muitas vezes localizado perto dos nucléolos, e esta localização não era dependente do número de nucléolos. Em seus experimentos, o corpúsculo de Barr sempre correspondeu ao mesmo cromossomo X inativo, localizando-se ao longo do invólucro nuclear.

NAGAMORI *et al.*, em 1986, apresentaram seu método para determinar o sexo, usando amostras bucais e seções longitudinais da raiz do cabelo, usando o tratamento combinado da coloração com quinacrina para a detecção de cromatina Y, e reação fluorescente de Feulgen para a detecção de cromatina X. Os resultados deste experimento demonstraram que as frequências de cromatina X e Y são distintas entre amostras masculinas e femininas, tanto na mucosa bucal, quanto no bulbo capilar. As amostras masculinas apresentavam poucos corpúsculos com a coloração pela quinacrina, com uma frequência de 0% a 2% (média de 0,4%) nos núcleos das células das amostras da mucosa bucal, e 0% a 7% (média de 1,8%), nos núcleos das células das amostras de bulbo capilar. Os autores verificaram, também, que a frequência da

cromatina sexual era de 58 a 87% nas amostras de mucosa bucal feminina, e de 59 a 85% nas amostras de bulbo capilar, indicando que o método pode ser valioso quando a quantidade de amostras para determinação do sexo é limitada.

DAHER *et al.*, em 1986, no Hospital Clínico da Universidade do Chile, estudaram células da mucosa bucal de 610 indivíduos, com o objetivo de analisar o resultado do exame da cromatina de Barr e correlacioná-lo com o cariótipo, a fim de estimar sua validade. Os diagnósticos de referência mais freqüentes foram: meninas com crescimento retardado, azoospermia, amenorréia primária e ambigüidade genital. Os autores concluíram que a detecção de cromatina X em homens é indicativo da presença de um segundo cromossomo X, em pelo menos algumas células; a ausência na mulher indica uma anormalidade cromossômica; uma cromatina positiva em 20% ou mais não garante a normalidade do cariótipo, e a presença de duplo corpúsculo de Barr coincidiu, sempre, com a existência de pelo menos uma linha celular tripla X. Por esses resultados, consideraram que existiam limitações para a interpretação da cromatina sexual no sexo feminino, e que, quanto

menor fosse a frequência de corpúsculos de Barr nas mulheres, maior seria a incidência de anomalias do cromossomo X. Contudo, consideraram que o exame permitia detectar possíveis mosaicismos, além de ser um método de fácil aplicação e economicamente vantajoso pelo seu baixo custo. A frequência de 2% de corpúsculo de Barr, em amostras de indivíduos masculinos, sem evidências de anormalidades, sugeriam que acúmulos de heterocromatina nos núcleos interfásicos poderiam dar uma aparência de corpos de Barr, ou então, esta escassa positividade poderia resultar de artefatos de técnicas, tanto que em alguns laboratórios se considerava normal uma frequência de 2% a 4% de positividade para os homens.

BELMONT *et al.*, em 1986, desenvolveram métodos para testar se as posições de quaisquer marcadores intranucleares estariam mutuamente relacionadas. Mostraram que os corpúsculos de Barr individuais não tinham uma distribuição intranuclear ao acaso, localizando-se, preferencialmente, na periferia nuclear, num plano paralelo ao plano de crescimento da célula e, as posições de dois corpúsculos de Barr, em fibroblastos humanos XXX, não apresentavam nenhuma evidência de correlação significativa dentro

do núcleo. Verificaram, assim, que 65% de todos os corpúsculos de Barr estavam localizados periféricamente.

ADACHI, em 1988 utilizou a polpa dentária, em testes histológicos, corada com hematoxilina e eosina e, subseqüentemente, com quinacrina mostarda, para determinar a presença e a localização cromatínica e estudar o sexo genético. Posteriormente, em 1989, utilizou a mesma metodologia com a finalidade específica de avaliar a validade dessa identificação sexual, porém em dentes recém-extraídos, e em escala crescente de tempo, a partir de 1 mês após a extração, até atingir um período de 2 anos decorridos da data de sua extração. Encontrou uma média de 42,2% de incidência de cromatina Y nas amostras do sexo masculino e 07% nas amostras femininas.

WATANABE & ENDO, em 1988, desenvolveram uma técnica, que consideraram mais simples, para diagnosticar sexo de embriões de roedores, camundongos e ratos, para utilização em biologia experimental. Definiram como cromatina sexual, a massa de cromatina circular que ficava colorida intensamente de azul púrpura com carbo-fucsina, destacada no nucleoplasma colorido em

rosa pálido. Na maior parte das células, a cromatina sexual apresentava a forma de uma massa circular ou esférica, localizada contra a membrana nuclear interna, tendo um tamanho constante de aproximadamente  $1/10$  em relação ao diâmetro do núcleo. Detectaram, também, massas parecidas com cromatina sexual em células, presumivelmente femininas e masculinas, de embriões de camundongos e ratos em diferentes estágios de gestação. Os autores observaram um possível decréscimo da incidência da cromatina sexual nos últimos estágios de desenvolvimento, assim como, também, uma diminuição no tamanho da mesma. A técnica de coloração usada demonstrava claramente o sexo nuclear das células amnióticas, de forma inequívoca, quer fossem contadas as massas individuais, ou as massas similares em tamanho, cor e forma, não adjacentes à membrana nuclear, designadas por eles como cromatina sexual interna.

NAGAMORI, em 1989, estudou a determinação do sexo, através do exame da cromatina X no núcleo da célula da raiz do cabelo e da célula da mucosa bucal, utilizando diferentes métodos de coloração. Abordou os seguintes aspectos em sua

pesquisa: 1) verificação da cromatina X pela coloração do método de Feulgen com o uso de um microscópio comum, e coloração pelo método de Feulgen com acriflavine, usando um microscópio fluorescente. Ambos os métodos permitiram obter valores maiores nas amostras femininas do que nas masculinas; 2) determinação da cromatina Y pela coloração com quinacrina, que também diferenciou o sexo masculino do feminino e, 3) coloração combinada de coloração com quinacrina e pelo método de Feulgen, de uma única amostra, para verificar a freqüência da cromatina X ou Y. Os resultados, nos grupos femininos, da coloração pelo método de Feulgen, foram de 58% a 97% (média de 71,3%) nas amostras de esfregaço da mucosa bucal e, 59% a 85% (média de 67,11%), nas amostras da raiz de cabelo. Os resultados obtidos com os indivíduos do sexo masculino apresentaram a freqüência de 0 a 2% (média de 0,4%) nas amostras de esfregaço da mucosa bucal e, 0 a 7% (média de 1,8%) nas amostras de raiz de cabelo, ambas coloridas com quinacrina. O autor concluiu que esse estudo permitia determinar o sexo através de uma única amostra disponível, aplicando o tratamento combinado para pesquisar a

cromatina X ou Y, sendo valiosa essa metodologia quando a quantidade de amostras é limitada.

GATTAS *et al.*, em 1990, investigaram a presença de cromatina Y em crostas de sangue, de 2 homens e 2 mulheres, que ficaram expostas à temperatura ambiente por um período de 3 meses. Em uma segunda etapa, repetiram o mesmo procedimento com 10 homens e 10 mulheres, expondo o sangue à temperatura ambiente por um período de 10 meses. Demonstraram ser possível realizar o diagnóstico do sexo, em relação à presença ou ausência da cromatina Y, em crostas provenientes de uma única gota de sangue que ficaram expostas à temperatura ambiente em superfícies não porosas por um período de 6 meses.

DUFFY *et al.*, em 1991, estudaram a freqüência da cromatina sexual em polpas dentárias de humanos e de suínos jovens, em fragmentos maxilares aquecidos e mumificados artificialmente, mostrando a preservação, tanto para os corpúsculos de Barr, como para corpos Y, até o período de um ano. Efetuaram seus estudos tendo em mente a determinação do sexo depois de eventos catastróficos como fogos, estrondos de alto

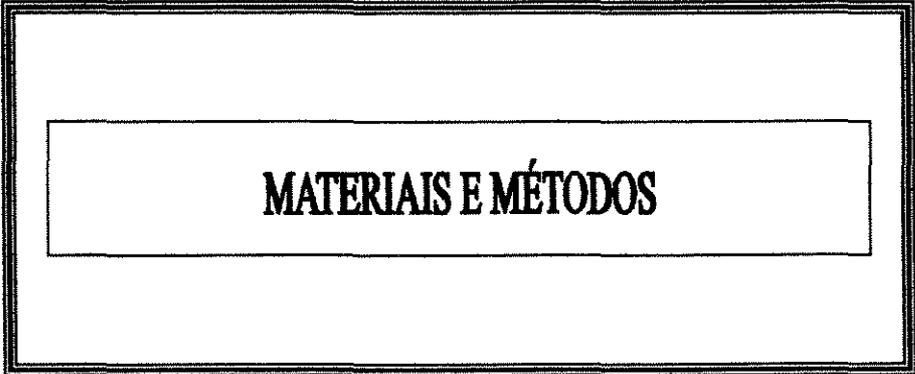
impacto e explosões. Em tais situações, a polpa dentária poderia ser usada para diagnóstico da cromatina sexual, por estar isolada por uma dura cobertura que a protege dos efeitos prejudiciais de trauma, impacto ou calor. Os autores procuraram determinar a frequência da cromatina sexual X e Y em polpas dentárias, de humanos e suínos jovens, aquecidas a  $75^{\circ}\text{C}$  e geladas até  $-70^{\circ}\text{C}$ , confirmando, consoante verificaram na literatura, que a preservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  era eficaz por aproximadamente 6 semanas e que, a  $-70^{\circ}\text{C}$ , ocorria a deterioração das células em menos de 2 semanas. Efetuaram experiências para detectar a temperatura crítica atingida na câmara da polpa de dentes humanos, sob a qual a cromatina sexual ainda seria detectável, concluindo que ela poderia estar preservada até uma temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$ , por uma hora. Os molares humanos, armazenados à temperatura ambiente, mostraram estabilidade prolongada da cromatina sexual. Concluíram que é importante estabelecer a presença de cromatina sexual de qualquer sexo em tecido que está sujeito à putrefação, e que o uso de um só discriminador poderia conduzir a um diagnóstico errôneo.

SAMPAIO *et al.*, em 1992, relataram que muitos estudos demonstraram que a freqüência da cromatina X variava na mulher, de acordo com as diferentes fases hormonais da vida. A pesquisa dos autores buscou determinar a freqüência da cromatina X, durante o segundo trimestre da gravidez, através das células em suspensão na saliva da mucosa oral. Os dados obtidos de 24 pacientes, de 19 a 41 anos, foram comparados com um grupo de controle formado por 202 mulheres jovens normais, não grávidas, nas fases de secreção e de proliferação do ciclo menstrual. Obtiveram uma média de 19,97% na freqüência variável de 15% a 25% da cromatina X, nas mulheres que estavam no 2º trimestre da gestação. Concluíram, também, que 95% do grupo de controle apresentou de 8% a 25% de freqüência de cromatina X, não havendo diferenças significativas entre duas fases do ciclo menstrual, que apresentavam a média de 16,27% na fase de proliferação, e a média de 16,33% na fase de secreção.

**PROPOSIÇÃO**

## **PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a possibilidade de determinar o sexo genético de jovens de 10 a 30 anos, examinando-se os fibroblastos da polpa dentária, através da quantificação de cromatina sexual ou do corpúsculo de BARR encontrado nessas células e, obter-se, assim, resultados que possibilitem acrescentar subsídios aos legistas para o cumprimento dessa importante investigação, que é a determinação do sexo, contribuindo, primeiramente para a Ciência e, conseqüentemente, para a investigação pericial e para a Justiça.



**MATERIAIS E MÉTODOS**

## **MATERIAS E MÉTODOS**

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas polpas dentárias retiradas de 100 dentes hígidos, extraídos de uma população na faixa etária entre 10 e 30 anos de idade, sem sinais ou sintomas que indicassem qualquer patologia ou desvio sexual e por conseguinte, considerada normal a respeito do objetivo pretendido.

Os dentes foram doados por 50 pacientes do sexo feminino e por 50 pacientes do sexo masculino que realizavam tratamento ortodôntico que exigia a obtenção de espaço, portanto com extração ortodôntica indicada.

Tanto os pacientes, como os seus responsáveis legais, foram suficientemente esclarecidos sobre a importância de se utilizar a polpa retirada do dente extraído, para fins de trabalho de pesquisa científica. Após esses esclarecimentos, os pacientes efetivaram a doação espontânea do dente e forneceram a necessária autorização de forma consciente e expressa, para que o mesmo pudesse ser utilizado no presente trabalho.

Predominantemente, os dentes extraídos foram os primeiros pré-molares superiores e ou inferiores e em número menor, os terceiros molares superiores e inferiores. Após a extração, as peças dentárias foram lavadas em água corrente e, imediatamente condicionadas em frascos de vidro com solução de Carnoy, composta de ácido acético puro e álcool absoluto na proporção 1:3, para sua conservação e início da fixação. (Fig.01)

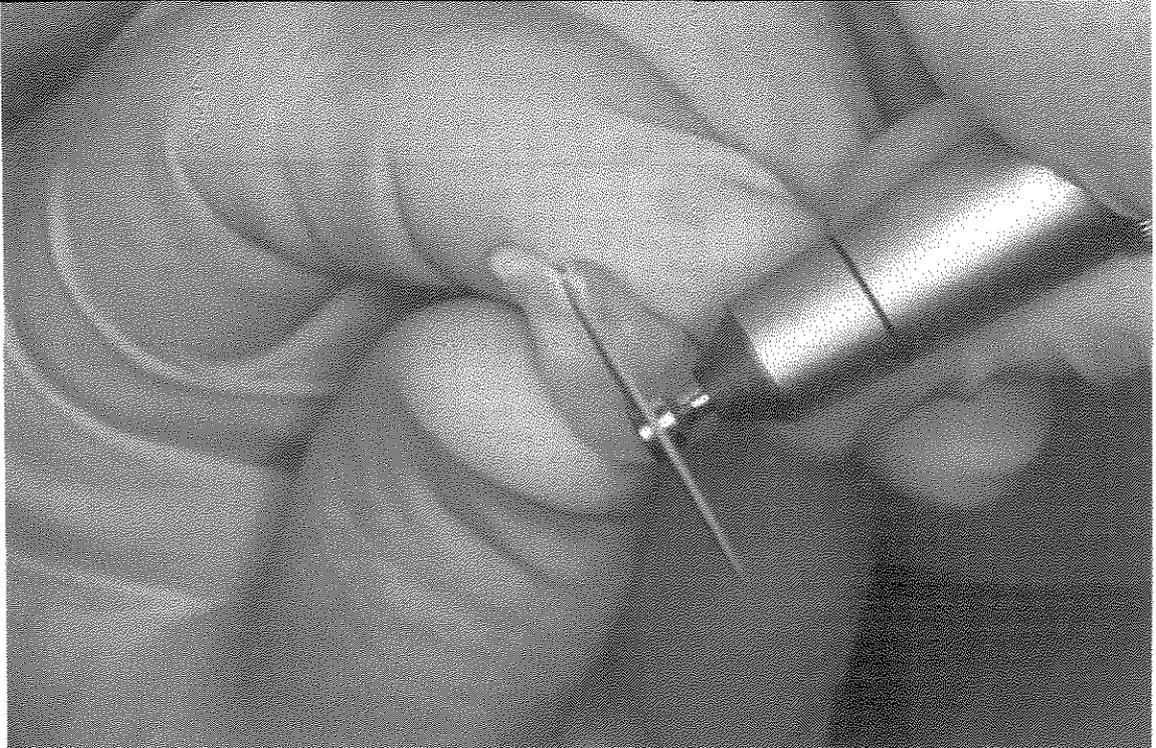
**Figura 01** – Dente retirado do frasco, contendo solução de Carnoy.



Os frascos individuais foram identificados através de um rótulo onde constava apenas a idade e o sexo do indivíduo doador. O tempo máximo de permanência da peça dentária no frasco de vidro foi de 6 horas. A seguir, foram efetuados os seguintes procedimentos:

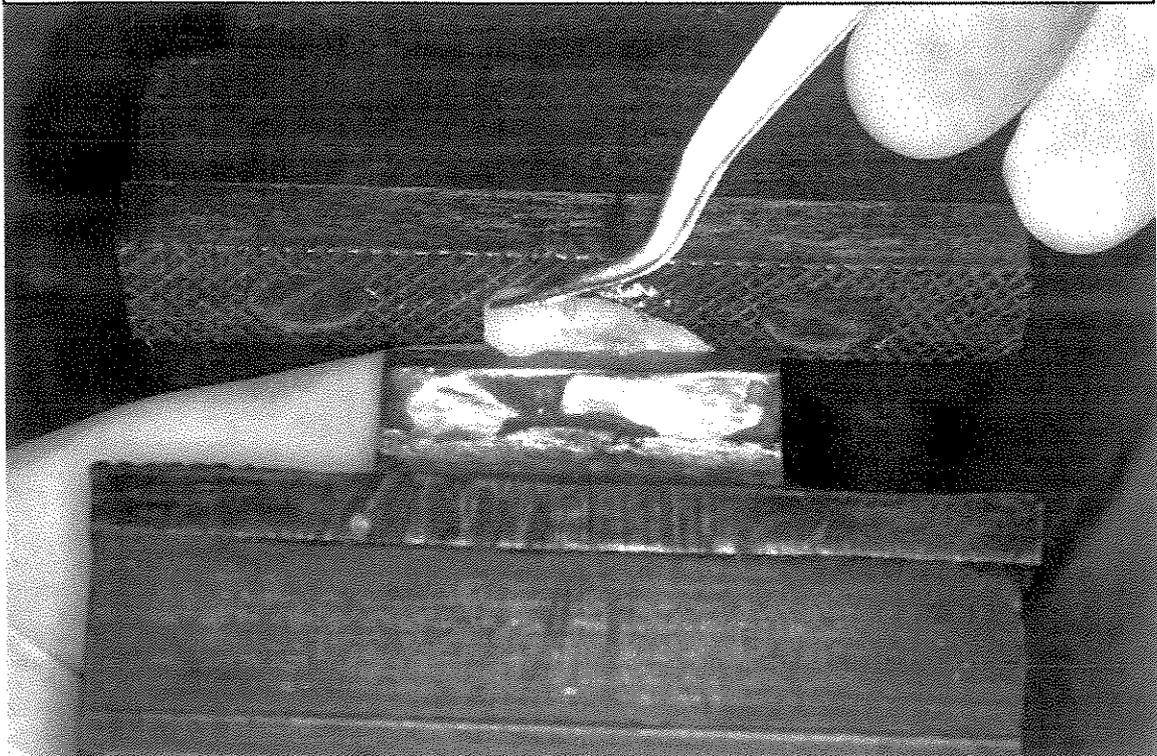
1 – Com um disco de carborundum, montado em ponta reta, foi feito um sulco longitudinal em toda extensão da face oclusal do dente até o ápice radicular em ambos os lados do mesmo, obtendo-se assim uma ranhura profunda ao longo de toda a extensão da peça dentária.(Fig.02)

**Figura 02** – Abertura de sulco em toda extensão longitudinal da peça.



2 - O dente foi aberto em duas metades com um cinzel adaptado a uma das bordas de uma morsa de bancada, expondo-se assim, a polpa íntegra. ( Fig.03).

**Figura 03** - Cinzel adaptado a uma das bordas de uma morsa de bancada.



3 – Uma pinça clínica foi utilizada, buscando-se retirar a polpa exposta, cuidadosamente, com a menor deformidade possível, de forma que sua estrutura pudesse sofrer o mínimo de avaria. (Fig. 04)

**Figura 04** - Retirada da polpa dentária.



4 - A polpa retirada foi imediatamente submersa em fixador com o objetivo de impedir o seu ressecamento, condição de fixação úmida que se considera indispensável para a correta observação da cromatina sexual. O tempo de permanência no fixador variou entre 5 e 6 horas.

5 - Após ser retirada do fixador, a polpa foi lavada e desidratada com passagens em álcool de graduação crescente, sendo álcool a 80°, 95° e absoluto, durante 24 horas em cada graduação.

6 - Após a desidratação, lavagem, a polpa foi colocada em xilol durante um tempo que variou de 2 a 3 horas.

7 - Em seguida, foi incluída em parafina, em três banhos consecutivos de uma hora de duração cada um, utilizando-se de uma estufa na temperatura de 62°C.

8 - Foram confeccionados blocos da parafina, feita a aparagem e em seguida efetuados cortes em micrótomo.

Os cortes foram montados em lâminas e a desparafinização foi executada na seguinte seqüência :

A) Xilol 1 durante 10 minutos ,

B) Xilol 2 durante 10 minutos.

As lâminas foram mergulhadas em álcool de graduação decrescente para a hidratação, sendo em álcool absoluto, a 95°C e a 80°, durante 10 minutos em cada graduação e, finalmente lavadas em água corrente.

## **COLORAÇÃO**

Para a coloração das lâminas foi utilizada a Hematoxilina Férrica de Herdenhain, conforme preceituam COSTA & CHAVES, obedecendo-se a seguinte seqüência:

1. submersão das lâminas, desparafinadas e lavadas, na solução de alumínio de ferro a 2%, durante 30 minutos,
2. lavagem das lâminas em água destilada,
3. imersão das lâminas na solução de Herdenhain, durante 30 minutos,
4. lavagem das lâminas em água destilada,
5. submersão na solução de alumínio de ferro a 2%, e controle microscópico até a evidenciação da cromatina sexual,

6. lavagem das lâminas em água destilada,
7. contra coloração das lâminas com Verde Luz a 1:400,  
em solução alcoólica a 90°C,
8. lavagem em água destilada,
9. desidratação rápida das lâminas por passagens  
sucessivas em álcool de graduação crescente, 80°, 95°  
e absoluto, durante 5 minutos em cada graduação,
10. imersão das lâminas em xilol puro durante 20  
minutos.

## **MONTAGEM**

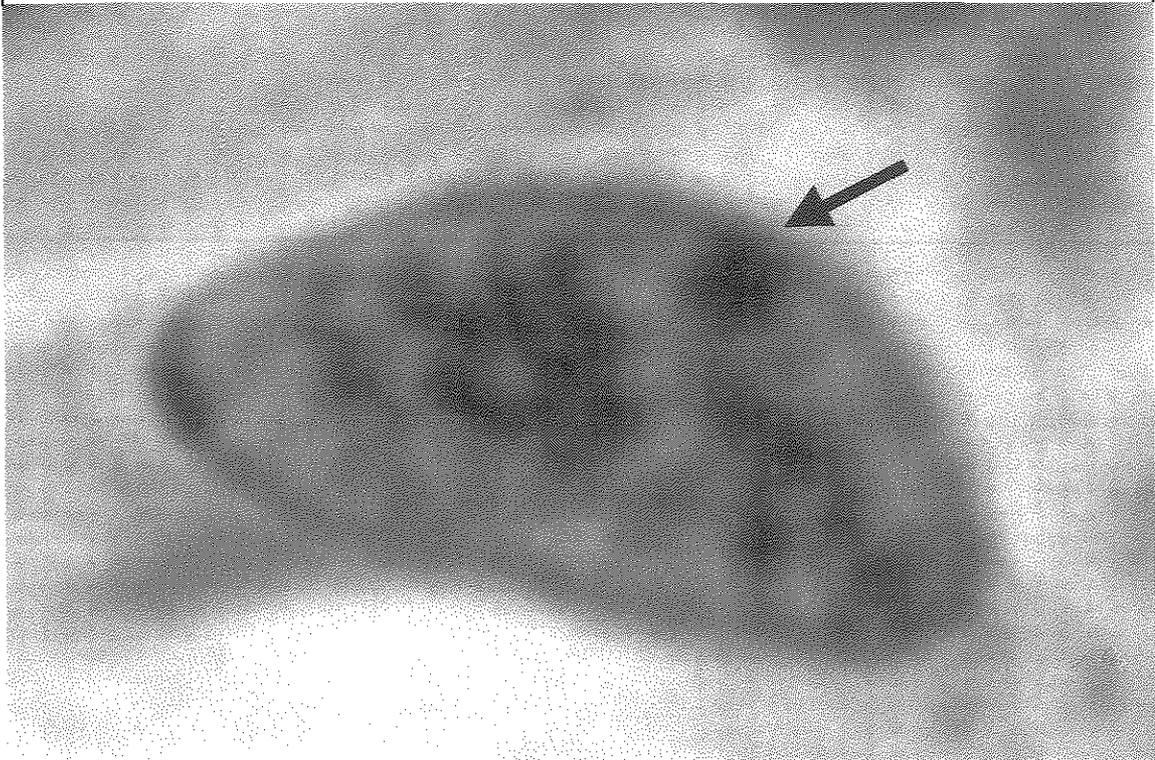
A lamínula foi fixada sobre a lâmina com uma gota de bálsamo do Canadá e em seguida levada para secagem em estufa numa temperatura de 30° C durante 24 horas.

## EXAME DAS CÉLULAS

Foi selecionada uma lâmina de cada polpa dentária, totalizando 50 lâminas de polpas masculinas e 50 lâminas de polpas femininas e, em seguida, foi feita a contagem de 100 células por amostra.

Na contagem foram consideradas as massas de cromatina sexual em qualquer localização dentro da membrana.(Fig.05)

**Figura 05** - Célula feminina com 1 cromatina sexual.



nuclear.(Fig.05).

Para conservar a uniformidade do critério de contagem, o mesmo examinador contou todas as amostras e, efetuou posteriormente, ao acaso, recontagens de 50 amostras para avaliar a credibilidade do método de contagem.

Através da metodologia empregada foi possível obter, a partir das polpas dentárias, excelentes preparações, principalmente sem contaminação de fundo. Esse fato garantiu uma avaliação segura da presença ou ausência da cromatina X.

A associação entre o sexo do indivíduo e a presença ou ausência da cromatina X foi avaliada pelo teste de  $\chi^2$  ( $\alpha=0,01$ ).

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS OBTIDOS

Tabela 01 - TABELA DE FREQUÊNCIAS (SEXO MASCULINO)

Caso nº.	Células com x-cromatina	%	Caso nº.	Células com x-cromatina	%
1	0	0	26	3	3
2	0	0	27	0	0
3	0	0	28	0	0
4	0	0	29	0	0
5	0	0	30	0	0
6	0	0	31	0	0
7	0	0	32	2	2
8	1	1	33	1	1
9	0	0	34	0	0
10	0	0	35	0	0
11	0	0	36	0	0
12	3	3	37	0	0
13	2	2	38	0	0
14	0	0	39	0	0
15	0	0	40	0	0
16	0	0	41	3	3
17	0	0	42	1	1
18	0	0	43	0	0
19	3	3	44	0	0
20	0	0	45	0	0
21	0	0	46	1	1
22	0	0	47	0	0
23	3	3	48	0	0
24	2	2	49	0	0
25	0	0	50	0	0
Total de células contadas por amostra.....					100
Frequência média.....					0,5%

**Tabela 02 - TABELA DE FREQUÊNCIAS (SEXO FEMININO)**

Caso nº.	Células com x-cromatina	%	Caso nº.	Células com x-cromatina	%
1	71	71	26	66	66
2	59	59	27	60	60
3	50	50	28	55	55
4	33	33	29	49	49
5	70	70	30	77	77
6	72	72	31	24	24
7	54	54	32	42	42
8	44	44	33	53	53
9	48	48	34	48	48
10	61	61	35	62	62
11	29	29	36	41	41
12	59	59	37	63	63
13	80	80	38	40	40
14	51	51	39	66	66
15	67	67	40	57	57
16	46	46	41	67	67
17	58	58	42	68	68
18	69	69	43	32	32
19	46	46	44	74	74
20	79	79	45	45	45
21	57	57	46	60	60
22	61	61	47	61	61
23	38	38	48	44	44
24	62	62	49	66	66
25	69	69	50	56	56
Total de células contadas por amostra.....					100
Frequência média.....					56,18%

**Tabela 03 - TABELA DE FREQUÊNCIA (EM CLASSES) DO SEXO MASCULINO**

CLASSE DE FREQUÊNCIA		SUB TOTAL	%
CLASSE 01	00 - 10	50	100
CLASSE 02	11 - 20	0	0
CLASSE 03	21 - 30	0	0
CLASSE 04	31 - 40	0	0
CLASSE 05	41 - 50	0	0
CLASSE 06	51 - 60	0	0
CLASSE 07	61 - 70	0	0
CLASSE 08	71 - 80	0	0
CLASSE 09	81 - 90	0	0
CLASSE 10	91 - 100	0	0
TOTAL DE INDIVÍDUOS			50

**Tabela 04 - TABELA DE FREQUÊNCIA (EM CLASSES) DO SEXO FEMININO**

CLASSE DE FREQUÊNCIA		SUB TOTAL	%
CLASSE 01	00 - 10	0	0
CLASSE 02	11 - 20	0	0
CLASSE 03	21 - 30	3	6
CLASSE 04	31 - 40	6	12
CLASSE 05	41 - 50	10	20
CLASSE 06	51 - 60	12	24
CLASSE 07	61 - 70	13	26
CLASSE 08	71 - 80	6	12
CLASSE 09	81 - 90	0	0
CLASSE 10	91 - 100	0	0
<b>TOTAL DE INDIVÍDUOS</b>			<b>50</b>

## **ANÁLISE DEMONSTRATIVA DOS RESULTADOS**

Resumo demonstrativo dos resultados da contagem de cromatina sexual em polpas dentárias de indivíduos do sexo masculino.

A Tabela 01 demonstra individualmente a incidência de cromatina sexual em 50 indivíduos do sexo masculino, com contagem de 100 células por indivíduo, sendo obtidos os seguintes resultados:

1 – Nas 50 amostras pertencentes ao grupo masculino, foram contadas 12 amostras com incidência de cromatina sexual, com um índice de 1 a 3% de positividade.

2 – Nas amostras que apresentaram a cromatina sexual, encontramos a seguinte distribuição:

a – 04 amostras com 1 célula com cromatina sexual

b – 03 amostras com 2 células com cromatina sexual

c – 05 amostras com 3 células com cromatina sexual

3 – A ausência da cromatina sexual foi observada em 38 amostras do sexo masculino.

4 – A frequência média nas amostras masculinas foi de 0,5%.

Resumo demonstrativo dos resultados da contagem de cromatina sexual em polpas dentárias de indivíduos do sexo feminino.

Na Tabela 02 demonstra-se, individualmente, a incidência de cromatina sexual em 50 indivíduos do sexo feminino, com contagem de 100 células por indivíduo, sendo obtidos os seguintes resultados:

1 - Nas 50 amostras pertencentes ao grupo feminino, foram contadas 50 amostras com incidência de cromatina sexual, ou seja, 100% dos indivíduos do sexo feminino apresentaram células com cromatina sexual X, numa amostra de 100 células por indivíduo.

2 – A incidência mínima encontrada, de cromatina sexual, foi de 24 cromatinas sexuais por amostra, que corresponde a 24%.

3 – A incidência máxima encontrada, de cromatina sexual, foi de 80 cromatinas sexuais por amostra, que corresponde a 80%.

4 – A freqüência média nas amostras femininas foi de 56,18%.

Foi estabelecida uma tabela de classe de freqüência com incremento de 10 unidades de cromatina sexual por classe, obtendo-se 10 classes.( Tabela 03)

A classe n<sup>o</sup>. 01 inicia-se com a total ausência de cromatina sexual por amostra, até o limite de 10 unidades, e, subseqüentemente as classes têm um acréscimo de 10 unidades, terminando a classe n<sup>o</sup>. 10, com a total incidência de cromatina sexual , ou seja, 100 células com cromatina sexual.

Os seguintes resultados foram encontrados:

1 – As 50 amostras de indivíduos do sexo masculino localizaram-se na classe nº.01, com incidência até o máximo de 03 cromatinas sexuais por amostra.

Foi usado o mesmo critério ao do sexo masculino para o estabelecimento de classes de frequência, ou seja, 10 classes com um incremento de 10 unidades por classe (Tabela 04), e foram observados os seguintes resultados:

1 – A classe nº. 01, de 0 a 10 cromatinas sexuais por amostra do sexo feminino, não apresentou nenhuma amostra, bem como a classe nº. 02, de 11 a 20.

2 – As classes nºs. 03 e 04, respectivamente de 21 a 30 e 31 a 40 cromatinas sexuais por contagem, apresentaram 3 e 6 indivíduos por classe.

3 – As classes nºs. 05 e 06, respectivamente de 41 a 50 e de 51 a 60 cromatinas sexuais por contagem, apresentaram 10 e 12 indivíduos por classe.

4 – A maior incidência foi verificada na classe no. 07, de 61 a 70 cromatinas sexuais, com um total de 13 indivíduos.

5 – A partir da classe no. 08, houve um decréscimo de indivíduos por classe, com a seguinte distribuição: 6 na classe no. 08, de 71 a 80, 0 na classe no. 09, de 81 a 90, e na classe no. 10, de 91 a 100 cromatinas sexuais por contagem.

**DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

## **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

O estudo da cromatina sexual amplia-se pelos vários aspectos que permitem a sua abordagem.

É mister que se faça referência a vários fenômenos relatados na literatura quanto à sua localização, incidência, valor de positividade, e outros aspectos, sobre os quais será discorrido a seguir, para que a presente discussão dos resultados traga os necessários entendimentos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, sobre a presença da cromatina sexual para identificação sexual, encontram concordância com as observações de MOORE & BARR, que diagnosticaram corretamente o sexo em 100% das amostras, assim como GRIGNASCHI et al., PANSEGRAU & PETERSON e DANGE et al., que verificaram 100% de correlação dos testes de cromatina sexual com o fenótipo sexual.

Comparando os resultados da presente pesquisa com os de GRIGNASCHI et al., observa-se que se aproximam muito, visto que os autores encontraram, no máximo, 3 cromatinas sexuais nas amostras masculinas, tanto nos exames de pele quanto nos de esfregaço bucal. Os resultados aproximam-se, também, dos encontrados pelos autores nas

células das amostras femininas de esfregaço bucal, de 18 a 87 cromatinas sexuais por amostra, com média de 38,6%, e são superiores aos encontrados nas amostras de células epiteliais, de 22 a 57 cromatinas sexuais por amostra, com média de 33,33%.

Não observamos coincidência dos resultados da presente pesquisa com os apresentados por PANSEGRAU & PETERSON, pois os autores encontraram uma média de 97,6% de cromatina sexual nas células femininas e 9 % das células masculinas contendo 1 corpúsculo de cromatina. A menor incidência de cromatina sexual encontrada pelos autores em células femininas foi de 92% em uma amostra, enquanto que a mais alta incidência nas amostras masculinas foi de 14% em uma amostra.

Comparando os resultados da presente pesquisa com os valores atribuídos como padrão por LOCKHART, pode-se analisar que estavam inferiores aos da autora, que encontrou 7% de positividade no grupo masculino, de 22% a 68%, no grupo de jovens na pré-puberdade e uma taxa de 60 a 87% de positividade para o grupo de mulheres adultas.

Os resultados da presente pesquisa concordam com os resultados obtidos, por TOWNSEND et al., de contagens de cromatinas sexuais nas

células femininas, entre 20 e 80% de positividade, enquanto que as masculinas ficam entre 0 e 5% positivas.

Os resultados obtidos por MUKHERJEE & SANSEBASTIAN, de 51% a 94% de núcleos de células femininas com cromatina sexual, foram mais elevados que os verificados na presente pesquisa. Destacamos, também, a observação dos autores de que a alta frequência poderia estar relacionada com a densidade das células, em torno de 1 a 8 células por 0,01mm<sup>2</sup> na superfície da cultura, com os diferentes métodos de coloração ou com os procedimentos de contagem.

Analisando os trabalhos de NAGAMORI, não puderam ser estabelecidas comparações com os trabalhos que foram efetuados em 1978, pois que o autor pesquisou apenas a cromatina Y.

Em 1986, o mesmo autor e colaboradores, pesquisaram a cromatina X e Y, sendo que seus resultados aproximaram-se dos encontrados na presente pesquisa. Os núcleos das amostras masculinas, de esfregaço bucal, com o uso da coloração com acrinoflavina, apresentaram uma frequência de 0 a 4% de cromatina sexual, com a média de 1,2% e, nas amostras dos núcleos de bulbo capilar, apresentaram de 0 a 5%, com a média de 1,3%. Os resultados dessa pesquisa apresentaram, nas amostras

femininas, uma frequência maior do que a verificada em nossos estudos, que foram: 58% a 87% (média igual a 71,3%) nas células da mucosa bucal e, de 59% a 85% (média igual a 67,1%) nas amostras dos núcleos de bulbo capilar.

Em 1989, NAGAMORI também usou a coloração de Feulgen e os resultados, então obtidos, pouco diferiram dos anteriores.

Ainda que YEN *et al.* tivessem observado a cromatina sexual X em mulheres divididas em 3 grupos, um dos quais abrangia faixas etárias semelhantes ao do grupo de estudo da presente pesquisa, os resultados deste trabalho diferem totalmente em comparação com os daqueles autores, pois pôde ser observado que encontraram frequências inferiores, mesmo no grupo que apresentava maior incidência, que foi o das jovens, com a média de 29,46% .

Com relação aos estudos de DUFFY *et al.*, no Canadá, nossa pesquisa é coincidente no que se refere à identificação do sexo através da polpa dentária, pois que os autores também encontraram 100% de identificação pela presença da cromatina sexual em polpas de dentes. Todavia, não pudemos estabelecer outras comparações dos nossos resultados com os desses autores pois as amostragens e metodologia

utilizados foram totalmente diferentes dos estudos realizados na presente pesquisa.

ADACHI, em 1988 e 1989, estudou o sexo genético usando a polpa dentária, não sendo possível, porém, estabelecermos análise comparativa com nossos resultados, em qualquer fase de seus achados, pois o autor pesquisou apenas a freqüência da cromatina Y.

Do mesmo modo, não se pode estabelecer pontos de comparação com os trabalhos de SENO & ISHIZU e WHITTAKER et al., pois os autores usaram a polpa dentária para a determinação sexual detectando a freqüência da cromatina Y.

Não nos foi possível estabelecer comparações quantitativas entre os resultados da presente pesquisa com os divulgados no trabalho publicado por DANGE et al., em que os autores relatam suas experiências para determinar a presença da cromatina sexual X e da cromatina Y, paralelamente entre mulheres e homens de diferentes faixas etárias, pois eles não se reportaram às freqüências da incidência por grupo de idade ou sexo.

Como pode ser verificado nos resultados da presente pesquisa, a ausência da cromatina sexual nos núcleos das células identificava o sexo masculino, que foi a mesma interpretação dada por BESSAS & MICHALAS.

Contudo, a incidência, ainda que mínima, em amostras masculinas, nos resultados da presente pesquisa, permite também um diagnóstico correto para o sexo masculino e essa incidência confronta com os estudos de MOORE & BARR que atribuíram a ausência de cromatina sexual ao sexo masculino.

GRIGNASCHI et al., consideraram que não havia um modo de diferenciar, morfológicamente, os corpúsculos sexuais encontrados nas amostras masculinas, e mesmo que atribuíssem esses achados à formações cromatínicas não específicas, não poderiam deixar de registrá-los.

Os resultados encontrados no grupo masculino da presente pesquisa, sugerem uma concordância com a análise de TOWNSEND et al. de que o aparecimento de estruturas semelhantes aos corpos de cromatina sexual em células masculinas é provavelmente avaliada pela ocorrência de material nuclear agregado de tal modo que simula o aparecimento visto nas células femininas.

DAHER também observou que os acúmulos de heterocromatina nos núcleos interfásicos podiam dar uma aparência de corpúsculos de Barr em amostras masculinas e portanto alguns laboratórios consideram normal o índice de 2 a 4% de positividade nos homens.

A tese de que a presença de cromatina sexual em 9% das amostras masculinas deve ser interpretada com cautela, pois poderiam ser grumos de cromatina que retinham o corante e não cromatina sexual, é reforçada pela observação de PANSEGRAU & PETERSON, que verificaram uma incidência de 11,7 % de duas cromatinas em células femininas.

Ainda que, no presente trabalho, não tenha sido quantificado o dado a seguir relatado, pode-se observar que a cromatina sexual localizava-se freqüentemente ligada à membrana nuclear, como relataram LEVIJ & CAREL, cujos estudos demonstraram que as partículas de cromatina sexual estão sempre ligadas à membrana nuclear.

Quanto a esse mesmo enfoque, BELMONT et al., em Baltimore, analisando as posições da cromatina sexual em fibroblastos humanos, também demonstraram que esses corpúsculos cromatínicos estavam

localizados, preferencialmente, na periferia nuclear e, que somente uma pequena quantidade estava localizada mais centralmente.

MOORE & BARR encontraram entre 40 a 60% de cromatina sexual localizada periféricamente e observaram que nessa posição era mais facilmente identificada.

PANSEGRAU & PETERSON também verificaram que em todos os casos por eles examinados havia um número maior de cromatina periférica do que central nas amostras de indivíduos do sexo feminino, e havia um número maior de cromatina central do que periférica em todas as células de indivíduos do sexo masculino.

Os resultados da presente pesquisa não puderam ser comparados com os de GARZA-CHAPA et al., pois os autores relataram trabalhos através dos quais buscaram determinar as porcentagens de cromatina sexual em amostras de epitélio bucal obtidas durante as fases inicial, média e final do ciclo menstrual, com o objetivo de observar a influência de fatores hormonais.

Estudaram, ainda, porcentagens de cromatina sexual encontradas em mulheres menopáusicas normais, insulino-dependentes, ou portadoras

de hiperplasia supra-renal, todas em variadas idades. Esse método foi totalmente diferente do utilizado em nossos trabalhos, e esses autores apresentaram valores inferiores aos percentuais encontrados em nossas pesquisas, mas, demonstraram que ocorria uma diminuição mais evidente na frequência da cromatina sexual quando aumentavam os níveis de estrógeno do que quando aumentam os níveis de progesterona.

Ainda que a análise de alguns dados que serão relatados a seguir, possa parecer, em primeira instância, estar além dos limites dessa discussão de resultados, é de interesse ao presente trabalho, destacar alguns aspectos que de um certo modo, tem uma correlação direta com a interpretação dos dados obtidos.

Citamos, pois, que quanto à diversidade dos valores normais de positividade encontrados pelos pesquisadores, deve-se levar em consideração a variação dos métodos de coloração empregados na preparação das lâminas, morfológicos ou citoquímicos, e a metodologia da contagem dos corpúsculos.

Alguns pesquisadores, como BLANCO & MACAGNO e GRIGNASCHI et al., relataram a contagem da cromatina sexual apenas na posição periférica, aderida à membrana nuclear. Outros, como

WATANABE & ENDO, incluíram, na contagem, a incidência da cromatina sexual em qualquer posição. Por outro lado, foram também verificadas divergências quanto à inclusão, na contagem, de acordo com a densidade (MUKHERJEE & SANSEBASTIAN) e a identificação precisa da cromatina sexual (BEREMBAUM).

Como sugerem TOWNSEND et al., a apresentação de freqüências baixas de cromatina sexual poderia ser interpretada em decorrência de fatores que poderiam influir na ativação e desativação periódica, tal como o ciclo menstrual. Também sugeriram que o estrógeno tinha um papel maior na ativação do cromossomo X durante o ciclo menstrual, e que o declínio na contagem da cromatina sexual poderia estar relacionada com os níveis elevados de estrógeno.

LEVIJ & CAREL, relataram que observaram a seguinte variação da freqüência da cromatina sexual de acordo com as fases do ciclo menstrual: do 1º ao 7º dia, de 46 a 68; do 8º ao 10º dia, de 51 a 76 e do 11º ao 28º, de 46 a 67 cromatinas sexuais por amostra.

GARZA-CHAPA et al., estudando também a variação da freqüência da cromatina sexual durante o ciclo menstrual, encontraram os

seguintes resultados: 18,3% na fase inicial do ciclo menstrual, 21,2% na fase média e 16,5% na fase final.

Esses relatos evidenciam a ocorrência de uma porcentagem mais alta de cromatina sexual na fase média do ciclo menstrual, e nos trazem um maior entendimento dos resultados encontrados na presente pesquisa, pois sugerem a interferência desse fator na variação da incidência da cromatina sexual no grupo de estudos dos indivíduos do sexo feminino.

Entretanto, não pode ser omitido nesta discussão, que CECI & SARNELLA não observaram qualquer diferença significativa na variação da contagem durante o ciclo menstrual, negando a existência dessa variação.

É interessante ressaltar as observações feitas por BISHUN & SMETHURST, LOCKHART e CURTIS, com relação ao uso comparativo de frequências de cromatina sexual relatadas por outros pesquisadores, tendo sido sugerido que os pesquisadores deveriam estabelecer seus próprios critérios a respeito da proporção de contagens de cromatina sexual encontradas em tecidos normais, e, a partir desses dados, compararem seus estudos para estabelecer quando ocorria aumento ou diminuição da frequência em função da interferência de outros fatores, como tumores, idade, ciclo menstrual e outros.

Com base nesse posicionamento, CURTIS estabeleceu, de acordo com suas pesquisas, como medida de controle para mulheres normais, uma média de 40,8%, de freqüência de cromatina sexual, com uma variação de 38,3% a 43,4%. Como pode ser observado, tais valores são inferiores aos encontrados nos resultados da presente pesquisa.

Essa colocação, analisada conjuntamente com as observações de LOCKHART, que relatou a importância de se observar que as freqüências variam em função dos diferentes métodos de coloração usados pelos investigadores, do tipo de material coletado, e do critério de contagem, permite que se possa entender que é possível a identificação correta do sexo através da cromatina sexual, ainda que a literatura nos apresente uma considerável variação da freqüência da cromatina sexual.

Isso posto, evidencia-se a importância pericial da polpa dentária, não só quando se trabalha com amostras limitadas, mas, por preservar, graças ao seu arcabouço protetor, vitais informações que serão úteis ao legista.

# **CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES**

Pela análise dos dados gerais obtidos, no presente trabalho, e após a observação de todos os resultados encontrados, podemos apresentar as seguintes conclusões:

1. Todos os indivíduos do sexo feminino tiveram a correta identificação sexual através da presença da cromatina sexual na polpa dentária, ou seja, ocorreu 100% de correlação entre o resultado obtido e o sexo conhecido do indivíduo.

2. Todos os indivíduos do sexo masculino tiveram a correta identificação sexual, em 100% dos casos, através da ausência da cromatina sexual na maioria das amostras.

3. As freqüências de cromatina sexual, nas amostras dos indivíduos do sexo feminino, são comparativamente altas em relação as amostras dos indivíduos do sexo masculino.

4. A diferença, entre os sexos, quanto à incidência de células com cromatina sexual permite determinar o sexo genético examinando-se os fibroblastos da polpa dentária, quanto à quantificação da cromatina sexual.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ADACHI, H. Studies on sex determination using human dental pulp. I. The observation of Y-chromatin for the paraffin section using quinacrine mustard staining. Nippon Hoigak Zasshi, v.42, n.1, p.38-41, 1988. Abstract.
- 02 \_\_\_\_\_. Studies on sex determination using human dental pulp. II. Sex determination of teeth left in a room. Nippon Hoigak Zasshi, v.43, n.1, p.27-39, 1989. Abstract.
- 03 ARAGONÉS, J.; EGOZCUE, J. A method for Sexing 90-day-old blood stains in absorbent and nonabsorbent materials. Acta Genet Med. Gemelloi., v XXII., p113-116, 1973.
- 04 ARBENZ, G.O. Introdução à Odontologia Legal. São Paulo: 1959, cap.1, p.11-16, cap.IX, p.76-79.
- 05 BARR, M.L.; BERTRAM, E.G. A morphological distinction between neurons of the male and female and the behaviour of the nucleolar

satellite during accelerate nucleoprotein synthesis. Nature, vol.163, p.676-677, Apr., 1949.

06 BARR, M.L. Sex chromatin and phenotype in man. Science, p.679-685, v.130, n.3377, 1959.

07 \_\_\_\_\_, The Significance of Barr-Body, in Internacional Review of Cytology. New York: Academic Press, 1966, v. 19, p. .

08 BELMONT, A.S. et al. The relative intranuclear positions of Barr bodies in XXX non-transformed human fibroblasts. Exp Cell Res, v.1, p.165-179, 1986.

09 BERENBAUM, M.C. Determination of sex in granulopoietic cells of mice and rats. Nature, v.188, p.603-604, 1960.

10 BESSAS, G.; MICHALAS, S. Une application diagnostique de la chromatine sexuelle. Gynecol Prat, v.4, p.229-236, 1968.

- 11 BIANCHI, N.O. Mechanisms of Sex determination in mammals. Medicina, v.5, p.563-570, 1973.
- 12 BISHUN, N.; SMETHURST, M. Value of Sex chromatin analysis in human neoplasia. Cancer Genet Cytogenet, p. 363-378, 1983.
- 13 BLANCO, A. M.; MACAGNO, G.R. Estudio comparativo de los distintos métodos (morfológicos y citoquímicos) empleados para la determinacion de cromatina sexual. Acta Bioquím Clín Lationoam, v.XVIII, n.4, p.579-587, 1984.
- 14 BLANCO DE DEL CAMPO, M.S.; RAMIRES, O.E.G., Fluctuations of the Sex chromatin during the menstrual cycle. Acta Citol., v.9, n.3, p.251-256, 1965.
- 15 BOURGEOIS, C.A. et al. New data on the in situ position of the inactive X chromossome in the interphase nucleus of human fibroblasts. Hum. Genet., v.69, n.2, p.122-129, 1985.

- 16 CASPERSSON, T. et al. Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei. Exp. Cell. Res. v.61, p.472-474, 1970.
- 17 CECI, G.P.; SARNELLA, A. La cromatina di Barr ed il ciclo mestruale. Rivista Ital Ginec. p.593-598, 1966.
- 18 CHOWDHURY, M.D.; CHOWDHURY, J.R. Distribution of Sex chromatin in exfoliated cervical cells under different physiologic and pathologic conditions. Indian J Pathol Microbiol, v.27, n.3, p.215-222, 1984.
- 19 CLARK, D.H. Dental Identification problems in the Abu Dhabi air accident. Am. J. Forensic Med. Pathol. v.7, n4, p. 317-321, 1986.
- 20 COSTA, A.C.; CHAVES, P.R. Manual de Técnica Histológica – guia de Trabalhos Práticos. Lisboa: Portugália, 1943, cap. XI, pg. 208-227.
- 21 CURTIS, D.J. Sex chromatin frequency in buccal mucosa tissue: the normal female population. Cytogenetics. v.8, n.1, p.20-29, 1969.

- 22 DAHER, V. et al Cromatina de Barr: análisis de su valor actual. Rev Chil Pediatr, v.57, n.6., p.506-509, 1986.
- 23 DANGE, A.H. et al. Determination of the sex origin of teeth. Arch Kriminol, p.115-119, 1978.
- 24 DAVIS, JR.; PENNY, R.J. Improved fluorescence method for identifying sex chromatin in formalin-fixed tissue. Am J Clin Pathol, v.75, p.731-733, 1981.
- 25 DOLAN, S.B.E. Sex chromatin incidence and the human menstrual cycle. Acta Cytol, v.12., n.2, p.128-130, 1968.
- 26 DUFFY, J.B. et al. Isolation of tooth pulp cells for sex chromatin. Forensic Sci Int., v.49, n.2, p.127-141, 1991.
- 27 DULANTO, R.J.D. Frequências de cromatina sexual em diferentes regiões do corpo feminino. Memória apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Out., 1970

- 28 GALVÃO, L.C.C. Estudos Médico-legais. Porto Alegre: Sagra-DC Luzzatto, 1996, cap. 3, p.33-36, cap. 10, p.125-131.
- 29 GARZA-CHAPA, R. et al. Accion de factores hormonales sobre la frecuencia de cromatina sexual. Ginec Obstet Mexico, v.42, n.252, p.257-268, 1977.
- 30 GATTAS G.J.F. et al. Diagnóstico do sexo em crostas de sangue através da identificação da cromatina Y: aplicação médico legal. Rev. Paul. Med., vol.103, n.2, p.73-82, 1990.
- 31 GOMES, H. Medicina Legal. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1997, cap. 4, p.51-71.
- 32 GRAHAM, M.A. Sex chromatin in cell nuclei of the cat from the early embryo to maturity. Anat Rec, v.119, p.469-491, 1954.
- 33 GRIGNASCHI, V.J. et al. Diagnostico citologico del sexo por observacion de la cromatina. Rev Asoc Med Argent, v.74, n.1, p.512-528, 1960.

- 34 HUNT, JR., E.E.; GLEISER I. The estimation of age and Sex of preadolescent children from bones and teeth. Am. J. Phys. Anthropol., p.389-487, 1955.
- 35 INTRONA, F.J. et al. Sex determination by discriminant analysis of patella measurements. Forensic Sci Int. V.95, p.39-45, 1998.
- 36 JACOBS, P.A. et al. Abnormalities involving the x-chromosome in women. Lancet., v.1, may, p.1213-1216, 1960.
- 37 KEGEL J.; CONEN P.E., Nuclear sex identification in human tissues. Am. J. Clin Pathol. v.57, n.4, p.425-430, 1972.
- 38 KEYNES, R.D. The predetermination of sex. Adv. Sci., V.24, n.119, p.43-46, 1967.
- 39 LASO, L. G. et al. Valoracion Estadística de la cromatina sexual. Rev Clínic Esp, tomo 101, n.4, p.282-286, 1966.
- 40 LEITE, V.G. Odontologia Legal, Bahia : Era Nova, 1962, cap.1º , p. 7-12, cap.2º , p.13-33.

- 41 LEVIJ, I. S.; CAREL, R. Variations in the incidence of sex chromatin – a reappraisal. Acta Cytol, v.12, n.5, p.352-357, 1968
- 42 LYON, M.F. Gene action in the X-chromossome of the mouse (mus musculus L.). Nature, v.190, n.4773, p.372-373, 1961
- 43 LOCKHART, L. Sex Chromatin Studies. Ala. J. Med. Sci., v.3, n.4, p.500-502, 1966.
- 44 MOORE, K.L.; BARR M.L. Smears from the mucosa in the detection of chromosomal sex. Lancet, p.57-58, 1955.
- 45 MUKHERJEE, A.B.; SANSEBASTIAN, J.R. Differential frequency of human X and Y chromatin as related to cell density in vitro. Cytogenet Cell Genet., n.21, p.139-144, 1978.
- 46 NAGAMORI, H. et al. Sex determination from buccal mucosa and hair root by the combined treatment of quinacrine staining and the fluorescent reaction using a single specimen. Forensic Sci Int, p.119-128, 1986.

- 47 NAGAMORI, H. Sex determination from human somatic cells. n.43, v.5, Jpn. J. Leg. Med., p.358-63, 1989.
- 48 \_\_\_\_\_ . Sex determination from plucked human hairs without epithelial root sheath., v.12., p.167-173, Forensic Sci Int., 1978.
- 49 OLIVEIRA, D. A; CABRAL, S.E.S.X.; ALENCAR, V.H.M. Sinopse de Medicina Legal. Fortaleza: 1997, cap.IV, p. 33-40.
- 50 PANSEGRAU, D.G.; PETERSON, R.E. Improved staining of sex chromatin. Am J Clin Pathol, v.41, n.I, p.266-272, 1964.
- 51 PEARSON, P.L.; BOBROW, M. Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. Nature, v.226, p.78-80, 1970.
- 52 PRINCE, R.H. et al. Nuclear morphology, according to sex, in *Macacus rhesus*, Anat Rec, v.122, p.153-171, 1955.
- 53 PUEYO, V.M.; GARRIDO, B.R.; SANCHEZ, J.A. Odontologia Legal Y Foresen. Spain: Masson, 1994, cap. 1, p.3-10.

- 54 QUEZADA, O. et al. Determinacion del sexo prenatal en celulas del liquido amniotico. Rev Chil Obstet Ginecol., v.XLI, n.2, p.116-119, 1976.
- 55 ROEDE, M.J. Sex chromatin scores in oral mucosa and hair root sheaths of human females. Acta Morphol. Neerl. Scand., p.269-274, 1977.
- 56 SAMPAIO, L.C.R.F. et al. Frequency of X-chromatin in pregnant women during the second trimester of gestation. Rev Paul Med, v.110, n.5, p.195-199, 1992.
- 57 SENO, M.; ISHIZU, H. Sex identification of a human tooth. Int. J. Forensic Dent. v.8-11, p.8-11, 1973.
- 58 SIEBERS, J.W. et al. Original Investigations : antenatal Sex determination in blood from pregnant Women. Humangenetik. V.28, n. 4.1975, p. 273-280, 1975.
- 59 SMITH, D.W. et al. Lower Incidence of Sex chromatin in buccal smears of newborn females. Pediatrics, v.30, n.5, p.707-711, 1962.

- 60 TAYLOR , A .I. Sex chromatin in the newborn. Lancet, v.1 , p.912-915, 1963.
- 61 TOWNSEND, J.F. et al. The Sex chromatin count in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynec., v.108, n.4, p.585-587, 1970.
- 62 WATANABE, T.; ENDO, A. A simple technique for sex chromatin analysis in amniotic cells of mouse and rat embryos. Stain Technol., n.63, v.3, p.149-154, 1988.
- 63 WHITTAKER, D.K. et al. Sex determination from necrotic pulpal tissue. Brit Dent, v.139, p.403-405, 1975.
- 64 WYANDT H.E. HECH F. Detection of the X-chromatin body in human fibroblasts by quinacrine fluoromicroscopy. Lancet, p.1379-1380, 1971.
- 65 YEN. F.F. et al., X-chromatin and chromosome examination in aged women. Mech Ageing and Dev, n.16, p.55-60, 1981.