

ESTUDO COMPARATIVO DE VÁRIOS MÉTODOS PARA A CROMATINA X EM RECÉM NATOS

YOUHANNA SABBAG *
LÍDIA SABBAG UTRILLA *
VALTER CURI RODRIGUES *

SABBAG, Y., UTRILLA, L.S. & RODRIGUES, V.C. — Estudo comparativo de vários métodos para evidenciação da cromatina X em recém natos. *Rev. Odont. UNESP*, 8/9:19-25, 1979/1980.

RESUMO: Foram analisados em termos comparativos, os seguintes métodos de coloração empregados para a demonstração da cromatina sexual no microscópio comum: Hematoxilina de Harris, Cresil violeta, Shorr, Tionina, Guard e Reação de Feulgen. Concluiu-se pela superioridade do método de Guard, pois proporcionou melhores condições de diferenciação dos elementos cromatínicos. Salienta-se, ainda, a possibilidade de se utilizar, com bons resultados em laboratório de citologia exfoliativa, o método de Shorr.

UNITERMOS: Cromatina X, Cromatina Sexual, Citologia Exfoliativa, Métodos de Coloração.

Os estudos realizados por BARR e BERTRAN em 1949 sobre o aglomerado cromatínico observado no núcleo interfásico, junto ao nucléolo, nos neurônios da gata, constituem o ponto de partida para uma série de trabalhos científicos que enfocaram o dimorfismo sexual, baseados na detecção desse elemento. As aplicações clínicas desse achado surgiram a partir de 1953, com os trabalhos de MOORE e BARR (1953) que estudaram essa cromatina em várias ordens de mamíferos e posteriormente confirmaram sua existência na espécie humana (MOORE e BARR, 1954).

A determinação dessa partícula constitui o teste da cromatina, através do qual, reconhece-se o sexo cromatínico ou nuclear. As células são consideradas positivas quando estão presentes esses elementos no núcleo, e negativas quando ausentes.

As células somáticas apresentam portanto, diferenças relacionadas com o sexo, o dimorfismo celular sexual determinado por essa partícula. Esse achado, longe de ter valor meramente acadêmico, trouxe implicações de grande importância biológica e clínica, oferecendo subsídios valiosos, pa-

* Disciplina de Histologia e Embriologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, São Paulo, Brasil.

ra avaliação correta dos distúrbios genéticos ligados as alterações sexuais.

Esse método foi demonstrado (MOORE e BARR, 1955; MERBERGER e cols. 1955) que o teste para visualização da cromatina sexual pode ser realizado simplesmente com um esfregão das células que se desquamam quando a superfície interna da bochecha é raspada com uma espátula. O esfregão bucal é material de fácil obtenção, por manobras não cruentas, indolores e permitindo várias repetições quando necessário, possibilitando o estudo com conclusões fiéis, razão pela qual tem se constituído no método de eleição. A cromatina sexual, na citologia oral, entretanto apresenta-se, às vezes em percentual muito baixo (25 a 30% de células femininas) e com volume menor que o encontrado em outros tecidos (BARR, 1960) dificultando o seu estudo e obrigando o exame de cerca de 100 células.

Nesse material, a cromatina sexual apresenta-se como uma massa plano-convexa, pequena, tamanho médio de 1 micrômetro, constituída de material heterocromático, situada junto a membrana nuclear, em sua face interna.

Segundo BARR e cols. (1950), essa partícula além de sua localização junto à membrana poderia ser encontrada em outras regiões nucleares. Nos neurônios situa-se adjacente ao nucléolo, razão pela qual foi chamada originariamente de satélite nucleolar, distinguindo-se deste pela coloração seletiva de Feulgen, já que é constituído de D.N.A.

Após estudos de OHNO e cols. (1959), LYON (1962), RUSSEL e cols. (1959) e BEUTLER (1959), ficou provado que a cromatina sexual é um

cromossoma X, inativo, heterocromático que se enrola apertadamente durante a interfase constituindo assim um corpúsculo suficientemente denso para ser visualizado, quer com coloração na microscopia ótica, quer a fresco na microscopia de contraste de fase. Entretanto, dificuldades para sua evidênciação em citologia oral, já apontadas, levaram-nos a analisar, comparativamente, os vários métodos de coloração utilizados para visualização da cromatina sexual em esfregaços da mucosa oral de recém nascidos.

Material e Método

Para esta pesquisa, utilizou-se material obtido de 140 recém nascidos de ambos os sexos, sendo 100 femininos e 40 masculinos da Maternidade "Gota de Leite" e Maternidade "Yolanda Carvalho Filho" da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara.

Esse material foi colhido por leve escarificação da mucosa da bochecha, com espátula de madeira, nos intervalos das mamadas, desprezando-se a primeira escarificação, com a finalidade de se obter células das camadas mais profundas, onde os núcleos são volumosos. O material obtido foi distribuído sob a forma de esfregão fino, em 6 lâminas e fixado em álcool-éter.

Para a análise morfológica da cromatina sexual foram usados os seguintes métodos de coloração: hematoxilina de Harris, reação de Feulgen e Rossembeck (segundo PEARSE, 1960), reação para tionina (KLINGER e LUDWIG, 1957), cresil violeta (MOORE e BARR, 1953), reação de Shorr (FREIRE e cols. 1974) e de Guard (1959).

As leituras ao microscópio foram feitas com grande aumento (450x) e

depois em imersão (1000x), deslizando-se a lâmina de um lado para o outro, à semelhança do que se faz na contagem das células sanguíneas. Considerando-se somente células não sobrepostas, de núcleo vesiculoso e carioteca bem delimitada. Foram analisados 100 núcleos e estabelecido o percentual de frequência dessa cromatina.

Resultados e Discussão

O estudo comparativo entre os vários métodos permitiu-nos eleger o de Guard, apesar desta técnica ser a mais complexa e com tempo de coloração prolongada. Esse método permitiu boa diferenciação dos elementos nucleares, possibilitando, assim a distinção da cromatina sexual de tamanho às vezes bastante reduzido. Foi o método que apresentou menos interferência de elementos estranhos que pudessem trazer confusão à leitura. A cor avermelhada da cromatina sexual não foi evidenciada na grande maioria dos preparados, que a distinguiria dos outros elementos cromáticos do núcleo, descritos nesse método (Fig. 1).

Computamos em nossos resultados apenas a presença dessa partícula junto à membrana do núcleo, embora se saiba que sua projeção possa ser feita em outras partes deste, como foi demonstrado por NAHOUM e colabs. (1969). Esse autor demonstrou em cortes histológicos, com técnicas especiais, que a cromatina sexual existe praticamente em 100% das células.

Os métodos de cresil violeta e o de Feulgen foram os primeiros a serem utilizados, permitiram evidenciação da cromatina sexual de forma razoável em nosso material, confundindo-se essa partícula com os outros ele-

mentos cromáticos do núcleo acrescido do fato de que as bactérias, quando presentes coram-se principalmente com o último e podem trazer sérios embaraços a leitura.

A hematoxilina de Harris ofereceu maior dificuldade para a pesquisa dessa partícula sendo superada pelos outros métodos.

O método da tionina, que nos pareceu durante algum tempo, pela sua simplicidade e fidelidade de resultados, atender aos interesses desta pesquisa, tendo inclusive sido eleito como melhor método de coloração, teve que ser abandonado pela dificuldade de montagem e conservação das lâminas e pelas alterações que o material sofre com o tempo (Fig. 2).

O método de Shorr (Hematoxilina), de acordo com a técnica utilizada de rotina em colpocitologia, permitiu a evidenciação dessa partícula, de modo satisfatório, melhorando os resultados quando se utiliza hematoxilina diluída a 1/10. Esses achados estão de acordo com a observação de FREIRE e colabs. (1974) e revestem-se de especial interesse na prática por permitir estudo da cromatina sexual em laboratórios de colpocitologia, sem a necessidade de métodos especiais de coloração, aproveitando-se assim sua rotina laboratorial (Fig. 3).

Resumo e Conclusões

Os autores analisaram, em termos comparativos, os seguintes métodos de coloração empregados para a demonstração da cromatina sexual no microscópio ótico comum: Hematoxilina de Harris, Cresil violeta, Shorr, Tionina, Guard e Reação de Feulgen.

Dos métodos testados para o estudo da Cromatina X, o de Guard foi o que ofereceu melhores resultados

para a evidencição dessa partícula. O método de tionina, embora fiel nos resultados, foi preterido pela dificuldade de montagem e pelas alterações sofridas com o tempo. Nos laborató-

rios de Citologia, aproveitando a rotina de coloração, pode-se utilizar, com bons resultados, também o método de Shorr.

SABBAG, Y., UTRILLA, L.S. & RODRIGUES, V.C. — A comparative study of various coloration methods for the sexual cromatina (X cromatine) in newborns. *Rev. Odont. UNESP*, 8/9:19-25, 1979/1980.

SUMMARY: The authors comparatively analysed the following coloration methods for the evidency of sexual cromatine: Harris hematoxylin, Tionin, Shorr, Cresyl Violet, Guard's and Feulgen reactions.

They atested the superiority of Guard's method for it provides better conditions for the visualization of the cromatine elements, although they also concluded that Shorr's method can be used with good results.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARR, M.L. & BERTRAN, E.G. 1949. A morphological distinction between neurones of the male and behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleus protein syntesis. *Nature*, 163:676-677.
- BARR, M.L. et al. 1950. The morfology of the nerve cell nucleus according to sex. *Anat. Rec.*, 107:283-297.
- BARR, M.L. 1960. Sexual demorphism in interphase nuclei. *Am. J. Hum. Gent.*, 12:118-127.
- BEUTLER, E. 1959. The hemolytic effect of primaquine and lated compounds. *Review Blood*, 14:103-139.
- FREIRE, N.S., CASTELLAR, D., BARCELLOS, J.M., HENRIQUES, C.A., NAHOUM, J.M. & BORGES, V. 1974. Cromatina X, nossa técnica de estudo. *Ars Curandi*, 7(2):26-27.
- GUARD, H.R. 1959. A new technic for differential staining of the sex chromatin and the determination of its incidence in exfoluated vaginal epithelial cells. *Amer. J. Clin. Path.*, 31:145-151.
- KLINGER, H.P. & LUDWIG, K.S. 1957. A universal stain for the sex chromatin body. *Stain Technol*, 33:232-235.
- LYON, M.F. 1962. Sex chromatin and gene action in the mamalian X-Chromosome. *Am. J. Hum. Genet.*, 14:135-148.
- MERBERGER, E. et al. 1955. Oral smear as a method of chromosomal sex detection. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 89:483-489.
- MOORE, K.L. & BARR, M.L. 1953. Morphology of the nerve cell nucleus in mammals, with special reference to the sex chromatin. *J. Comp. Neurol.*, 98:213-231.
- MOORE, K.L. & BARR, M.L. 1954. Nucleus morphology according to sex, in human tissue. *Acta. Anat.* 21:197-208.
- MOORE, K. L. & BARR, M. L. 1955. Smears from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. *Lancet*, 2:57-58.

- NAHOUM, J.C. & BARCELLOS, J.M. 1969. Cromatina X — Noções fundamentais. Técnicas e uso clínico. *An. bras. Gin.*, 67:283-306.
- OHNO, S. et al. 1959. Formations of the chromatin by single X-Chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell. Res.* 18:415-418
- PEARSE, A.G.E. 1960. Histoquímica — Teórica y aplicada. Madrid, Aguilar p. 118.
- RUSSEL, W.L. et al. 1959. Exceptional inheritance of a sex linked gene in the mouse explained on the basis that the X/O sex chromosome constitution is female. *Proc. Not. Acad. Sci.*, 45:544-560.

Recebido para publicação em 11-02-80

LEGENDAS

- Fig. 1. Citologia bucal. Célula intermediária onde se observa cromatina X junto à carioteca. Guard, 1000x.
- Fig. 2. Citologia bucal. Células intermediárias notando-se em ambas cromatina X junto a carioteca, bactérias bem coradas. Tionina, 1000x.
- Fig. 3. Citologia bucal. Células intermediárias observando-se cromatina X junto à carioteca para diferenciação dos elementos cromatínicos. Shorr, 1000x

