



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

*Campus São Gabriel*

ANÁLISE DO POLIMORFISMO P72R DO GENE TP53 E SUA  
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A GEMELARIDADE EM CÂNDIDO  
GODÓI, RS.

MARIANA DE OLIVEIRA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ANÁLISE DO POLIMORFISMO P72R DO GENE TP53 E SUA  
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A GEMELARIDADE EM CÂNDIDO  
GODÓI, RS.

MARIANA DE OLIVEIRA

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de  
Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Ricardo José Gunski

Rio Grande do Sul

**Dezembro de 2010**

ANÁLISE DO POLIMORFISMO P72R DO GENE TP53 E SUA  
POSSÍVEL RELAÇÃO COM A GEMELARIDADE EM CÂNDIDO  
GODÓI, RS.

MARIANA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: RICARDO JOSÉ GUNSKI

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof.

---

Prof.

---

Prof.

São Gabriel, dezembro de 2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

### **OLIVEIRA, Mariana**

Análise do polimorfismo P72R do gene TP53 e sua possível relação com gemelaridade em Cândido Godói, RS./Mariana de Oliveira. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2010  
[43] f.: 30 cm.

Orientador: Ricardo José Gunski

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2010

Referências: f. [24-27].

1. [Genética]. 2. [Gemelaridade] – Monografia I. [Gunski], [Ricardo José]. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de realizar este trabalho, o apoio e incentivo durante o mesmo ao meu orientador Ricardo José Gunski e a minha co-orientadora Lavínia Schüller Faccini.

Agradeço as críticas, sugestões e toda ajuda que recebi de Alice Tagliani Ribeiro, assim como de Adriana Koslovski Sassi, contribuindo imensamente para a finalização deste trabalho.

E também a todos aqueles que contribuíram de forma indireta para realização deste trabalho, sem esquecer os familiares e amigos, pelo apoio constante.

## RESUMO

ANÁLISE DO POLIMORFISMO P72R DO GENE TP53 E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A GEMELARIDADE EM CÂNDIDO GODÓI, RS.

O município de Cândido Godói, localizado no noroeste do Rio Grande do Sul, possui um elevado índice de nascimentos gemelares, servindo como fonte para estudos que buscam entender os mecanismos que estão envolvidos com o fenômeno. O objetivo do presente trabalho é comparar a frequência do polimorfismo P72R do gene TP53 em mulheres com e sem histórico de nascimentos gemelares para, se possível, correlacionar com o fenômeno da gemelaridade em Cândido Godói. O DNA foi extraído de amostras de sangue e o polimorfismo foi genotipado por PCR em tempo real. Foram genotipadas 42 mães de gêmeos e 101 mães de não gêmeos. Após as análises estatísticas foi observada uma diferença nas frequências alélicas ( $p= 0,0006$ ) e genotípicas ( $p= 0,007$ ) entre casos e controles. Quando a análise foi feita controlando as mulheres pelo coeficiente de consanguinidade (F), não se obteve diferença estatística, porém vemos que há uma tendência de mulheres com um F maior possuírem o genótipo CC. Como o alelo C é considerado um fator de risco para falha da implantação do blastocisto, os resultados aqui obtidos foram o contrário do esperado. Mães de gêmeos possuem o alelo C em maior frequência do que as mães controle. Uma explicação para esse achado seria que, por ser um fator de transcrição para muitos genes, esse polimorfismo esteja afetando outro gene do “caminho da p53”, resultando nas frequências “invertidas” que encontramos no presente trabalho.

Palavras-chave: gêmeos, TP53, Cândido Godói, genética, análise

## *ABSTRACT*

ANALYSIS OF P72R POLIMORPHISM OG TP53 GENE AND YOUR POSSIBLE RELATIONSHIP WITH THE TWINNING AT CÂNDIDO GODÓI, RS.

Cândido Godoi, located in the northwest of Rio Grande do Sul state, has a high note of twin births, serving as a source for the studies that seeking to understand the mechanisms involved in this phenomenon. The aim of this study was to compare the frequency of polymorphism P72R of TP53 gene in women with and without twin births historical to, if possible, correlate with the twinning phenomenon in Cândido Godói. The DNA was extracted from blood samples and the polymorphism was genotyped by real time PCR. Were genotyped 42 mothers of twins and 101 mothers of singletons. After the statistical analysis was observed a difference in the allele frequencies ( $p= 0,0006$ ) and genotypic ( $p= 0,0007$ ) among cases and controls. When the analysis was done controlling the women by the inbreeding coefficient (F), no statistical difference was obtained, but we see that there is a tendency for women with a higher value of F possess the CC genotype. As the C allele is considered a risk factor for failure of blastocyst implantation, the results obtained here were the opposite of the expected. Twin mothers have the C allele in higher frequency than the control mothers. An explanation for this discovery would be that, to be a transcription factor for many genes, this polymorphism may be affecting another gene in the p53 pathway, resulting in the “reversed” frequencies that we found in this study.

Key-words: twins, TP53, Cândido Godoi, genetics, analysis

## SUMÁRIO

Resumo .....	6
<i>Abstract</i> .....	7
Sumário .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Biologia dos gêmeos.....	11
1.1.1. Formação de teratópagos .....	13
1.1.2. Feto papiráceo.....	13
1.2. Distinguindo os tipos de gêmeos .....	14
1.3. Frequência de nascimentos gemelares.....	15
1.3.1. Fatores Ambientais .....	15
1.3.2. Fatores Genéticos .....	17
1.4. Cândido Godói e a gemelaridade .....	18
1.5. Gene TP53 .....	20
1.5.1. O gene TP53 e a fertilidade .....	21
1.5.2. Polimorfismo P72R .....	22
2. OBJETIVOS .....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Amostra .....	25
3.2. Extração, eletroforese, quantificação e diluição do DNA .....	25
3.3. Detecção do polimorfismo .....	26
3.4. Análise estatística .....	28
4. RESULTADOS .....	30
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	32



6. REFERÊNCIAS ..... 34

7. ANEXOS ..... 38

“NÓS, OS ANIMAIS, SOMOS AS MÁQUINAS MAIS COMPLICADAS E MAIS PERFEITAMENTE ELABORADAS EM TODO O UNIVERSO CONHECIDO, SE EXPUSERMOS A QUESTÃO POR ESTE PRISMA, FICA DIFÍCIL ENTENDER COMO ALGUÉM PODERIA DESEJAR ESTUDAR OUTRA COISA.”

Richard Dawkins em O Gene Egoísta

## **1. INTRODUÇÃO**

A gemelaridade é um evento que não pode ser considerado comum na biologia humana, já que esta é adaptada para acomodar tipicamente um único embrião e desenvolvê-lo. Assim, o estudo genético sobre a gemelaridade tem como finalidade averiguar a influência relativa do genótipo e do meio ambiente sobre o fenótipo “ter uma gestação gemelar”.

### **1.1. BIOLOGIA DA GEMELARIDADE**

A formação dos gêmeos pode ser dada de dois modos (Figura 1). Se no momento da ovulação forem expelidos dois ovócitos, ao invés de um, e se ambos forem fertilizados, os zigotos darão origem a um par de gêmeos dizigóticos (DZ), possuindo genótipos diferentes entre si, sendo considerados irmãos da mesma idade, chamados também de fraternos. Por serem oriundos de dois ovócitos fecundados por dois espermatozóides diferentes, gêmeos DZ podem ser do mesmo sexo ou de sexos diferentes. Neste caso a mãe é responsável pela formação dos gêmeos, pois é ela que tem a característica de estar ovulando nos dois ovários ao mesmo tempo. De forma geral as mulheres ovulam um mês em um ovário e no mês seguinte em outro ovário (Beiguelman, 1995).

O outro modo de ocorrência de gêmeos é quando um único zigoto sofre desenvolvimento irregular, originando dois ou mais indivíduos com o mesmo genótipo, já que são oriundos de um único zigoto, sendo conhecidos como monozigóticos (MZ). Estes são sempre do mesmo sexo, já que são frutos do mesmo espermatozóide, que define o sexo do bebê, e do mesmo óvulo (Beiguelman, 2008). Existem várias formas possíveis de gêmeos monozigóticos, dependendo de quanto tempo após a fertilização o embrião se divide. Quando esta divisão ocorre logo após a fertilização os gêmeos serão diamniótico-dicoriônico, ou seja, cada um tem seu próprio âmnio (bolsa) e córion (placenta), este fenômeno ocorre em torno de 8% das gestações gemelares. O tipo mais comum de gêmeos monozigóticos, cerca de 75%, é o diamniótico-monocoriônico, em que a divisão embrionária se dá entre o quarto e o oitavo dia após a fertilização, os embriões tem então sua própria bolsa, mas dividem a mesma placenta. E se o embrião se divide após o oitavo dia de sua fertilização, é chamado de monocoriônico-monoamniótico, tendo a mesma bolsa e a mesma placenta. Este tipo

corresponde a 1% dos casos e é o mais propenso a complicações durante a gestação. Há também divisões após o 12º dia, e estas poderão ser imperfeitas, levando à malformações estruturais, dando origem aos gêmeos xifópagos (Beiguelman, 2008).

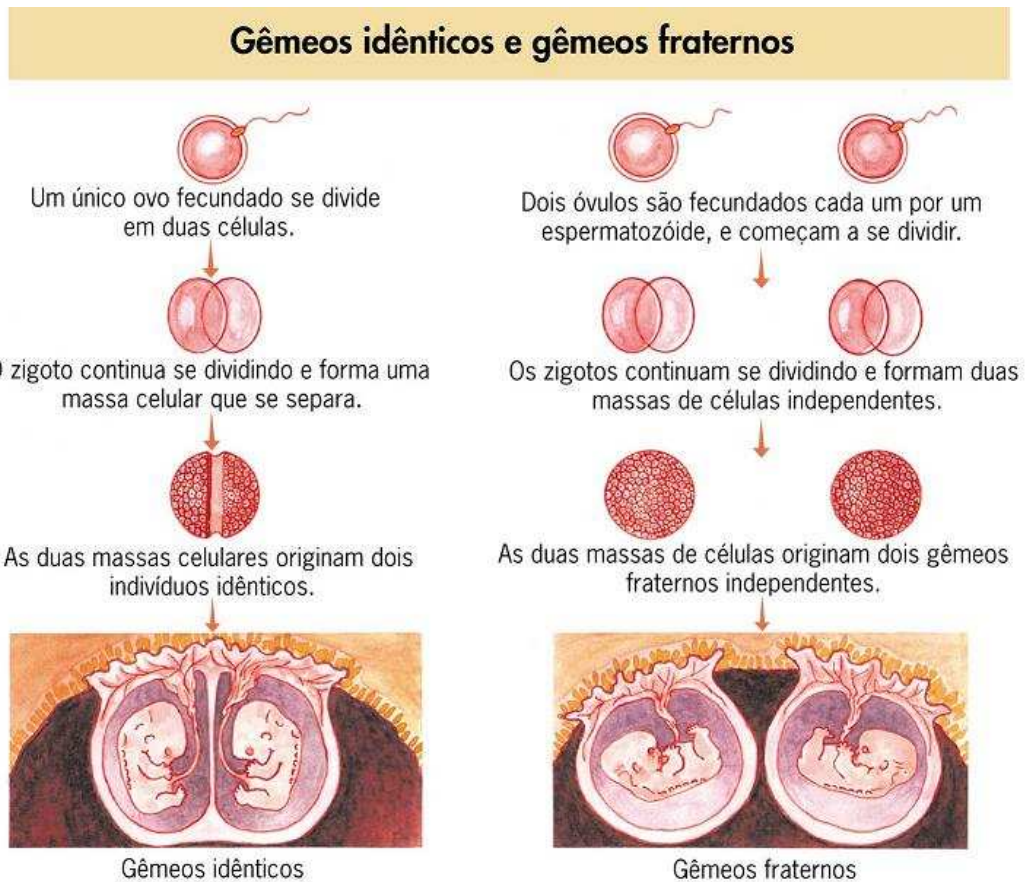


Figura 1. Formação dos gêmeos monozigóticos e dizigóticos (César e Sezar, 2007).

Gestações múltiplas constituem um problema para a saúde em muitos níveis. Riscos de malformações congênitas, morte ou restrição de crescimento intra-uterino, sequelas neurológicas, e nascimento prematuro são algumas das implicações adversas para esses nascimentos múltiplos. Há riscos maternos também, tais como os decorrentes de aborto ou placentação anormal, diabetes gestacional, hipertensão arterial e anemia. (Kapoor e Pal, 2009).

### **1.1.1. FORMAÇÃO DE TERATÓPAGOS**

Como já relatado acima, as gestações gemelares são muitas vezes complicadas e podem causar danos ao feto e à mãe, dentre esses danos há a formação de teratópagos, que são gêmeos ligados por intermédio de uma estrutura comum, que permite comunicação dos sistemas circulatórios dos gêmeos. Também são chamados de gêmeos xifópagos e mais popularmente de gêmeos siameses. Este fenômeno ocorre se a separação do material embrionário for incompleta durante a formação de um par de gêmeos monozigóticos. Estas ligações entre os gêmeos podem dar-se em diversas partes do corpo dos indivíduos (Beiguelman, 2008).

### **1.1.2. FETO PAPIRÁCEO**

Em gestações múltiplas, a morte intra-uterina de um feto ocorre com bastante frequência (Bernischk, 1993), mas a formação do feto papiráceo não é comum, este é consequência da morte e retenção de um dos fetos numa gravidez gemelar, e sua posterior maceração e fibrose, com compressão pelo outro feto em desenvolvimento (Figura 2). O tecido da placenta correspondente é habitualmente esclerótico e fibroso, embora em placentas monócóricas possa ser mantido pela placenta do gêmeo viável, co-existindo com o feto normal e saudável (Gómez *et al.*, 2007).

A incidência desta condição rara é de 1 em 12.500 casos de gêmeos (Abhijit *et al.*, 2000). Estudos ultra-sonográficos indicam que muitas gestações gemelares são convertidas no início para gestação única. Há casos em que o feto papiráceo causa obstrução e expulsão espontânea da placenta. Diagnóstico pré-natal com exame por ultra-som nem sempre é possível, mas este auxilia na avaliação dos riscos para a sobrevivência do feto, bem como registro e documentação deste raro fenômeno (Koregol *et al.*, 2009).



Figura 2. Feto papiráceo (Wikipédia Commons).

## 1.2. DISTINGUINDO OS TIPOS DE GÊMEOS

O método mais preciso para se distinguir entre os gêmeos é através da similaridade, onde os monozigóticos possuem perfis de DNA idênticos e os dizigóticos, diferentes. Pares MZ são sempre concordantes a qualquer grupo sanguíneo do sistema ABO.

Nascimentos triplos, quádruplos e quántuplos são ainda mais raros. No caso de trigêmeos estes podem ser trizigóticos (oriundos de três zigotos diferentes), dizigóticos (oriundos de dois zigotos, um dos quais deu origem a um par de gêmeos monozigótico) e monozigóticos (oriundos de um único zigoto). Existe um método chamado Método de Weinberg que se baseia no fato de que gêmeos dizigóticos são metade das vezes de sexos diferentes e metade de sexo igual. Assim, a frequência de gêmeos monozigóticos pode ser estimada diminuindo-se do total o dobro do número de gêmeos de sexos diferentes. Quando o cálculo foi utilizado, constatou-se algo muito interessante: a proporção de gêmeos idênticos é mais ou menos uniforme em todos os continentes e países (cerca de 0,4%), enquanto o que varia é a magnitude dos gêmeos fraternos.

**Frequência de dizigóticos = 2x frequência de gêmeos de sexos opostos.**

**Frequência de monozigóticos = frequência de gêmeos – frequência de dizigóticos.**

### 1.3. FREQUÊNCIA DE NASCIMENTOS GEMELARES

A frequência do nascimento de gêmeos varia consideravelmente em diferentes populações, com valores que vão de 6 por mil recém-nascidos no Japão (Imazium e Inouye, 1979), até 52 por mil nascimentos na Nigéria (Nylander, 1964). A incidência de gêmeos monozigóticos é mais ou menos constante, em torno de 3 a 4 por mil recém-nascidos (Parisi *et al.*, 1981) e aumentam para o dobro com o uso de técnicas de indução da ovulação (Hankins e Saade, 2005).

Em países da Europa Ocidental, as taxas de nascimentos gemelares aumentaram de 9 a 11 por mil em 1970 para 15 a 18 por mil em 2001. Do mesmo modo em Hong Kong, no Japão, e Singapura a taxa de nascimento de gêmeos aumentou de 5 a 6 por mil nascimentos em 1972 para 9 por 1000 nascimentos em 2001 (Blickstein *et al.*, 2005).

O aumento da utilização de tratamentos de fertilidade, tais como fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), inseminação artificial intra-uterina (IIU) e indução da ovulação (OI) são comumente citadas como a principal causa do aumento acentuado dos nascimentos de gêmeos nas duas últimas décadas (Fauser *et al.*, 2005).

A gemelaridade é considerada atualmente de caráter multifatorial, e poucos estudos têm explorado a forma como as influências genéticas e ambientais atuam sobre ela (Luu e Vohr, 2009). Na década de 60, foi sugerido que a gemelaridade é hereditária e transmitida apenas através da linhagem feminina, porém aplicada apenas aos gêmeos dizigóticos, e provavelmente recessiva (White e Wyshak, 1964; Wyshak e White, 1965). Atualmente, há um consenso de que gemelaridade dizigótica é um traço expresso na linhagem materna, mas que pode ser herdado tanto pelo lado materno como paterno (Hoekstra *et al.*, 2008).

#### 1.3.1. FATORES AMBIENTAIS

Gêmeos dizigóticos parecem estar mais sob influência de fatores ambientais do que os monozigóticos. Entre os fatores destacam-se raça, idade materna, uso de hormônios, a suplementação de ácido fólico, e estado nutricional materno (Hankins e Saade, 2005).

A idade materna está correlacionada com o nascimento de gêmeos dizigóticos, a

frequência de nascimentos gemelares aumenta da puberdade até os 37 anos, pois nesta idade há um esgotamento folicular ovariano. Já mães mais novas têm uma maior estimulação hormonal, que é determinada pelos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH). Aumento da paridade também é uma forte influência no fenômeno (Hankins e Saade, 2005). Mesmo com a idade materna e paridade estando altamente correlacionados, os efeitos são independentes (Bulmer, 1970). O aumento do uso de técnicas de ovulação tem sido um fator crucial no aumento de nascimentos gemelares, mais uma vez dizigóticos, mas há também formação de gêmeos monozigóticos, pois tem aumentado a proporção de blastocistos transferidos durante a fertilização *in vitro*.

A composição corporal também foi apontada como um fator de influência da gemelaridade. Para mulheres altas (164 cm ou mais), o risco relativo de ter gêmeos se mostrou de 1,5 a 2,0 vezes superiores do que em mulheres mais baixas (155 cm como média de estatura) (Nylander, 1981). Mulheres com IMC (índice de massa corporal) inferior a 20 foram associadas com uma probabilidade menor de ter filhos gêmeos se comparadas com mulheres com IMC de 30 ou mais (Basso *et al.*, 2004).

Alguns estudos relacionam o tabagismo (Morales-Suarez-Varela *et al.*, 2007), variações sazonais (Eriksson e Fellman, 2000), uso de anticoncepcionais (Macourt *et al.*, 1982) e uso do ácido fólico (Lumley *et al.*, 2001) com um aumento da gemelaridade. Porém outros trabalhos não obtiveram os mesmo resultados (Kallen, 1998; Kriegeret *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1989; Berry e Kihlberg, 2005).

A qualidade do sêmen (concentração, mobilidade e porcentagem de espermatozóides com morfologia normal) também parece influenciar a gemelaridade. Foi demonstrado que pais de gêmeos, tanto MZ quanto DZ, apresentaram uma melhor qualidade do sêmen quando comparados com o grupo controle (Asklund *et al.*, 2007).

Atualmente, a crescente procura por clínicas de fertilização assistida tem levado a um aumento no número de nascimentos de gêmeos dizigóticos nos países desenvolvidos, uma vez que essas técnicas se baseiam na indução da ovulação e implantação de múltiplos embriões (Fauser *et al.*, 2005).



### 1.3.2. FATORES GENÉTICOS

A gestação gemelar é um fenômeno que atrai a atenção de pesquisadores desde o começo do século XX. Weinberg, em 1901, sugeriu que a herança da gemelaridade é dizigótica e restrita à linhagem feminina (Hoekstra *et al.*, 2008). Em 1934, Greunlich contestou com a descoberta de que o lado paterno era tão importante quanto o lado materno na determinação da taxa de gêmeos em irmãos de pais e mães de gêmeos. Mais tarde, Wyshak e White ao analisar a herança dos gêmeos usando dados obtidos a partir de arquivos de genealogia da Sociedade da Igreja Mórmon, em Salt Lake City, concluíram que a herança de gêmeos dizigóticos é determinada por genes recessivos e limitada ao sexo feminino (White e Wyshak, 1964; Wyshak e White, 1965). Um estudo realizado por Bulmer (1970) apóia os resultados de White e Wyshak, mostrando que os parentes das mães de gêmeos apresentam taxas significativamente maiores de nascimentos gemelares do que outros membros da família. Neste estudo, a probabilidade de conceber um gêmeo foi 1,7 vezes maior em parentes do sexo feminino do que em parentes do sexo masculino. O autor mostrou que o risco de ter um gêmeo dizigótico é 2,5 vezes maior que a taxa de gêmeos na população em geral para as mulheres com uma irmã com gêmeos dizigóticos. Estudos na Itália relataram um significativo aumento na taxa de nascimentos gemelares em parentes maternos e algumas evidências para um aumento entre parentes paternos de gêmeos dizigóticos (Parisi *et al.*, 1983). Mais recentemente, Meulemans e colegas (1996) investigaram a herança da gemelaridade dizigótica em 1.422 famílias holandesas e relataram que o fenótipo de "ter gêmeos dizigóticos" é consistente com uma herança autossômica dominante de modelo monogênico. Essa constatação significa que o fenótipo de dar à luz gêmeos é expresso em mulheres, mas pode ser herdada de ambos os lados, maternal e paternal.

Estudos genéticos têm começado a identificar genes candidatos para o fenótipo "ser mãe de gêmeos". Genes da rota controladora da síntese, liberação e de atividade de FSH são bons candidatos para o aumento da frequência de gêmeos dizigóticos, pois o nascimento de gêmeos DZ depende da ocorrência de poliovulação, que depende do nível de hormônio folículo-estimulante (FSH), e este por sua vez depende de causas genéticas, sendo mais alto em mulheres com ancestralidade africana do que em europeus e seus descendentes (Nylander, 1981). Um grupo de pesquisadores achou associação positiva entre duas variantes desse gene e a gestação de gêmeos DZ; essas variantes tornariam o receptor do FSH mais sensível ao

hormônio FSH (Al-Hendy *et al.*, 2000). Porém, outros pesquisadores não encontraram ligação entre essas variantes e a gemelaridade DZ (Montgomery *et al.*, 2003; Derom *et al.*, 2006).

Dois estudos analisaram toda a sequência do gene do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), expresso nos ovócitos humanos, e identificaram algumas variantes significativamente mais comuns em mães de gêmeos DZ comparado com o grupo controle, porém são variantes raras e precisam de mais resultados para consolidar essa associação. (Montgomery *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006).

Um estudo demonstrou que mulheres que possuem o alelo determinante da deficiência de metilenotetra hidrofolato redutase (gene MTHFR) têm menor probabilidade de gerar gêmeos dizigóticos (Hasbargen *et al.*, 2000). A deficiência de MTHFR é responsável pela baixa produção de 5-metiltetra-hidrofolato e elevação da concentração plasmática de homocisteína, assim o alelo que causa essa deficiência diminui a probabilidade de gestação gemelar. Indivíduos heterozigotos e homozigotos para a mutação estariam, de certa maneira, “protegidos” contra gestações gemelares. Um trabalho posterior não achou associação dessa mutação com gestações dizigóticas (Montgomery *et al.*, 2003).

Uma maior compreensão das causas de nascimentos gemelares pode fornecer novas hipóteses sobre os mecanismos que influenciam a fertilidade. Estudos testes de genes candidatos a gemelaridade em diferentes populações e a procura por outros genes candidatos é necessária.

#### **1.4. CÂNDIDO GODÓI E A GEMELARIDADE**

A cidade de Cândido Godói (CG) (latitude 27°57'07" longitude 54°45'07"), com aproximadamente 6.000 habitantes, está localizada no Noroeste do Rio Grande do Sul e é conhecida como a “Cidade dos Gêmeos”, devido às suas altas taxas de nascimentos duplos e a alta recorrência dentro das famílias. Em um levantamento feito a partir do Datasus do Ministério da Saúde do Brasil ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)) entre os anos de 1994 a 2006, foi observado que CG apresenta taxa média de nascimentos gemelares maior que a média nacional que é 1,63%, ficando acima de 2%. Particularmente um distrito de CG conhecido como Linha São Pedro (Figura 3), povoada basicamente por descendentes de alemães que ali

se estabeleceram no início do século XX, apresenta prevalências de até 10% de gemelaridade (Matte *et al.*, 1996).



Figura 3. Linha São Pedro

Existem algumas hipóteses acerca da gemelaridade em CG, como a mais controversa que liga o fenômeno da gemelaridade a supostos experimentos do médico nazista Joseph Mengele em mulheres da cidade e também em animais durante a década de 1960, ou a hipótese da “água da fertilidade”, aonde as mulheres que bebem a água da fonte da Linha São Pedro (Figura 4) têm mais nascimentos gemelares. Porém, nenhuma delas possui embasamento científico. Uma hipótese alternativa para a alta taxa de nascimentos gemelares está relacionada a um efeito fundador decorrente da colonização de CG por poucas famílias de imigrantes alemães no início do século XX.

Foram levantados os registros de batismo de 131 gestações múltiplas ocorridas desde 1927 (129 duplas e 2 triplas), aonde se observa uma porcentagem significativa deste registro de gêmeos (40%) são de famílias que moram no distrito de Linha São Pedro (Tagliani-Ribeiro *et al.*, dados não publicados).

Como esta população tem se mantido com tamanho estável, baseada em propriedades rurais de agricultura e pecuária de pequeno porte, com pouca entrada de outras famílias posteriormente à sua colonização inicial e devido à alta recorrência de nascimentos gemelares

nos núcleos familiares do município, a análise genética em algumas famílias pode permitir a elucidação de mecanismos genéticos ainda pouco conhecidos na etiologia da gemelaridade em humanos.



Figura 4. Fonte situada em Linha São Pedro, conhecida como “fonte da fertilidade”

### 1.5. GENE TP53

Encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 KiloDaltons (kDa), denominando-se assim em consequência do seu peso molecular. Esse gene possui 20 Kb e é composto por 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante, e altamente conservado, apresentando homologia estrutural entre diferentes espécies (Almeida, 1999).

A proteína p53 é constituída por 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína (Klumb *et al.*, 2002). O gene *TP53* desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade genômica e prevenção de tumores (Hu *et al.*, 2008), é o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos, mais de 50% dos tumores são causados devido a mutações no gene *TP53*.

A perda da função da proteína p53 pode ocorrer pelas seguintes situações: por alteração genética; por interação da proteína p53 com proteínas virais; e por interação da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular. Mutação pontual é a troca de

um nucleotídeo, e é o tipo de mutação do gene *TP53* mais frequentemente encontrado nas neoplasias. Essas mutações ocorrem principalmente entre os códons 120 e 290, situados entre os éxons 5 e 9, considerados sítios preferenciais de ocorrência de mutações, e resultam na transcrição de uma proteína não funcional (Klumb *et al.*, 2002).

### 1.5.1. O GENE TP53 E A FERTILIDADE

A implantação é uma etapa crítica no desenvolvimento embrionário dos mamíferos, durante ao qual o blastocisto estabelece uma estreita interação com os tecidos do útero, o que leva à formação da placenta para sustentar o crescimento e o desenvolvimento do feto. Em muitas espécies de mamíferos, incluindo ratos e humanos, há um aumento da expressão da proteína LIF (fator inibidor de leucemia) no útero, que é regulada pelo estrogênio e pelo gene *TP53*, e é coincidente com o início da implantação (Kang *et al.*, 2009).

Altamente expressa nas glândulas endometriais, a proteína LIF é secretada no lúmen uterino e se liga a receptores na superfície das células do epitélio, preparando o útero para estar receptivo à implantação do blastocisto. Níveis baixos de LIF em ratos fazem com que estes tenham uma reprodução defeituosa, impossibilitando a implantação do blastocisto, que pode ser suprido pela injeção de LIF na fase de implantação (o 4<sup>o</sup> dia de gestação em camundongos) (Chen *et al.*, 2000). Da mesma forma, por p53 ser um fator de transcrição envolvido na regulação do gene LIF, camundongos com níveis baixos da proteína p53 têm uma implantação prejudicada, especialmente no início da implantação, quando níveis suficientes da proteína LIF são cruciais para a implantação do blastocisto. Administrar a LIF no 4<sup>o</sup> dia de gestação em ratos sem a expressão da proteína p53 aumenta significativamente a sua fertilidade e melhora a implantação do blastocisto (Hu *et al.*, 2007).

A família de genes *TP53* (p53, p63 e p73) é conservada em escalas de tempo evolutiva. Embora as funções do gene p53 e sua proteína como um supressor do tumor tenham sido firmemente estabelecidas, as primeiras funções dos genes da família *TP53* em vermes e moscas foi a de garantir a integridade e a fidelidade do processo de desenvolvimento (Hu, 2009). Nos vertebrados, a família de genes *TP53* retém essa função de integridade do processo de desenvolvimento, mas tem outras funções importantes na regulação da reprodução. A perda dos genes *TP53*, p63, ou p73 em camundongos fêmeas, leva a uma

diminuição significativa da fertilidade, o produto do gene *TP53* regula a reprodução materna na fase de implantação do embrião (Hu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008) e os genes p63 e p73 desempenham um papel importante no controle da qualidade genômica dos ovócitos (Kurita *et al.*, 2005).

### 1.5.2. POLIMORFISMO P72R

À medida que as sequências nucleotídicas do genoma humano foram sendo desvendadas, uma constatação evidente foi a do grande número de variações encontradas ao se comparar segmentos correspondentes do genoma. Estas mutações quando ocorrem a cada 600 bases, em média, são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs (*Single Nucleotids Polimorphisms*) e correspondem a posições em que existe uma alternância dos nucleotídeos em uma frequência alélica mínima de 1%. Quando mutações ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações futuras e fixando-se na população em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismo (Hahn e Weiberg, 2002).

Variações genéticas de p53, em particular do códon 72 apresentam relação com a fertilidade (Kang *et al.*, 2009). Neste códon, a substituição de um nucleotídeo resulta na presença de arginina (CGC) ou prolina (CCC) na sequência do aminoácido. A mudança de aminoácido afeta propriedades bioquímicas e funcionais da proteína p53. A variante prolina é um ativador transcricional mais forte, enquanto a variante arginina é um maior indutor de apoptose (Ammendola *et al.*, 2008).

Kang e colaboradores (2009) observaram que o alelo P72, que é um fator de risco para a falha da implantação do blastocisto, é muito mais frequente em mulheres que recorreram a clínicas de tratamento para fertilidade do que o alelo R72, e especialmente quando estas mulheres eram menores de 35 anos, já as pacientes com idade superior a 35 anos não parecem ser influenciadas pelos níveis de LIF, mas sim por aneuploidias. Em células com o alelo P72 os níveis de LIF são significativamente mais baixos, cerca de duas vezes menor do que em células com o alelo R72, o que pode contribuir para o aumento das falhas da implantação e o decréscimo da fertilidade associados com o alelo P72. Foi mostrado também

que a taxa de implantação é significativamente menor nos pacientes homocigotos para P72 (19%) em comparação com pacientes portadores de pelo menos um alelo do R72 (42%) ( $P=0,0028$ ) (Hu, 2009). Outros polimorfismos de base única (SNP) em outros genes da rota da TP53 também apresentaram relação com mulheres inférteis. Assim, parece haver uma associação desses SNP's (*single nucleotide polymorphisms*) na rota da TP53 com a fertilidade humana.

Há diferenças significativas nas frequências alélicas no códon 72 entre os indivíduos de diferentes origens étnicas. A frequência do alelo P72 é de aproximadamente 60% em Africanos e de 30 a 35% em europeus e seus descendentes (Beckman *et al.*, 1994). Além disso, a frequência do alelo P72 está estreitamente ligada à latitude, há aumento nas populações que apresentam este alelo quanto mais perto da linha do equador elas estão (Sjalander *et al.*, 1995).

As funções gerais da família de produtos do gene p53 na reprodução, fertilidade, câncer e tempo de vida mostram uma pleiotropia cooperativa, em que os mesmos alelos são selecionados para uma reprodução ótima e prevenção de câncer, fornecendo um bom exemplo de pleiotropia antagônica, quando os fenótipos, neste caso, da fertilidade e da vida são comparados. Esta observação sugere que o polimorfismo do códon 72 é evolutivamente equilibrado e mantido por seleção natural influenciada por fatores geográficos, como a temperatura ou a luz solar ou doenças infecciosas. Em comparação com o DNA do chimpanzé é evidente que o alelo P72 é o alelo mais ancestral, atualmente presente em uma frequência maior na África, enquanto o R72 alelo surgiu mais tarde, em europeus e asiáticos (Hu, 2009).

## 2. OBJETIVOS

Por não existir trabalhos relacionando a *TP53* com a gemelaridade e considerando a hipótese de um efeito fundador, aonde os fatores genéticos envolvidos acabaram tornando-se prevalentes pelo considerável grau de consanguinidade, o presente trabalho possui como objetivo comparar a frequência do polimorfismo P72R do gene *TP53* em mulheres com e sem nascimentos gemelares para, se possível, correlacionar com a gemelaridade de Cândido Godói.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRA

Foram realizadas três saídas de campo no município de Cândido Godói, uma em 2009 e duas em 2010. Essas visitas tiveram como objetivo a apresentação do grupo de pesquisa para a comunidade, coleta de material e a realização de um questionário (Anexo 1) sobre dados ambientais e histórico de gêmeos na família.

A amostra de mulheres analisadas para o gene em estudo se constitui de mães de gêmeos e mães controle, residentes da cidade de Cândido Godói. As amostras de sangue para extração de DNA foram coletadas após aprovação do projeto no comitê de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (registro no. 95-068) com termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Foi realizada uma amostra de conveniência, onde todas as mães de gêmeos que ainda vivem e moram na região e que concordaram em participar do estudo foram incluídas. O grupo controle é constituído por mães de filhos não-gêmeos. Foram coletadas, no total, amostras de 143 mulheres, sendo 42 mães de gêmeos e 101 controles. Para cálculos de tamanho amostral foram utilizadas as frequências gênicas dos polimorfismos na população em geral, encontradas na literatura (Kang *et al.*, 2009). Com base nestas frequências, a amostra descrita acima permite a detecção de um OR (*odds ratio*) de 2,5 (confiança de 95% e poder de 80%) para o polimorfismo do gene *TP53*.

#### 3.2. EXTRAÇÃO, ELETROFORESE, QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA

Os seguintes passos foram seguidos:

- Extração do DNA;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Quantificação do DNA;
- Diluição do DNA;

- Genotipagem através do PCR em tempo real (*realtime*PCR);
- Análise dos dados.

A extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo descrito em Lahiri e Nurnberger, Jr. (1991) e posteriormente verificada em um gel de agarose. Logo após, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento NanoDrop2000 para então serem diluídas a uma concentração de 20ng/μL.

### 3.3. DETECÇÃO DO POLIMORFISMO

O polimorfismo P72R do gene *TP53* foi genotipado por PCR em tempo real (*real-time PCR*).

A reação de PCR em tempo real foi conduzida em uma placa de 96 poços, em um volume total de 8 μl contendo 20ng de DNA genômico, o tampão *TaqMan Genotyping Master Mix* 1x (Applied Biosystems) e a sonda com os *primers* específicos para o polimorfismo contidos no *Custom TaqMan Genotyping Assay* 1x :

AGGAGCTGCTGGTGCAGGGGCCACG[C/G]GGGGAGCAGCCTCTGGCATTCTGGG (rs1042522).

Aonde C tem a fluorescência VIC e G a FAM.

As placas foram então colocadas em um termociclador para PCR em tempo real (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems) e aquecidas por 10min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s e 63°C por 1min. Os resultados foram então analisados no software *System Sequence Detection* v.1.4 (Applied Biosystems).

Figuras 6, 7 e 8 mostram a forma de apresentação dos resultados da PCR em tempo real (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems) pelo software *System Sequence Detection* v.1.4 (Applied Biosystems).

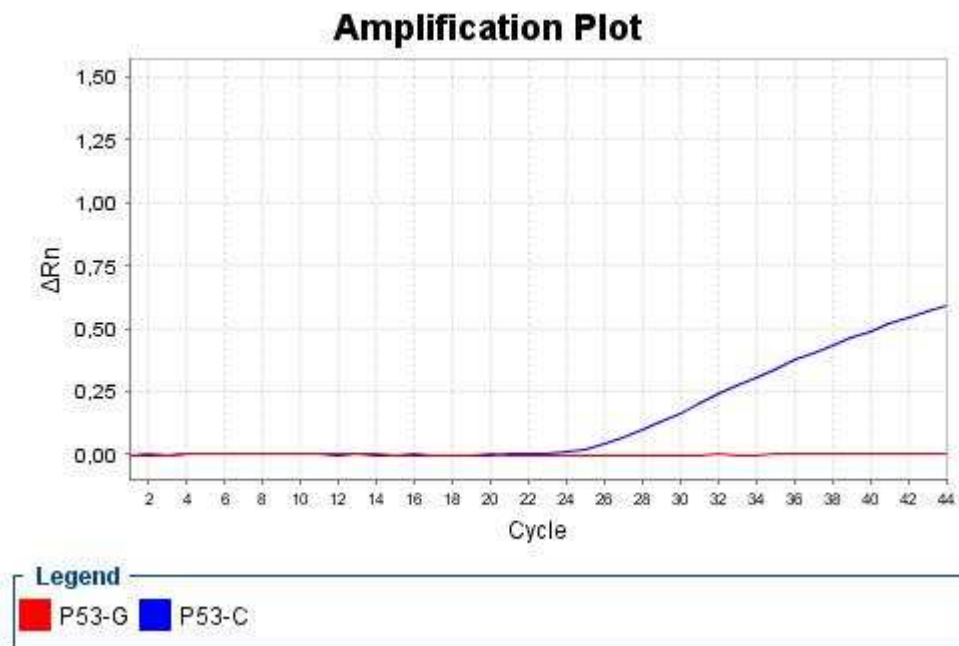


Figura 6. Amplificação de sequência CC.

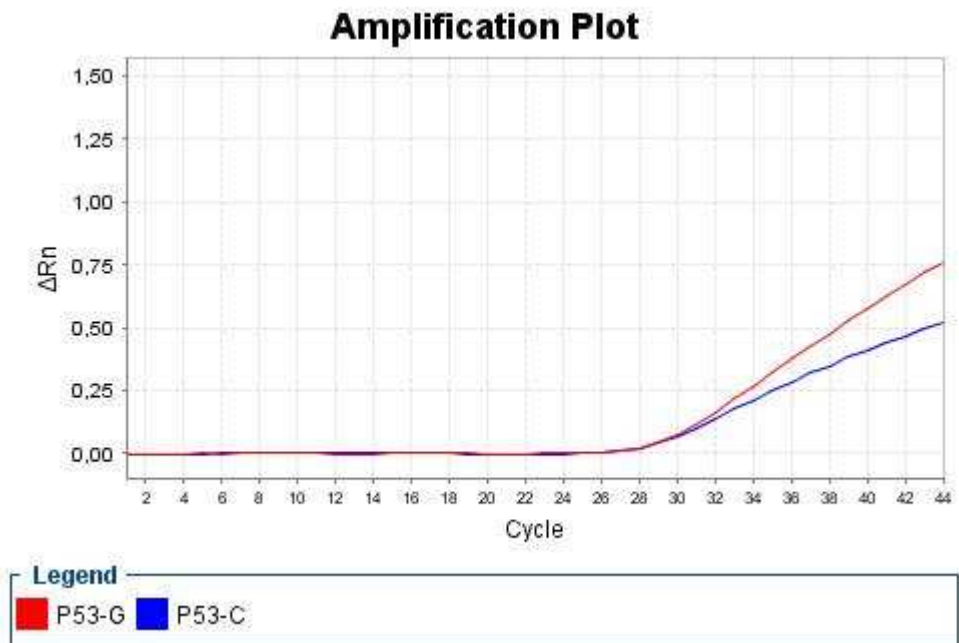


Figura 7. Amplificação GC.

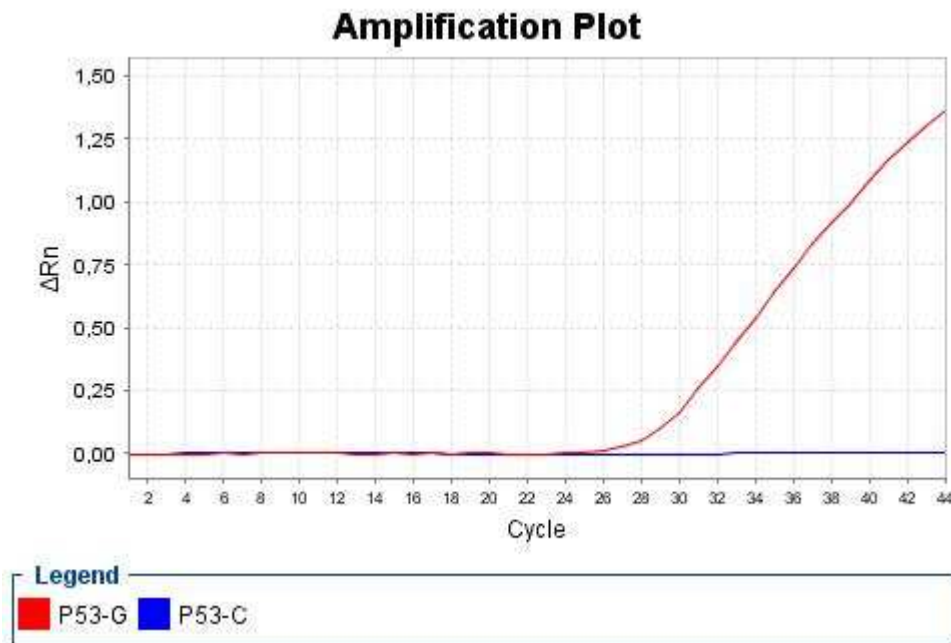


Figura 8. Amplificação GG.

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foram calculadas as frequências gênicas e genóticas separadamente dos casos e dos controles e avaliado se as amostras estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foram realizadas comparações das frequências alélicas através do teste do Qui-Quadrado. A comparação das frequências genóticas foram feitas através do Teste-G, Qui-quadrado ou Exato de Fisher, de acordo com o mais indicado para cada cálculo.

Devido a Cândido Godói ser uma cidade pequena, muitas mulheres “controle” apresentavam, ao menos, um caso de gêmeos na família. Assim foi feita uma análise levando em consideração o coeficiente de parentesco (F) através do Teste U de Wilcoxon Mann Whitney. O valor F de uma mulher controle foi calculado de acordo com o grau de parentesco entre a mesma e a mãe de gêmeos mais próxima da família, sendo F=0 quando não era relatado casos de mãe de gêmeos ou quando havia caso de gêmeos somente pela parte

paterna. Já as mulheres casos, por serem mães de gêmeos, têm o seu  $F=1$ . Neste exemplo (Figura 5), a controle possui tias maternas gêmeas, ou seja, a sua avó é mãe de gêmeos, então o  $F$  é igual a  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$  sendo 0,25. Este cálculo está baseado na distância de gerações, multiplicando  $\frac{1}{2}$  por si mesmo tantas vezes quantos forem os degraus percorridos na distância das gerações. Tios e tias, sobrinhos e sobrinhas, avós e netos e meios-irmãos e meias-irmãs são intermediários, com um parentesco de 0,25 (Dawkins, 1976). O objetivo do teste foi analisar se algum genótipo está mais relacionado com o fenótipo “mãe de gêmeos”, ou seja, com mulheres com o coeficiente de consanguinidade mais alto.

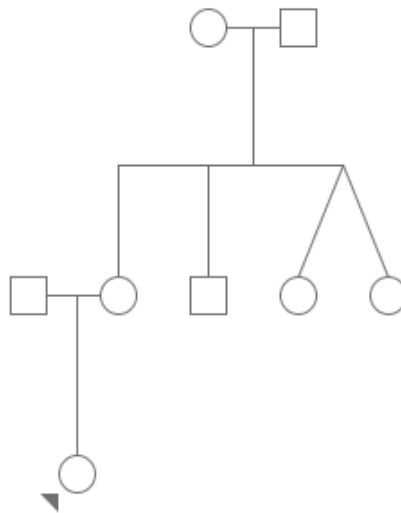


Figura 5. Exemplificação de heredograma

Todos os testes estatísticos foram calculados usando o programa Bioestat 5.0. e adotado o valor de  $p= 0,05$  para limite de significância.

#### 4. RESULTADOS

Tanto na amostra de casos como de controles, os genótipos estão distribuídos de acordo com a forma esperada, no equilíbrio ( $p= 0,8170$  e  $p= 0,6342$ , respectivamente) (Tabela 1 e 2). As frequências alélicas não se diferenciaram das encontradas na literatura ( $p= 0,1084$ ).

Tabela 1. Teste para Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra de casos.

	Observado	Esperado
GG	19	18.6667
GC	18	18.6667
CC	5	4.6667
Qui-Quadrado	0.0536	
(p)	0.8170	

Tabela 2. Teste para Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra de controles.

	Observado	Esperado
GG	73	72.3787
GC	25	26.2426
CC	3	2.3787
Qui-Quadrado	0.2264	
(p)	0.6342	

De acordo com o teste do Qui-quadrado, há diferença nas frequências alélicas entre casos e controles ( $p<0,0001$ ) (Tabela 3). As frequências genotípicas também diferem entre casos e controles, independente do modelo de herança assumido (Tabela 4).

Tabela 3. Teste do Qui-quadrado para frequências alélicas.

	Casos	Controles	(p)
G	56 (67%)	171 (85%)	0.0006
C	28 (33%)	24 (15%)	

Tabela 4. Comparação das frequências genótípicas.

	Casos	Controles	Pvalue
<b>Genótipo</b>			
<i>Modelo Co-dominante</i> <sup>(1)</sup>			
Arg-Arg (GG)	45% (19)	72% (73)	0,007 *
Arg-Pro (GC)	43% (18)	25% (25)	
Pro-Pro (CC)	12% (5)	3% (3)	
<i>Modelo recessivo</i> <sup>(2)</sup>			
Pro-Pro (CC)	12% (5)	3% (3)	0,048
Arg-Arg + Arg-Pro (GG+GC)	88% (37)	97% (98)	
<i>Modelo dominante</i> <sup>(3)</sup>			
Arg-Pro + Pro-Pro (GC+CC)	55% (23)	28% (28)	0,0021
Arg-Arg (GG)	45% (19)	72% (73)	

\* P Williams. <sup>(1)</sup> Teste-G. <sup>(2)</sup> Teste Exato de Fisher. <sup>(3)</sup> Qui-quadrado.

Por outro lado, o teste controlado pelo coeficiente de consanguinidade (F) (Tabela 5) não apresentou diferença estatística ( $p= 0,1005$ ). Porém o genótipo CC apresenta uma mediana maior, ou seja, mulheres CC apresentam um coeficiente de consanguinidade maior, sendo o contrário do que a literatura sugere. Por ser o genótipo CC mais fortemente ligado a falhas de implantação do blastocisto, esperava-se que houvesse mais mães “controles” com esse genótipo, conseqüentemente a mediana seria mais baixa, e os outros genótipos (GG+GC) apresentariam uma mediana maior, ou seja, haveria um maior número de mães de gêmeos e mulheres mais aparentadas com mães de gêmeos nesse grupo.

Tabela 5. Comparação dos genótipos em relação ao F.

Resultado	GG+GC	CC
Tamanho da amostra	135	8
Mediana	0.25	1.00
p-valor (bilateral)	0.1005	

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A literatura consultada nos traz que o polimorfismo no códon 72, que codifica arginina (CGC) ou prolina (CCC), é responsável por diminuição dos níveis de LIF e assim, possível falha da implantação do blastocisto quando apresentado na forma CCC, polimorfismo P72. Este polimorfismo é mais frequente em mulheres que procuram clínicas de tratamento para engravidar (Kang *et al.*, 2009).

Sendo assim, o alelo C, por ser caracterizado como “alelo fraco”, sendo mais difícil a implantação do blastocisto em mulheres que possuem esse alelo, o resultado esperado neste trabalho seria que mães de gêmeos apresentassem o alelo C em menor frequência, já que estas possuem perfeita implantação do blastocisto que sustenta a gestação gemelar, se comparadas com as mães controles que não possuem filhos gêmeos. Mas ao contrário do esperado, as mães de gêmeos apresentaram este alelo em maior frequência do que as mães controle e nem por apresentarem este resultado estas mães possuem falhas na implantação.

Para analisar a influência relativa do polimorfismo P72R do gene *TP53*, Kang (2009) utilizou como caso mulheres que procuraram clínicas de tratamento para fertilidade, FIV (fertilização *in vitro*) pacientes, e obteve significativa diferença entre FIV pacientes e controles (Tabela 6).

Os casos utilizados por Kang e os utilizados neste estudo são muito diferentes, já que Kang utilizou mulheres inférteis e este trabalho utilizou mães de gêmeos, que são férteis e não “deveriam” apresentar o alelo C, genótipos GC e CC, em maior frequência (Tabela 6), como o observado.

Tabela 6. Comparação entre resultados obtidos no trabalho com os obtidos por Kang (2009).

	Controles*	Casos*	Controles	Casos
GG	710 (60.6%)	121 (44.5%)	73 (72%)	19 (45%)
GC	392 (33.4%)	122 (44.8%)	25 (25%)	18 (43%)
CC	70 (6.0%)	29 (10.7%)	3 (3%)	5 (12%)

\*Resultados obtidos por Kang (2009).



Apesar de não possuir uma significância estatística, o teste levando em conta o grau de parentesco das mulheres com mães de gêmeos apresenta um agrupamento de mulheres com um F maior (mediana 1.00) com o genótipo CC, e as mulheres com menor grau de parentesco com mães de gêmeos (mediana 0.25), apresentaram com maior frequência os genótipos GG e GC.

Uma explicação para esse achado seria que, por ser um fator de transcrição para muitos genes, como Mdm2, Mdm4 e Hausp (Hu *et al.*, 2008), o polimorfismo P72R esteja afetando outro gene da rota da *TP53*. Resultando assim, nas frequências “invertidas” encontradas no presente trabalho, diferentes das esperadas para mães de gêmeos, que seria menor frequência do alelo C (polimorfismo P72).

Como outros polimorfismos em outros genes da rota da *TP53* também apresentaram relação com a fertilidade humana (Hu, 2009), p63 e p73 que desempenham um papel importante no controle da qualidade genômica dos ovócitos (Kurita *et al.*, 2005), estes estariam de alguma forma atuando na expressão do polimorfismo P72. Porém, mais estudos são necessários. Compreender os papéis de genes envolvidos na fertilidade e desenvolvimento poderá abrir novas perspectivas para a compreensão da gemelaridade.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abhijit SD, Lalita SD, Ashwini D, Aditi AD. 2000. Fetus papyraceus - a case report. *J Obstet Gynaecol* 50:118.
- Al Hendy A, Moshynska O, Saxena A, Feyles V. 2000. Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 356:914.
- Almeida JD. 1999. Expressão do gene p53 no carcinoma bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia, São José dos Campos*.
- Ammendola M, Bottini FG, Sesti F, Emilio P, Bottini E. 2008. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril* 90:406-408.
- Askund C, Jensen TK, Jorgensen N, Tabor A, Sperling L, Skakkebaek NE. 2007. Twin pregnancy possibly associated with high semen quality. *Hum Reprod* 22:751–755.
- Basso O, Nohr EA, Christensen K, Olsen J. 2004. Risk of twinning as a function of maternal height and body mass index. *JAMA* 291:1564–1566.
- Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. 1994. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266-70.
- Beiguelman B. 2008. *O Estudo dos Gêmeos*. Ribeirão Preto, SP: SBG.
- Beiguelman, B. 1995. *Dinâmica dos Genes nas famílias e nas populações*. Ribeirão Preto, SP: 2<sup>o</sup> edição SBG.
- Benirschke K. 1993. Intrauterine death of a twin: mechanisms, implications for surviving twin, and placental pathology. *Semin Diagn Pathol* 10:222–231.
- Berry RJ, Kihlberg R. 2005. Folic acid supplementation is associated with an increase in dizygotic twinning. *Early Hum Dev* 465–467.
- Blickstein I, Keith LG, Keith DM. 2005. *Multiple Pregnancy*. London and New York: Taylor and Francis Group London and New York 11–21, 33-38.
- Bulmer MG. 1970. *The Biology of Twinning in Man*. Oxford, UK: Oxford Clarendon Press Oxford, UK.
- Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. 2000. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 141: 4365–4372.
- Dawkins R. 2007. *O Gene Egoísta* (tradução Rejane Rubino). São Paulo, SP: Companhia das Letras.
- Derom C, Jawaheer D, Chen WV, McBride KL, Xiao X, Amos C, Gregersen PK, Vlietinck R. 2006. Genome-wide linkage scan for spontaneous DZ twinning. *Eur J Hum Genet* 14:117–122.

- Eriksson AW, Fellman J. 2000. Seasonal variation of livebirths, stillbirths, extramarital births and twin maternities in Switzerland. *Twin Res* 3:189–201.
- Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. 2005. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 365:1807–1816.
- Gómez EG, Eisele R, Ferraz P, Mota L, Tavares P. 2007. *Fetus Papyraceus*. Riscos para o feto viável. Disponível em: [http://www.apdpn.org.pt/\\_scripts/comunicacoes/-1958505016.pdf](http://www.apdpn.org.pt/_scripts/comunicacoes/-1958505016.pdf)
- Greulich WW. 1934. Heredity in human twinning. *Am J Phys Anthropol* 19:391–443.
- Hahn W, Weiberg RA. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature* 231-341.
- Hankins GVD, Saade GR. 2005. Factors influencing twins and zygosity. *Paediatr Perinat Epidemiol* 8–9.
- Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ. 2000. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C-->T mutation. *Hum Reprod* 2659-62.
- Hoekstra C, Zhao ZZ, Lambalk CB, Willemsen G, Martin NG, Boomsma DI, et al. 2008. Dizygotic twinning. *Hum Reprod Update* 37–47.
- Hu W, Feng Z, Atwal GS, Levine AJ. 2008. p53: A new player in reproduction. *Cell Cycle* 848–852.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. 2007. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 721–724.
- Hu W. 2009. The Role of p53 Gene Family in Reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:001073.
- Imazium Y, Inouye E. 1979. Analysis of multiple birth in Japan. *Acta Genet Med Gemellol* 28:107–124.
- Kallen K. 1998. Maternal smoking and twinning. *Twin Res* 206–211.
- Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. 2009. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci* 106:9761–9766.
- Kapoor M, Pal L. 2009. Epidemic of plurality and contributions of assisted reproductive technology therein. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 128–135.
- Klumb CE. 2002. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev. Brasil de hematol/hemot* 111-125.
- Koregol MC, Nayak R, Kandasamy S, Bhandary A, Mahale N, Dodawad A. 2009. Fetus papyraceous: a rare cause for obstruction to spontaneous placental expulsion. *Arch Gynecol Obstet* 945–947.
- Krieger H, Colletto GM, Franchi-Pinto C, Beiguelman B. 1996. Investigation on seasonality of twin births in Brazil. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 397–403.

Kurita T, Cunha GR, Robboy SJ, Mills AA, Medina RT. 2005. Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs. *Mech Dev* 1043–1055.

Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 11;19:5444.

Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. 2001. Modelling the potential impact of population-wide periconceptional folate/multivitamin supplementation on multiple births. *BJOG* 108:937–942.

Luu TM, Vohr B. 2009. Twinning on the brain: The effect on neurodevelopmental outcomes. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C:142–147.

Macourt DC, Stewart P, Zaki M. 1982. Multiple pregnancy and fetal abnormalities in association with oral contraceptive usage. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 22:25–28.

Matte U, Le Roux MG, Bénichou B, Moisan JP, Giugliani R. 1996. Study on possible increase in twinning rate at a small village in south Brazil. *Acta Genet Med Gemellol* 45: 431-437.

Meulemans WJ, Lewis CM, Boomsma DI, Derom CA, Van den Berghe H, Orlebeke JF, Vlietinck RF, Derom RM. 1996. Genetic modelling of dizygotic twinning in pedigrees of spontaneous dizygotic twins. *Am J Med Genet* 61:258–263.

Montgomery GW, Zhao ZZ, Marsh AJ, Mayne R, Treloar SA, James M, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL. 2004. A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. *Twin Res* 548–555.

Montgomery GW, Zhao ZZ, Morley KI, Marsh A J, Boomsma DI, Martin NG, Duffy DL. 2003. Dizygotic twinning is not associated with methylenetetrahydrofolate reductase haplotypes. *Hum Reprod* 18:2460–2464.

Morales-Suarez-Varela MM, Bech BH, Christensen K, Olsen J. 2007. Coffee and smoking as risk factors for twin pregnancies. The Danish National Birth Cohort. *Twin Res Hum Genet* 10:597–603.

Murphy MF, Campbell MJ, Bone M. 1989. Is there an increased risk of twinning after discontinuation of the oral contraceptive pill? *J Epidemiol Community Health* 275–279.

Nylander PP. 1964. The inheritance of DZ twinning. *Lancet* 2:566.

Nylander PP. 1981. The factors that influence twinning rates. *Acta Genet Med Gemellol* 30:189–202.

Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL, Montgomery GW. 2006. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 4713 4716.

Parisi P, Gatti M, Prinzi G, Caperna G. 1981. Familial incidence of twinning. *Nature* 304:626–628.

Sjalander A, Birgander R, Kivela A, Beckman G. 1995. p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum Hered* 144-9.

White C, Wyshak G. 1964. Inheritance in human dizygotic twinning. *N Engl J Med* 271:1003–1005.

Wyshak G, White C. 1965. Genealogical study of human twinning. *Am J Public Health Nations Health* 55:1586–1593.

## **FIGURAS**

Figura 1.

Cesar, Sezar. 2007. *Biologia - Volume Único*. São Paulo, SP: Atual Editora.

Figura 2.

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fetus\\_papyraceus.JPG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fetus_papyraceus.JPG)

Figuras 3 e 4.

<http://channel.nationalgeographic.com/series/explorer/4087/Overview#tab-Photos/0>

Figura 5.

<http://www.progenygenetics.com/online-pedigree/>

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1

#### PROTOCOLO DE ESTUDO – versão 2009 GÊMEOS

Entrevista n°

Preenchida por:

Data:

Hora:

OBS: Esta ficha será preenchida para cada família, e o caso índice será a mulher (mãe) da casa.

1. Nome:
2. Sobrenomes:

CASADA

SOLTEIRA

3. Endereço:
  4. Coordenada GPS:
  5. Sexo:
  6. Data Nascimento:
  7. Tem irmão(a) gêmeo?
  8. Em caso positivo nome e sexo:
- 

9. Onde moram (colocar cidade e endereço)?

10. Tem outros irmãos não gêmeos?

Em caso positivo nome, sexo, data de nascimento e endereço de cada um:

OBS: Algum destes irmãos é gêmeo de outro irmão seu? Em caso positivo, marcar os irmãos gêmeos.

Tem outros familiares em primeiro ou segundo grau gêmeos (pais, tios, primos, sobrinhos gêmeos?) (Heredograma 1 no verso)

11. Seu cônjuge tem irmãos gêmeos ou outro parente gêmeo na família? (Heredograma 2 no verso).

Se sim, nome e endereço dos irmãos ou parentes do seu marido que são gêmeos.

12. A sra teve filhos gêmeos? (heredograma 3 no verso)

13. Em caso positivo, nome, sexo e data de nascimento e endereço de cada um.

14. Teve outros filhos não gêmeos? Quantos?

15. Em caso positivo, nome, sexo, data de nascimento e endereço de cada um.

16. São todos saudáveis ou há algum com problemas?

17. Em caso de problemas na prole, especificar qual.

18. Teve gestações que terminaram em abortamento ou natimortos?

19. Em caso positivo, colocar ano em que ocorreu a perda e com quantos meses de gravidez.

20. Todos seus filhos são do mesmo cônjuge?

21. Em caso negativo esclarecer quais gestações são com cada cônjuge. Este cônjuge prévio tem historia de gêmeos na família (heredograma 4 – cônjuge anterior)

22. Qual a sua profissão (ocupação)?

23. Endereço do trabalho:
24. Qual a ocupação de seu cônjuge?
25. Bebe água da Corsan, poço ou outra fonte? Localização
26. Bebe leite com que frequência? Que leite (caixinha, vaca em casa, fornecedor de leite).
27. Tem vaca leiteira em casa? Ordenha? Usa medicamentos nos animais?
28. Durante a gravidez, lembra-se se tomava leite? Que tipo? Com que frequência?
29. A sua dieta é principalmente vegetariana ou costuma comer carne? Quantas vezes por semana?
30. E durante a gravidez?
31. Onde nasceram seus avôs? Colocar a localidade (cidade) onde nasceram se souber.
32. É parente de seu cônjuge? Em que grau?
33. Outros familiares com problemas de nascimento na família?
34. A senhora, seu marido ou algum familiar em primeiro grau seu tem ou teve câncer? Sabe dizer que tipo de câncer?
35. Outras observações:



**PARTE A SER PREENCHIDA PARA AS FAMÍLIAS COM GÊMEOS**

Evolução dos gêmeos:

Placenta:

Data Nascimento Mãe:

Altura da mãe:

Uso de anticoncepcional:

Período:

Tratamento para engravidar:

Época:

Uso de medicamentos ou injeções antes ou durante a gravidez: Por qual razão?

Uso de ácido fólico ou vitaminas antes e no período de engravidar?

Concordância para   canhoto/destro

tendência a engordar

temperamento

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos estudando fatores que podem estar envolvidos no alto número de gêmeos observado no município de Cândido Godói, RS. Para isso vamos investigar desde dados geológicos (como composição da água e dos solos) até fatores biológicos (como níveis de hormônios e fatores genéticos). Também vamos analisar as histórias das famílias com e sem gêmeos do município. Para isso precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família e se existem gêmeos nela, perguntar sobre algumas situações de saúde que podem estar relacionadas ao nascimento de gêmeos e coletar amostras de sangue saliva. Também precisamos coletar amostras de água e do solo da sua casa. Além disso, se você autorizar, iremos consultar seus registros médicos em hospitais ou postos de saúde para obter informações sobre seu parto e/ou de seus filhos. Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. Algumas pessoas podem preferir participar de apenas uma etapa da pesquisa e não de outras, sem que isso seja um impedimento. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é para a pesquisa de fatores envolvidos no nascimento de gêmeos, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. A coleta de sangue será feita com um pequeno furo na ponta do dedo, que pode causar dor no local. As análises dos fatores biológicos será feita no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e as análises de água e solo na Unisinos, sem nenhum custo para os participantes. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são a Profa. Lavinia Schuler-Faccini (51-2101-8011) e a bióloga Ursula Matte (51-2101- 8838), que poderão ser contatadas em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (51-2101-8304). Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia mesmo depois de ter concordado.

**Coleta de dados aspectos ambientais**

- Dados já coletados nesta propriedade.
- Dados não serão coletados nesta propriedade.
- Concordo em que sejam coletadas amostras de água e solo da minha propriedade.
- Não concordo em que sejam coletadas amostras de água e solo da minha propriedade.

**Coleta de dados aspectos biológicos (entrevista)**

- Dados familiares já coletados.
- Concordo em fornecer informações sobre a minha família, relacionadas ao nascimento de gêmeos e dados de saúde.
- Não concordo em fornecer informações sobre a minha família, relacionadas ao nascimento de gêmeos e dados de saúde.

**Coleta de material biológico (sangue)**

- Concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores envolvidos com nascimento de gêmeos.
- Não concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores envolvidos com nascimento de gêmeos.

**Autorização para acesso de informações de prontuários**

- Autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.
- Não autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_