

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESTUDO SOBRE UM POSSÍVEL AUMENTO NA TAXA DE
GEMELARIDADE EM LINHA SÃO PEDRO, RS

URSULA DA SILVEIRA MATTE
ORIENTADOR: ROBERTO GIUGLIANI

DISSERTAÇÃO PARA O CURSO DE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
- ÊNFASE EM GENÉTICA -

PORTO ALEGRE
1995

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Roberto Giugliani pela confiança em mim depositada e pela orientação necessária à realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Genética Médica do HCPA pelo interesse e auxílio na execução deste trabalho.

À Ana Paula Schilling Vargas pelas fotos, desenho das genealogias e, principalmente, amizade.

Ao Luiz E. Freitas pela coleta de sangue e pela viagem até Santa Rosa.

À profa. Sídia Maria Callegari Jacques pelas dicas e material sobre gêmeos.

À dra. Angela Schmidt da Divisão de Informação em Saúde da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do RS pelo levantamento da incidência de nascimentos gemelares no período de 1992 a 1994.

À Sílvia Lacchini pelo auxílio e impressões.

Aos gêmeos e à comunidade de Linha São Pedro, cuja colaboração e interesse tornou possível a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1 FATORES GENÉTICOS	2
I.2 INCIDÊNCIA	4
I.3 DETERMINAÇÃO DA ZIGOSIDADE	6
I.4 IMPORTÂNCIA PARA A GENÉTICA	9
I.5 FENÔMENO REGIONAL	10
II. JUSTIFICATIVA	11
III. OBJETIVOS	12
IV. MATERIAL E MÉTODOS	13
IV.1 AMOSTRA	13
IV.2 PROTOCOLO DE ESTUDO.....	13
IV.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	14
IV.4 ANÁLISE DE DNA.....	14
IV.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
V. RESULTADOS.....	16
V.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	16
V.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	18
V.3 INCIDÊNCIA DE NASCIMENTOS GEMELARES.....	20
V.4 GENEALOGIAS.....	21
V.5 FOTOGRAFIAS.....	31
V.6 AUTORADIOGRAFIAS.....	40
VI. DISCUSSÃO.....	43
VII. CONCLUSÕES.....	47
VIII. RESUMO.....	48
IX. ABSTRACT.....	50
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
XI. ANEXOS.....	55
XI.1 PROTOCOLO DE ESTUDO.....	55
XI.2 TERMO DE CONSENTIMENTO.....	56
XI.3 NASCIMENTOS GEMELARES NO RS.....	57

I. INTRODUÇÃO

Nascimentos múltiplos, ainda que raros na espécie humana, estão presentes na maioria dos grupos de animais. Evolutivamente, o caminho seguido pelos grandes primatas parece ter sido a redução do tamanho do número de filhotes associada a um aumento do cuidado parental, maximizando as chances de sobrevivência da prole. Ao mesmo tempo, a produção de um número maior de óvulos garantiria a fertilização e seria seguida pelo abortamento do “excesso” de prole não desejada. A formação de gêmeos seria então um acidente não-adaptativo (Gleeson e cols., 1994).

Na espécie humana a ocorrência de partos múltiplos constitui 1% dos nascimentos (Junqueira e Zago, 1982), sendo a imensa maioria deles duplos, constituindo-se raridades os nascimentos múltiplos de 3 ou mais gêmeos. Existem dois tipos de gêmeos: monozigóticos (idênticos) e dizigóticos (fraternos). Nos gêmeos monozigóticos o óvulo, já fecundado, se divide originando dois indivíduos com a mesma constituição genética. Os gêmeos dizigóticos resultam da liberação de dois óvulos diferentes, fecundados por dois espermatozóides diferentes, sendo que o grau de semelhança genética entre os indivíduos formados é o mesmo que entre dois irmãos não-gêmeos.

Não existem explicações precisas para o fenômeno da gemelaridade. No caso de gêmeos dizigóticos, hormônios relacionados ao controle da ovulação poderiam estar envolvidos na manifestação desta característica. Existem hipóteses que correlacionam seleção positiva para fertilidade, idade materna e nível hormonal com predisposição para nascimentos gemelares. Diferenças étnicas e variações na taxa de nascimentos de gêmeos dizigóticos também estariam relacionadas a estes fatores.

Já no caso de gêmeos monozigóticos a situação é ainda mais obscura. Para Vogel e Motulsky (1986) eles constituem um caso extremo de duplicação, sendo que versões mais brandas levariam ao aparecimento de embriões malformados ou de gêmeos siameses. Alguns autores sugerem que a formação de gêmeos monozigóticos seria causada por fraturas anormais da zona pelúcida (Edward e cols., 1986). Tais fraturas poderiam ser consequência de alterações físico-químicas da zona pelúcida, as quais seriam causadas por uma hiper-maturação do óvulo (Witschii, 1952). A hipótese

mais referida na literatura é de que a formação de gêmeos monozigóticos seria um evento independente de fatores genéticos (McKusick e cols., 1992; Derom e cols., 1987; Wyshak e White, 1965; Harvey e cols., 1977; Beiguelman e Villarroel-Herrera, 1993).

Côté e Gyftodimou (1991) propuseram o modelo do crossing-over mitótico como um mecanismo importante no processo de formação de gêmeos mono e dizigóticos. Seu efeito embrionário precoce em genes homeóticos, ou não homeóticos, poderia levar a uma divisão programada através de uma ação reguladora e/ou disruptiva nos mecanismos normais de controle da fusão de duas metades embrionárias. Os próprios autores reconhecem que a teoria apresenta ainda algumas lacunas mas acreditam que ela poderá vir a ser uma boa explicação não só para gemelaridade mas para outras desordens genéticas ditas de origem multifatorial.

I.1. FATORES GENÉTICOS

A predisposição para gêmeos monozigóticos tem sido considerada independente de fatores genéticos (McKusick e cols., 1992; Derom e cols., 1987; Wyshak e White, 1965; Harvey e cols., 1977; Beiguelman e Villarroel-Herrera, 1993). Sua freqüência é a mesma em diferentes grupos raciais, independe da idade materna e de história familiar prévia (Derom e cols., 1987). Outros fatores que possam afetar sua ocorrência também não são conhecidos. Um estudo realizado na Bélgica, que avaliou 2648 nascimentos múltiplos, revelou que a indução artificial da ovulação aumenta a taxa de gêmeos monozigóticos. Esse parece ser o primeiro mecanismo biológico identificado que influencia o aparecimento dessa característica (Derom e cols., 1987).

Entretanto, estudos com famílias das quais descendem vários pares de gêmeos monozigóticos indicam que este caráter pode ser influenciado por fatores genéticos. Analisando dez genealogias de famílias com pelo menos dois pares de gêmeos entre parentes de até terceiro grau, Harvey e cols. (1977) propuseram um modelo de herança autossômica dominante. Porém, este não parece ser um modo de herança comum, pois o risco de recorrência familiar não é muito mais alto do que a freqüência de gêmeos monozigóticos na população em geral. Estudos deste tipo são geralmente prejudicados pelo baixo número amostral.

Estudos em famílias com anormalidades cromossômicas sugerem um mecanismo comum na causa da gemelaridade e da aberração cromossômica (Thompson e Thompson, 1980). Um estudo com 34 famílias onde havia aneuplóides 45,X demonstrou um aumento de cinco a dez vezes na taxa normal de nascimentos gemelares (8 nascimentos gemelares em 128). Outros trabalhos também indicam a existência de um pequeno aumento na frequência de gêmeos em famílias com crianças com Síndrome de Down (Thompson e Thompson, 1980). A correlação entre anormalidades do desenvolvimento e formação de gêmeos monozigóticos pode estar relacionada tanto a erros no próprio processo de divisão do ovo quanto a anormalidades cromossômicas ou genéticas prévias à fecundação, especialmente no caso de hiper-maturação do óvulo. Dessa forma fica difícil determinar o que seria causa ou consequência neste processo. Para alguns autores não se pode falar em um "twinning event", ou seja, a formação de gêmeos não ocorreria por um processo único e instantâneo (Côté e Gyftodimou, 1991). Para estes autores, os fatores genéticos envolvidos são poucos e pleiotrópicos, sendo que a contribuição paterna é maior do que geralmente se imagina.

A predisposição para gêmeos dizigóticos inclui idade materna, paridade, raça e história familiar de gêmeos dizigóticos (Derom e cols., 1987). No início do século, Weinberg propôs que os fatores hereditários para essa condição fossem provavelmente recessivos e transmitidos por linhagem materna (McKusick e cols., 1992). Milham, em 1964, sugeriu um mecanismo hipofisário para ativação gênica, relacionado ao excesso de produção de hormônios gonadotróficos (McKusick e cols., 1992). Um estudo que analisou a prole de 2522 gêmeos e de 3783 irmãos de gêmeos concluiu que a herança genética deste caráter devia-se a um gene recessivo, com expressão limitada ao sexo feminino (Wyshak e White, 1965). Isso significa que uma predisposição para ovulação múltipla é um caráter herdado que se manifesta apenas na mãe mas que pode ser transmitido pelo pai. O suposto gene teria uma frequência relativamente alta na população (0,25).

Estudos mais recentes (Boomsma e cols., 1992; Chenevix-Trench e cols., 1993) têm buscado uma associação entre polimorfismos genéticos de hormônios ligados ao controle da ovulação e de outras proteínas ligadas à fertilidade com predisposição para gêmeos dizigóticos. Boomsma e cols. (1992) estudou o efeito do alelo S do locus

do inibidor de protease (Pi), que estaria associado a um aumento de fertilidade, e encontrou uma frequência aumentada deste alelo em mães de gêmeos mono e dizigóticos. O efeito deste alelo seria mediado por um aumento na taxa de ovulação, favorecendo a formação de gêmeos dizigóticos. Além disso, o aumento da frequência em mães de gêmeos monozigóticos, em comparação com mães de não-gêmeos, indica que esse alelo poderia conferir uma vantagem em levar uma gravidez múltipla a termo independente da zigosidade. Além disso, níveis foliculares de hormônios relacionados ao controle da ovulação como FSH (hormônio estimulante do folículo) e LH (hormônio luteinizante) parecem estar aumentados em mães de gêmeos dizigóticos em comparação aos controles (Chenevix-Trench e cols., 1993). Frequências de polimorfismos genéticos dos genes para FSH β , Cg β (cadeia β da Gonadotrofina Coriônica) e GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) não demonstraram diferenças nas mães de gêmeos dizigóticos e de controles. Os autores sugerem efeito poligênico ou heterogeneidade genética, não descartando a importância de diferenças nos genes para receptores hormonais (Chenevix-Trench e cols., 1993).

Entretanto, a diferenciação de herança mono ou multifatorial para a gemelaridade é difícil. Diferenças étnicas na taxa de gêmeos dizigóticos são uma evidência de que fatores genéticos estão envolvidos. A observação de que, em casamentos inter-raciais, a taxa segue a do grupo étnico da mãe, também corrobora a hipótese de herança materna (McKusick e cols., 1992). Ao mesmo tempo, outros fatores, como por exemplo paridade, idade materna, situação marital e classe social da mãe, não podem ser desconsiderados (Wyshak e White, 1965; Fellman e cols., 1987).

I.2. INCIDÊNCIA

O método tradicionalmente utilizado para estimar a frequência de gêmeos monozigóticos é o Método da Diferença de Weinberg, que se baseia no fato de que estes pares são sempre do mesmo sexo. Já entre os dizigóticos metade seria do mesmo sexo e metade de sexos opostos (que são prontamente reconhecidos como dizigóticos). Portanto:

$$\begin{aligned} \text{frequência de dizigóticos} &= 2 \times \text{frequência de dizigóticos de sexos opostos} \\ \text{frequência de monozigóticos} &= \text{frequência de gêmeos} - \text{frequência de dizigóticos} \end{aligned}$$

Apesar de alguns desvios causados por diferenças na proporção sexual da população este método é bastante aceito, especialmente em estudos de larga escala.

Gêmeos dizigóticos correspondem a aproximadamente 70% dos nascimentos múltiplos (Junqueira e Zago, 1982). A proporção de gêmeos monozigóticos em todos os nascimentos em qualquer lugar é de aproximadamente 1 em cada 300 nascimentos (Thompson e Thompson, 1980). Considerando-se nascimentos gemelares em geral, a freqüência varia de acordo com o grupo étnico, sendo que uma das mais altas é a da Nigéria: 4,5%, sendo 4,2% destes dizigóticos (Vogel e Motulsky, 1986) e uma das mais baixas é a do Japão: 0,7% (Thompson e Thompson, 1980). Entre norte-americanos brancos, a freqüência é de um nascimento gemelar a cada 87 nascimentos, sendo que aproximadamente 30% são monozigóticos, 35% dizigóticos de mesmo sexo e 35% dizigóticos de sexos diferentes (Thompson e Thompson, 1980). A taxa de dizigosidade na Europa é de cerca de 8/1000 nascimentos (Vogel e Motulsky, 1986). A Tabela I.1 sumariza estas diferenças entre grupos étnicos.

Tabela I.1 - Incidência de nascimentos gemelares por 10.000 nascimentos (Vogel e Motulsky, 1986)

País	Período	DZ	MZ
Espanha	1951-1953	59	32
Portugal	1955-1956	56	36
França	1946-1951	71	37
Austria	1952-1956	75	34
Suíça	1943-1948	81	36
Alemanha	1950-1955	82	33
Suécia	1946-1955	86	32
Inglaterra	1946-1955	89	36
Itália	1949-1955	86	37
EUA - brancos	?	67	39
EUA - negros	1905-1959	110	39
EUA - chineses	?	22	48
EUA - japoneses	?	21	46
Japão	1955-1962	24	40

DZ: dizigóticos; MZ: monozigóticos

A frequência de monozigóticos apresenta pouca variação entre as populações. Já as diferenças nas taxas de dizigóticos são mantidas quando os dados são corrigidos pela idade materna e ordem de nascimento.

A idade materna é um dos fatores que influenciam a taxa de gemelaridade, mas apenas para gêmeos dizigóticos. A taxa varia de 0% na puberdade até 0,7 a 0,8% na idade de 35 a 39 anos, após o que volta a diminuir (Vogel e Motulsky, 1986). Essa variação provavelmente está relacionada a modificações nos níveis hormonais. Da mesma maneira, observa-se um declínio na taxa de gemelaridade nos países industrializados, inclusive no Brasil (Beiguelman e Villarroel-Herrera, 1993). Queda no número total de nascimentos e diminuição da idade materna são dois fatores que contribuem para esta situação. A diminuição da idade materna está relacionada à hipótese da seleção positiva para fertilidade. Assim, a poliovulação estaria correlacionada à fertilidade e à formação de gêmeos dizigóticos. Anos atrás, mulheres cuja fertilidade era maior, contribuíam mais para a taxa de nascimentos, aumentando dessa maneira o número de gêmeos dizigóticos. Como atualmente a fertilidade tem pouco significado biológico devido ao controle da natalidade, a taxa de gêmeos dizigóticos também diminuiu. Essa explicação também se aplica às diferenças raciais na taxa de gemelaridade. Na África, como a mortalidade infantil é alta, a capacidade reprodutiva das mulheres é explorada ao extremo, enquanto no Japão, onde o controle de natalidade é feito há séculos, a vantagem seletiva da fertilidade praticamente não existe (Vogel e Motulsky, 1986).

I.3. DETERMINAÇÃO DA ZIGOSIDADE

Existem várias maneiras de se determinar o tipo de zigosidade de um par de gêmeos. O método mais comum é pela semelhança física associada à concordância sexual. Esse método é evidentemente bastante limitado, pois nada impede que gêmeos dizigóticos sejam do mesmo sexo ou que gêmeos monozigóticos tenham diferenças físicas causadas por efeito ambiental.

Um outro tipo de determinação também bastante utilizada é a análise da estrutura placentária. Espera-se que gêmeos dizigóticos possuam dois âmnios, dois córions e duas placentas independentes. No caso de gêmeos monozigóticos, a

disposição dos anexos embrionários difere de acordo com o momento em que ocorreu a separação do ovo. Quando a separação é precoce, anterior à formação do blastocisto, os anexos apresentam-se separados, havendo duas placentas e duas cavidades amnióticas, tal como ocorre nos gêmeos dizigóticos. Se a separação envolve apenas o embrioblasto, a placenta será única mas duas cavidades amnióticas estarão presentes. No caso de gêmeos dizigóticos, entretanto, a implantação dos dois blastocistos pode ser muito próxima, levando à fusão das duas placentas (Junqueira e Zago, 1982). Se a separação dos gêmeos monozigóticos ocorrer num estágio mais tardio, de disco germinativo, então os anexos serão comuns a ambos os fetos. Este parece ser o caso mais comum, sendo o único que pode ser considerado diagnóstico do tipo de zigosidade uma vez que os outros tipos de implantação podem ocorrer tanto em monozigóticos como em dizigóticos (Thompson e Thompson, 1980). Outra limitação deste tipo de estudo é que a análise deve ser feita ao nascimento, impedindo a obtenção de dados a partir de indivíduos adultos.

Para uma determinação mais precisa do tipo de zigosidade, utilizam-se análises de marcadores genéticos como grupos sanguíneos, dermatoglifos, testes de histocompatibilidade e análise eletroforética de isozimas (Derom e cols., 1985). A aplicação desses métodos baseia-se no fato de que gêmeos dizigóticos, como irmãos ordinários, podem ser iguais ou diferentes para características genéticas herdáveis (Thompson e Thompson, 1980). Os gêmeos são comparados quanto ao maior número de caracteres possíveis e uma única diferença é prova de dizigosidade. Entretanto, é impossível provar a monozigose, pois nada impede que dois irmãos, gêmeos dizigóticos ou não, tenham herdado várias características genéticas em comum. Portanto, nesse caso é possível apenas calcular a probabilidade de monozigose com base nas frequências populacionais dos genótipos estudados. Essas frequências, contudo, nem sempre são disponíveis para a população em estudo, especialmente no caso de grupos isolados ou com alto grau de endocruzamento, o que pode causar um erro na probabilidade de um dado par de gêmeos ser monozigótico.

Atualmente, o método mais preciso para determinar zigosidade é o da análise de DNA. As técnicas fundamentadas nas diferenças genéticas ao nível do DNA entre os indivíduos tornaram-se o método de escolha para fornecer evidência objetiva em vários campos como por exemplo determinação de paternidade, identificação de

indivíduos, etc. Os métodos de identificação biológica fundamentam-se no estudo direto da enorme variabilidade biológica do DNA, com equipamentos e reagentes desenvolvidos para a engenharia genética. No caso de gêmeos, as técnicas utilizadas são semelhantes às empregadas em estudos de determinação de paternidade, sendo as mais comuns delas a comparação de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), análise de *Ampflips* e *Fingerprint* de DNA. A determinação molecular da zigosidade apresenta diversas vantagens sobre os métodos anteriores, sendo a principal delas a confiabilidade. A probabilidade de um par de gêmeos dizigóticos ser erroneamente detectado como monozigótico por este método é menor que 10^{-4} (Hill e Jeffreys, 1985). Além disso, a análise de DNA é possível a partir de amostras muito pequenas (como gotas de sangue impregnadas em papel filtro), de material congelado por longos períodos, ou de material coletado *post-mortem*.

Dentre as técnicas de análise molecular da zigosidade destacam-se as baseadas na análise de VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Estes constituem-se de pequenas seqüências não-codificadoras, chamadas de seqüência cerne, que se repetem *in tandem* por um número de vezes que varia em cada indivíduo, segundo um padrão herdado geneticamente. Estas regiões são multialélicas e altamente polimórficas, sendo que sua hipervariabilidade deve-se à diversidade do número de repetições. Os polimorfismos para cada locus podem ser detectados diretamente no DNA genômico por digestão com enzima de restrição, seguida por eletroforese em gel dos fragmentos resultantes, transferência do DNA para um filme de nitrocelulose (*Southern Blotting*) e hibridização com sonda marcada específica para um único locus ou uma sonda multilocal. A utilização de técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) associadas à técnica de *Southern Blotting* permite maior sensibilidade e assegura que o fragmento amplificado corresponde à região em estudo, especialmente em casos em que há um pequeno ganho de amplificação ou amplificação de produtos inespecíficos (Brito, 1993).

Uma das estratégias de análise destas seqüências consiste em utilizar sondas específicas para um determinado locus. Nesse caso, as freqüências alélicas nas populações, e por conseguinte, a probabilidade de que dois indivíduos não relacionados apresentem o mesmo alelo são facilmente obtidas. Estes loci de VNTR tendem a ser bastante discriminativos e úteis para a caracterização individual. Para estudos desse tipo são utilizados comumente ao menos quatro loci, que, em conjunto, reduzem para

até 10^{-6} a probabilidade de que, por simples acaso, dois indivíduos não relacionados apresentem o mesmo perfil. A maioria dos loci investigados possuem um grande número de alelos distinguíveis, com alta taxa de heterozigosidade, o que aumenta a chance de discriminação entre dois indivíduos, conseqüentemente a determinação do tipo de zigosidade de um par de gêmeos (Brito, 1993).

I.4. IMPORTÂNCIA PARA A GENÉTICA

O uso de gêmeos em pesquisas de Genética Humana remonta ao século passado com os trabalhos de Galton (1822-1911). Isso porque gêmeos monozigóticos propiciam a oportunidade, única em seres humanos, de se estudarem indivíduos com o mesmo genótipo. A base teórica para estudos desta natureza é simples: gêmeos monozigóticos possuem o mesmo genótipo e dizigóticos possuem genótipos diversos. Portanto, as diferenças que forem encontradas entre os primeiros serão devidas essencialmente às influências do meio ambiente, enquanto que a variabilidade entre membros de um par dizigótico é devida tanto a dissimilaridades genéticas como a fatores ambientais. Assim, estudos adequados das diferenças nos dois tipos de gêmeos podem fornecer informações quanto à determinação genética ou não da variabilidade de uma característica e também dados a respeito de efeitos ambientais sobre caracteres de comprovada etiologia genética (Callegari, 1972).

Existem alguns cuidados a serem tomados nesse tipo de estudo que estão diretamente ligados à própria questão da gemelaridade. Assim, fatores como desenvolvimento intra-uterino, tipo de criação e problemas relativos a auto-imagem contribuiriam para reforçar as diferenças entre gêmeos e não-gêmeos, bem como entre pares de mono e dizigóticos. Portanto, conclusões tiradas através de estudos com gêmeos nem sempre podem ser estritamente extrapoladas para indivíduos não-gêmeos (Callegari, 1972).

Ainda assim, o método dos gêmeos, como é conhecido, continua a ser bastante utilizado. Cuidados no delineamento do grupo amostral, como adequado pareamento de sexo, idade, etnia e nível sócio-econômico, contribuem para reduzir as falhas metodológicas inerentes ao método. Recentemente uma variação muito utilizada

desse método passou a incluir a comparação entre gêmeos monozigóticos criados juntos ou separadamente.

I.5. FENÔMENO REGIONAL - LINHA SÃO PEDRO

Linha São Pedro, município de Candido Godói, é uma pequena localidade situada ao longo de uma estrada de terra na região noroeste do estado, a 35 km de Santa Rosa e a 524 km de Porto Alegre. A principal atividade econômica é a agricultura. Existem 84 famílias que trabalham em 1029 hectares de terra. O principal produto agrícola é a soja, seguida pelo cultivo de milho. Também são produzidos vários produtos para consumo próprio, como batata-doce, aipim e verduras. Além disso, há criação de suínos e gado, especialmente leiteiro.

Os primeiros moradores chegaram por volta de 1918 provenientes de Santa Cruz, Estância Velha e Montenegro. São referidos como fundadores da comunidade Jacob Schmidt, Edmundo Grimm, Antônio Bamberg, Pedro Mergen, Augusto Brixner, Pedro Speth e Valentin Bervanger. Até hoje, a imensa maioria da população é constituída por descendentes de alemães.

Em 1993 seus habitantes fizeram um levantamento do número de pares de gêmeos entre as famílias da região, detectando, num raio de aproximadamente 4 km, 34 pares de gêmeos. A grande maioria desses pares pertence a sete famílias, e parece haver um elevado índice de cruzamento entre as mesmas. Interessados em saber mais sobre o assunto, membros desta comunidade procuraram, no final de 1994, a Unidade de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Do interesse de ambas as partes em buscar uma explicação para esta elevada taxa de gemelaridade surgiu a oportunidade de realização desse trabalho.

II. JUSTIFICATIVA

Na literatura existem poucos casos relatados de uma alta incidência de gêmeos restrita a uma região geográfica tão pequena e etnicamente tão homogênea, como ocorre em Linha São Pedro. Desta maneira, o estudo dessa população pode contribuir para a revelação de mecanismos envolvidos na ocorrência de nascimentos gemelares, sobre os quais ainda se sabe muito pouco.

III. OBJETIVOS

1. Determinar se a frequência de gêmeos na população de Linha São Pedro, município de Cândido Godói, RS, está significativamente aumentada em relação ao esperado.

2. Avaliar se os pares de gêmeos registrados são monozigóticos ou dizigóticos.

3. Identificar a presença de possíveis fatores de risco para a gemelaridade na população estudada.

4. A partir dos resultados obtidos, propor mecanismos que possam explicar os fenômenos observados.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. AMOSTRA

Foram entrevistados todos os pares de gêmeos residentes em Linha São Pedro, bem como os residentes em localidades próximas (Linha Santo Cristo e Linha São Miguel) mas originários de Linha São Pedro. Nos casos em que os gêmeos não fossem encontrados, ou se tratassem de crianças, foram entrevistados familiares próximos, como pais, avós e tios.

Como referência para algumas variáveis relativas à incidência de nascimentos gemelares, foram utilizados dados coletados pelo ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pela Secretaria Estadual da Saúde e do Meio Ambiente, através da Divisão de Informação em Saúde.

IV.2. PROTOCOLO DO ESTUDO

Obteve-se uma detalhada genealogia de cada família, incluindo o registro da incidência de gêmeos, origem dos antepassados e relações de parentesco entre as famílias dentro da comunidade. Além disso, pesquisou-se sobre a existência de consanguinidade, doenças genéticas e dados relativos aos gêmeos e suas mães, tais como data de nascimento, evolução, idade materna e paridade, bem como utilização de contraceptivos e possíveis tratamentos para engravidar. O modelo do questionário utilizado encontra-se no Anexo XI.1 (pag. 55).

De cada par de gêmeos com 15 anos ou mais foi coletada uma amostra de 20 ml de sangue em EDTA (4 tubos de 5 ml), para extração de DNA. Para os pares de gêmeos com menos de 15 anos a amostra de sangue coletada foi de 10 ml (2 tubos de 5 ml). Para a coleta de sangue foi obtido um consentimento informado de todos os gêmeos que participaram do estudo (Anexo XI.2, pag. 56).

IV.3. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA dos indivíduos estudados foi extraído a partir de 10 ml de sangue total congelado utilizando-se a técnica descrita por Miller e cols. (1988). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para sangue fresco mas experimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UGM/HCPA demonstraram ser viável sua utilização a partir de material congelado.

O DNA extraído foi enviado para o Laboratório do Dr. Jean-Paul Moisan, no Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, França, onde foi realizada sua análise para determinação de zigosidade.

IV.4. ANÁLISE DE DNA

A análise de zigosidade foi realizada por *Southern Blotting* com utilização da enzima de restrição HaeIII e hibridização com as sondas unilocais PH 30, EFD 52, PLH1 e Ceb 42. Nesse método o DNA inteiro é tratado com a enzima de restrição que o cliva em vários fragmentos. Estes fragmentos são separados em um gel de acrilamida e em seguida transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Sondas para regiões de VNTR marcadas radioativamente são colocadas em contato com a membrana e hibridizam em regiões específicas do DNA. É feita um auto-radiografia da membrana de nitrocelulose, onde se observam padrões de banda que correspondem aos fragmentos de restrição complementares à sonda utilizada (Watson e cols., 1988).

Uma vez que o padrão de bandas é uma característica herdada, pois corresponde a seqüências de DNA, existe a probabilidade de $\frac{1}{4}$ de que um par de gêmeos dizigóticos apresente o mesmo padrão de bandas para uma dada sonda. Como as probabilidades são independentes para cada sonda utilizada, a determinação de que um certo par de gêmeos é monozigótico é feita com base na análise de vários *loci* e no cálculo da probabilidade de que a semelhança no padrão de bandas seja ao acaso. Já a determinação de que um certo par é dizigótico baseia-se no fato de eles apresentarem um padrão de bandas desigual para qualquer uma das sondas utilizadas.

IV.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à incidência de nascimentos gemelares foram comparados através do teste de qui-quadrado de homogeneidade. A comparação das médias de idade materna e número de filhos entre as mães de gêmeos mono e dizigóticos foi feita através do teste de Wilcoxon - Mann-Whitney (correspondente ao teste t de Student para dados não-paramétricos de amostras independentes). Para o teste de zigosidade o cálculo de probabilidade utilizado baseou-se na chance de dois gêmeos dizigóticos apresentarem o mesmo padrão de bandas para cada uma das sondas utilizadas ($\frac{1}{4}$).

V. RESULTADOS

V.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA

A população de Linha São Pedro é composta por 349 habitantes, distribuídos em 84 famílias. Entre eles existem 22 pares de gêmeos residentes (11% da população), sendo que de 17 deles foi coletado sangue para análise de zigosidade, bem como informações sobre idade materna e número de irmãos. De outros 5 pares não foi possível coletar sangue, obtendo-se apenas informações a respeito da idade materna e do número de irmãos. Estes dados estão apresentados na Tabela V.1.

Quanto ao uso de contraceptivos todas as mães de gêmeos entrevistadas (n= 22) negaram sua utilização, bem como a realização de tratamentos para engravidar. Não foram registrados casos de doenças genéticas, ou de possível etiologia genética, entre os gêmeos ou seus genitores, através das entrevistas. Apenas em dois casos obteve-se dados a respeito de problemas de saúde que afetaram um dos membros do par, sendo um problema cardíaco (a mãe não soube precisar o nome da doença) e um caso de epilepsia.

Através das entrevistas também obteve-se dados de pares de gêmeos já falecidos, que não vivem mais na região ou que não tinham sido contados no primeiro levantamento feito pelos moradores. Dessa forma, chegou-se ao número de 48 pares de gêmeos relacionados com as 84 famílias que vivem em Linha São Pedro. Não foi possível obter dados a respeito do tipo de placentação, que serviriam como um indicador secundário para a zigosidade, pois os nascimentos ocorreram em Hospitais da região e as mães desconheciam este dado. Em muitos casos não foi possível saber o sexo de pares de gêmeos distantes por causa da imprecisão das informações.

Nas páginas 31 a 39 encontram-se fotografias dos pares de gêmeos, bem como uma visão geral de Linha São Pedro.

Tabela V.1 - Caracterização da amostra estudada quanto à idade, idade materna ao nascimento, número de filhos e zigosidade.

Par	Gêmeos	Sobrenome	Idade	Idade Materna	Número de filhos	Zigosidade
1	Delmar / Vilmar	Lebens	30	27	7	DZ
2	Lucia / Lucila	Speth	40	-	7	DZ
3	Lilia / Iria	Speth	29	37	13	MZ *
4	Luis / Lúcia	Becker	32	19	8	DZ
5	Marlei / Marli	Becker	18	33	8	DZ
6	Jean / Jeovani	Theisen	2	22	2	MZ *
7	Pedro / Paulo	Sauthier	30	22	4	DZ
8	Arlete / Marlete	Rohr	15	20	4	MZ *
9	Tatiane / Fabiane	Grimm	8	28	3	DZ
10	Julci / Derli	Grimm	5	32	7	DZ
11	Carlos / Carine	Angst	2	27	-	DZ
12	Daniel / Raquel	Griebeler	12	29	5	DZ
13	Márcio / Marcelo	Griebeler	11	23	-	DZ
14	Lucia / Luciana	Gronitzki	8	34	5	MZ *
15	Tiago / Tiego	Angst	4	30	4	MZ *
16	Osmar / Otmar	Lunkes	16	-	3	MZ *
17	José / Jacó	Hass	2	19	2	DZ
18	Adriano / Adriana	Pech	13	28	4	DZ **
19	Pedro / Petronila	Heintzmann	50	-	2	DZ **
20	Elói / Elário	Giehl	33	18	9	não testado
21	Júnior / Júlia	Gass	2	26	3	DZ **
22	Cleiton / Cleidir	Gerlach	3	25	-	não testado

* probabilidade de ser dizigótico muito pequena (1/64), vide item V.2

** não testado, dizigosidade determinada pela discordância sexual

Os dados relativos à idade materna foram analisados em conjunto e também considerando-se separadamente gêmeos mono e dizigóticos. O esperado seria que as mães de gêmeos dizigóticos tivessem uma média de idade maior que as mães de gêmeos monozigóticos, enquanto a média total deveria ser um valor intermediário.

mesmo padrão de bandas. Como essa probabilidade é independente para cada uma das sondas utilizadas, a probabilidade de que esses pares também sejam dizigóticos é de 1/64 ($\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4}$).

Nas páginas 40 a 42 encontram-se reproduções das autoradiografias obtidas por *Southern Blotting* de 6 dos 17 pares de gêmeos analisados. Pode-se observar que os pares dizigóticos apresentam discordância nas bandas obtidas por mais de uma sonda, enquanto os monzigóticos têm bandas idênticas nas três sondas utilizadas. É importante ressaltar que cada um dos membros do primeiro par a direita (Delmar e Vilmar Lebens) apresenta padrões idênticos nas três autoradiografias. Para este par, entretanto, o padrão foi discordante para outro VNTR, PLH1 (autoradiografia não disponível). Esse fato levou à classificação do par como dizigótico, demonstrando a necessidade de utilizar-se mais de um marcador.

Utilizando-se o Método da Diferença de Weinberg para determinação da zigosidade dos 17 pares estudados obteve-se os seguintes valores:

DZ	4 pares	23%
MZ	13 pares	76%

Já através da análise molecular os valores obtidos foram:

DZ	11 pares	65%
MZ	6 pares	35%

A discrepância entre esses resultados deve-se fundamentalmente ao baixo número amostral ($n=17$). Caso o método fosse utilizado para 42 dos 48 pares encontrados nas genealogias, o resultado seria:

DZ	28 pares	67%
MZ	14 pares	33%

Estes valores estão bem mais próximos dos valores reais determinados pela análise de DNA para os 17 pares estudados. Foram utilizados apenas 42 dos 48

Média idade materna = 26,3 anos	(n=19)
DZ = 23,6 anos	(n=12)
MZ = 28,6 anos	(n=5)

As diferenças entre os valores médios de idade materna encontrados para mães de gêmeos mono e dizigóticos não foram estatisticamente significantes (para $\alpha = 0,05$). Deve ser levado em consideração o baixo número amostral, especialmente no caso de gêmeos monozigóticos, que pode contribuir para a ausência de significância estatística.

Quanto ao número de filhos o modo de análise foi o mesmo que o utilizado para idade materna (média total e média para mães de gêmeos mono e dizigóticos). Da mesma forma, o esperado seria que as mães de gêmeos dizigóticos tivessem, em média, maior número de filhos que as mães de gêmeos monozigóticos.

Média número de filhos = 5,3 filhos	(n=19)
DZ = 4,6	(n=13)
MZ = 5,1	(n=6)

Também neste caso as diferenças entre os valores médios de número de filhos encontrados para mães de gêmeos mono e dizigóticos não foram estatisticamente significantes (para $\alpha = 0,05$). O mesmo fator, o baixo número amostral, deve ser considerado, pois pode contribuir para a ausência de significância estatística.

V.2. ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular realizada por *Southern Blotting* com a enzima de restrição HaeIII e as sondas unilocais PH 30, EFD 52, PLH1 e Ceb 42 revelou que 11 (65%) dos 17 pares estudados são dizigóticos (Tabela V.1). Os demais pares aparentemente são monozigóticos. Porém esse não é um resultado conclusivo, uma vez que existe a probabilidade de $\frac{1}{4}$ de que um par de gêmeos dizigóticos compartilhe o

pares de gêmeos relacionados a famílias de Linha São Pedro porque não se sabia o sexo de 6 destes pares.

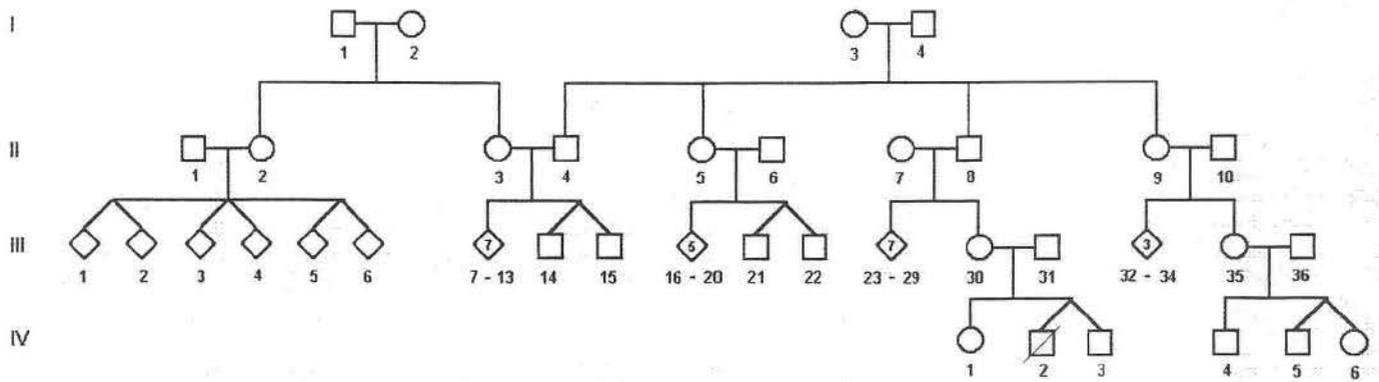
V.3. INCIDÊNCIA DE NASCIMENTOS GEMELARES

No período de 1990 a 1994, de acordo com um levantamento feito pelos próprios moradores, houveram 49 nascimentos em Linha São Pedro. Destes, 5 foram gemelares, o que corresponde a 10% dos nascimentos do período (Tabela V.2). Dados obtidos pelo ECLAMC para o HCPA, em 1994, revelam que de 5420 nascidos vivos 159 nascimentos foram gemelares (2,9%). Dados fornecidos pela Divisão de Informação em Saúde da Secretaria de Saúde e do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul para o período de 1992 a 1994 revelam que a média dos nascimentos gemelares para este período no estado foi de 1,8%. Dessa forma, pode-se afirmar que a incidência de nascimentos gemelares em Linha São Pedro está significativamente aumentada em relação ao resto do Estado (para $\alpha = 0,001$). O percentual médio de nascimentos gemelares para o período de 1992 a 1994 no Estado do Rio Grande do Sul está sumarizado no anexo XI.3 (pag. 53). Note-se que a 14ª Delegacia Regional de Saúde, que abrange o município de Cândido Godói, não apresenta um percentual elevado em relação às demais delegacias.

Tabela V.2 - Perfil dos nascimentos em Linha São Pedro de 1990 a 1994.

Ano	Nascimentos	Nasc. Gemelares	Freq. (%)
1990	10	0	0
1991	12	1	8.3
1992	12	4	33.3
1993	7	0	0
1994	8	0	0
Total	49	5	10.2

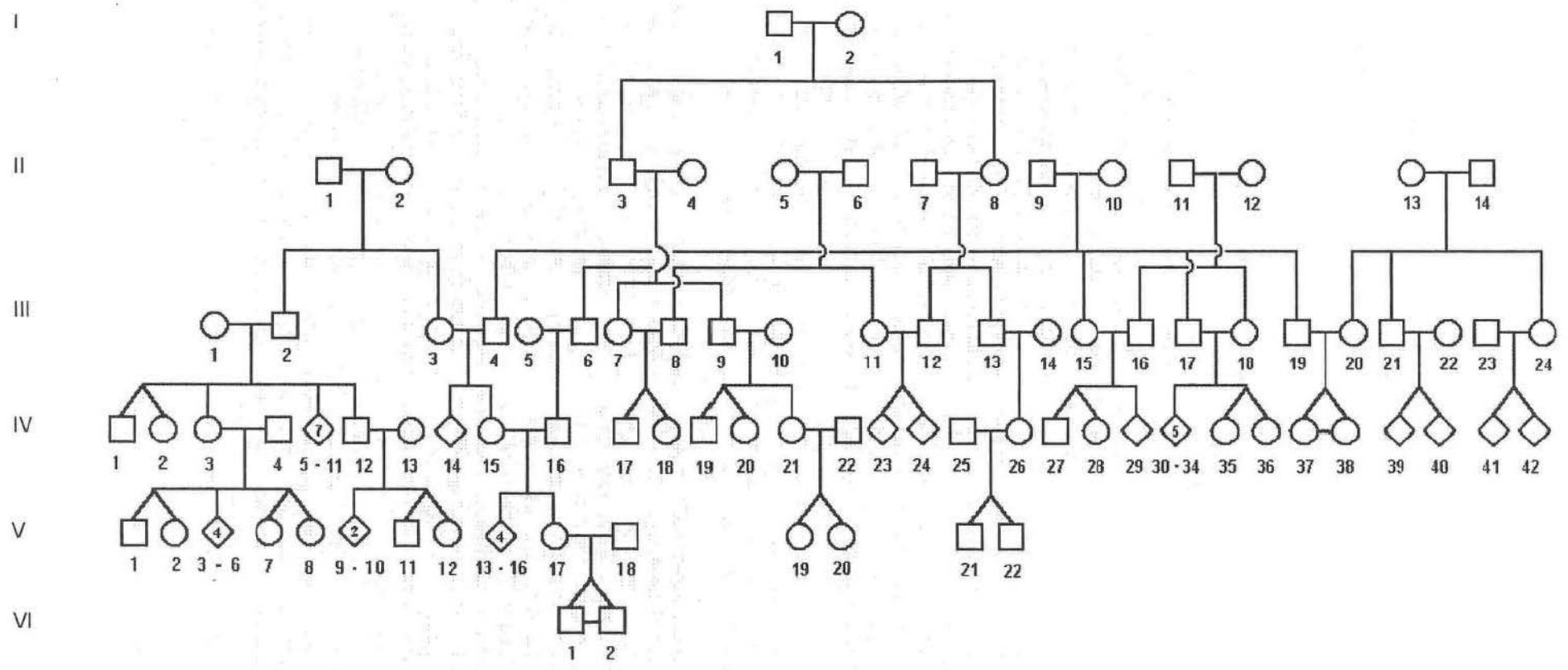
V.4. GENEALOGIAS



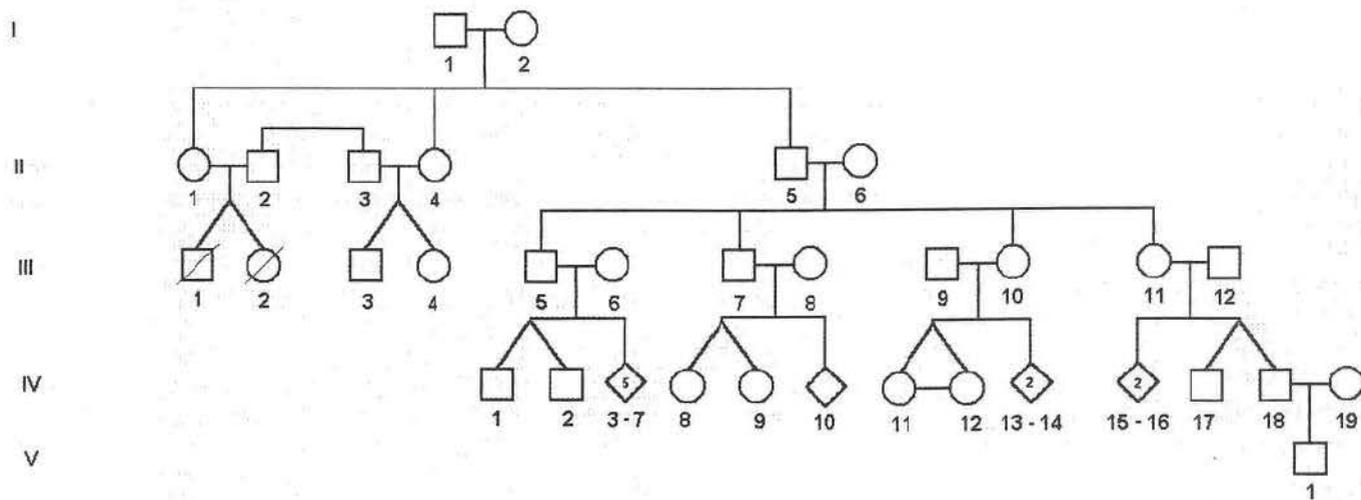
Genealogia 1

Não se observa salto de geração. O indivíduo II.7 possui uma irmã com gêmeos e também uma sobrinha com gêmeos (não representados na genealogia por não se tratarem de membros da comunidade). Os indivíduos II.1 e II.2 migraram para o Paraná, onde residem os pares III.1 a III.6. O indivíduo IV.2 faleceu por complicações neonatais. Foi coletado sangue dos indivíduos III.21 e III.22 (par 1).

Genealogia 2 (página seguinte) - É um exemplo do grau de endocruzamento existente na população de Linha São Pedro. Os casamentos não são consanguíneos mas praticamente todos os casais são aparentados. Não se observa salto de geração. Foi coletado sangue dos indivíduos IV.35, IV.36 (par 2), IV.37, IV.38 (par 3), V.7, V.8 (par 4), V.3, V.4 (par 5), VI.1 e VI.2 (par 6).

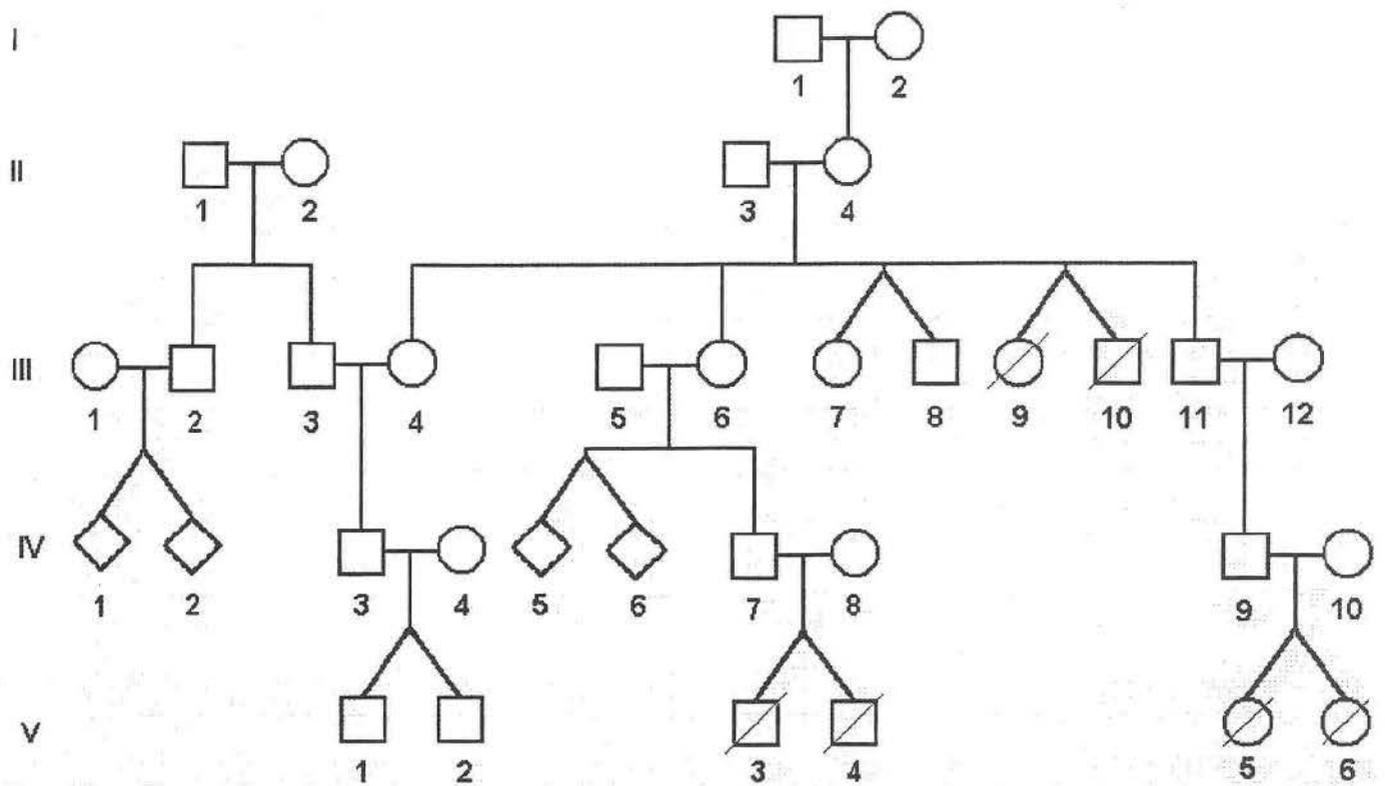


Genealogia 2



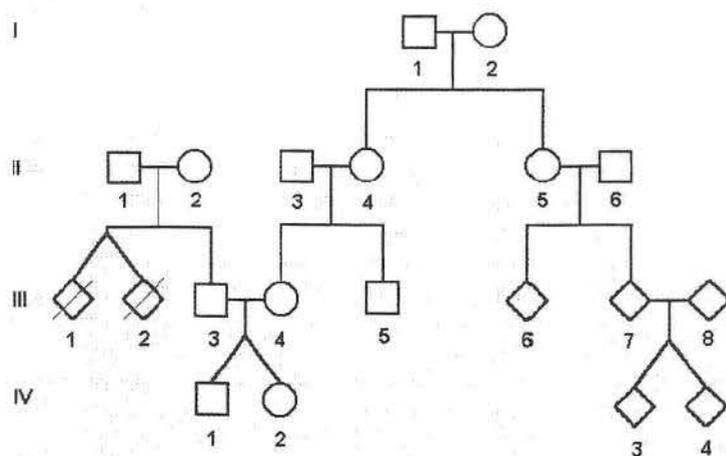
Genealogia 3

Não se observa salto de geração. O indivíduo I.1 é o único em toda a amostra estudada sobre o qual se diz haver um caso de trigêmeos na família. Os indivíduos III.6, III.8 e III.9 referem existir casos de gêmeos entre seus parentes distantes. Foi coletado sangue dos indivíduos IV.1, IV.2 (par 10), IV.8, IV.9 (par 9), IV.11, IV.12 (par 8), IV.18 e IV.19 (par 7).



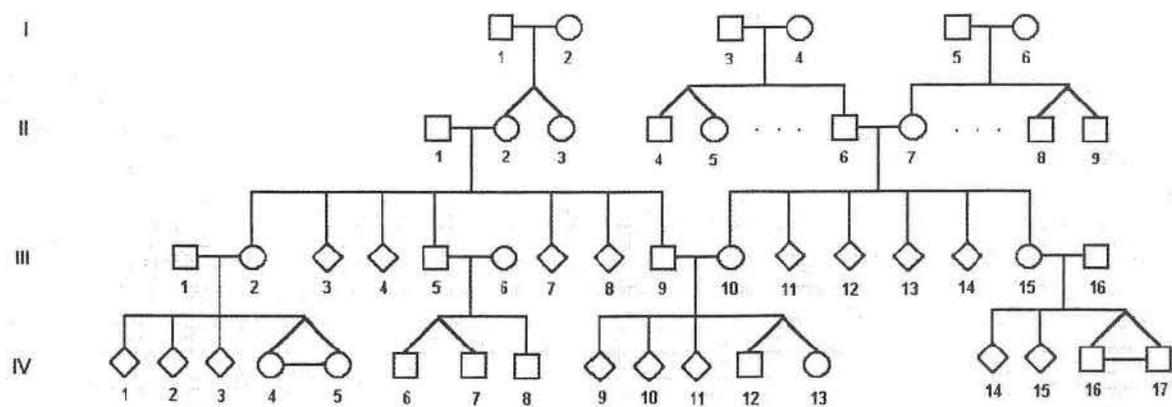
Genealogia 4

Não se observa salto de geração. O indivíduo III.12 possui primos gêmeos em segundo grau. A mãe do indivíduo IV.4 também tem gêmeos na família (não representados na genealogia). Não foi possível coletar sangue de nenhum destes pares, por se tratarem de indivíduos que não residem em Linha São Pedro.



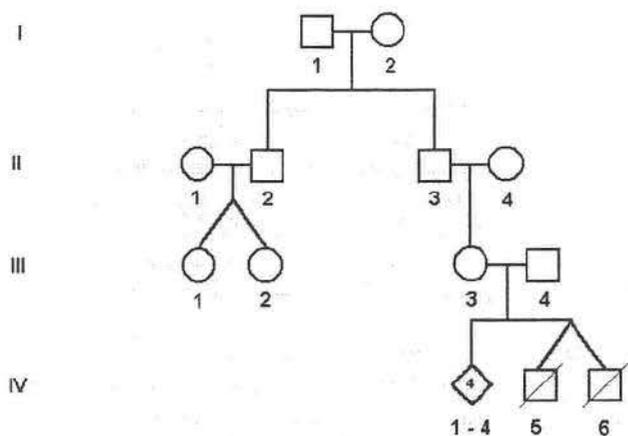
Genealogia 5

Não se observa salto de geração. O indivíduo III.3 possui o mesmo sobrenome dos indivíduos III.1 e III.16 da genealogia 6 mas afirma não ser aparentado com os mesmos. Foi coletado sangue dos indivíduos IV.1 e IV.2 (par 11).



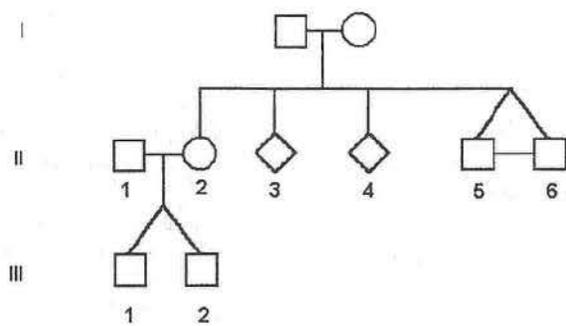
Genealogia 6

Não se observa salto de geração. O indivíduo II.2 afirma não ser o único caso de gêmeos em sua família. Os indivíduos III.1 e III.16 afirmam serem parentes distantes. Foi determinada a zigosidade de todos os pares da geração IV (pares 14, 13, 12 e 15 respectivamente).



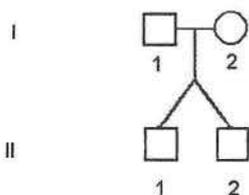
Genealogia 7

Não se observa salto de geração. Não possuem relação de parentesco com membros de outras genealogias. Não foi possível coletar sangue de nenhum dos pares.

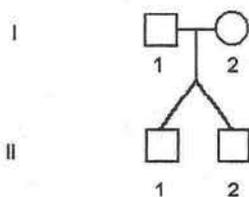


Genealogia 8

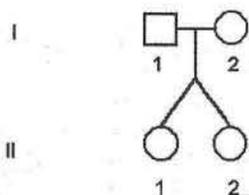
O indivíduo II.1 refere ter mais gêmeos na famílias mas não soube precisar qual seu parentesco. Foi coletado sangue dos indivíduos II.5, II.6 (par 16), III.1 e III.2 (par 17).



Genealogia 9



Genealogia 10



Genealogia 11

As genealogias 9, 10 e 11 representam casos aparentemente isolados de nascimentos gemelares. O pai do indivíduo II.2 da genealogia 10 é primo em segundo grau do indivíduo II.2 da genealogia 1. Os demais indivíduos das três genealogias não referiram parentesco com nenhum membro de outras genealogias. Não foi coletado sangue de nenhum dos pares de gêmeos.

V.5. FOTOGRAFIAS



Visão geral de Linha São Pedro



Par 1 - genealogia 1



Par 2 - genealogia 2



Par 3 - genealogia 2



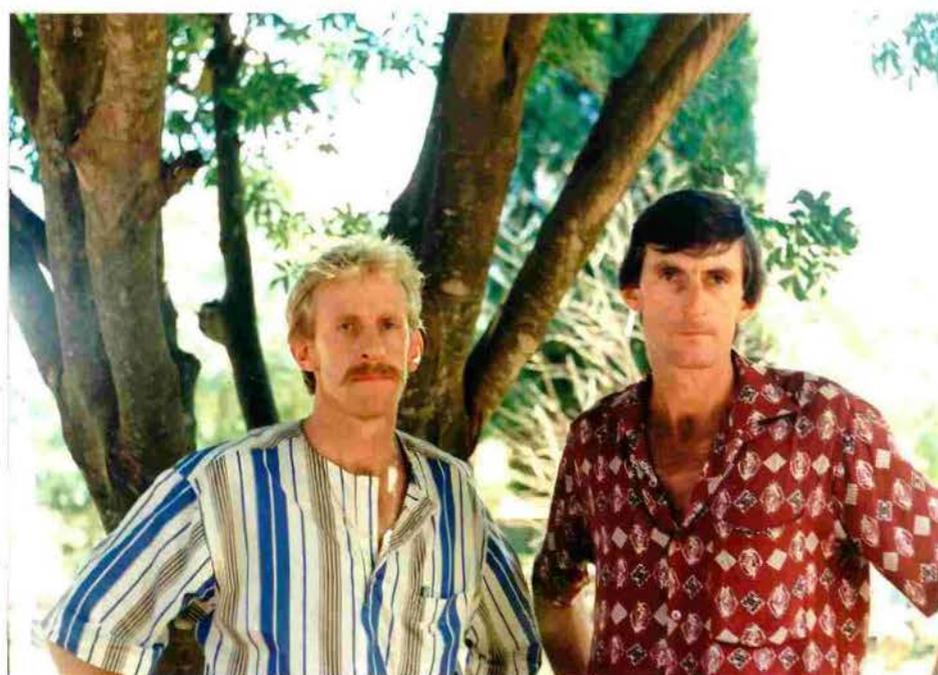
Par 4 - genealogia 2



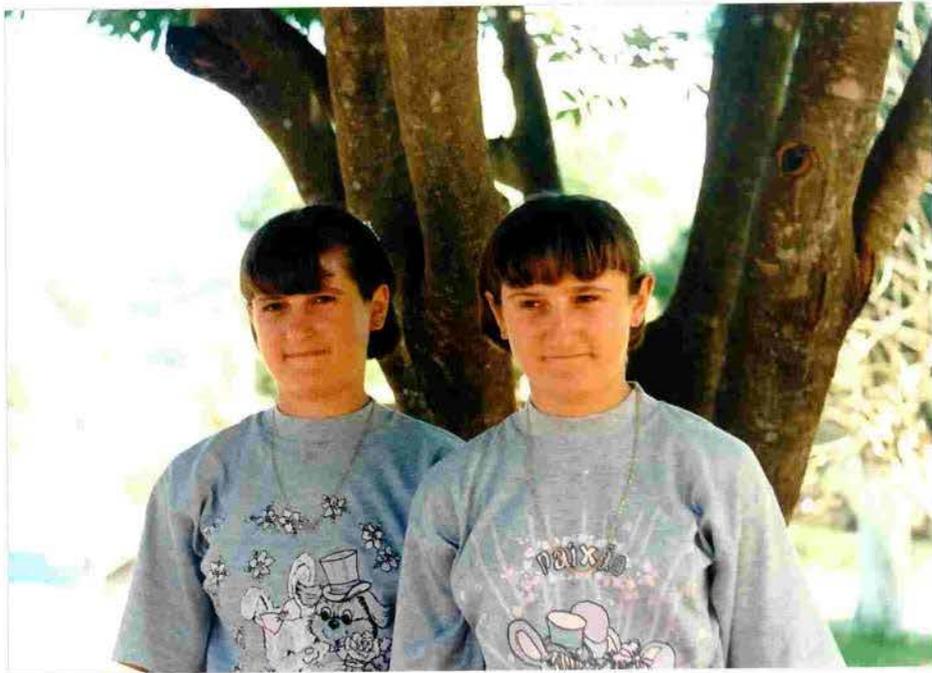
Par 5 - genealogia 2



Par 6 - genealogia 2



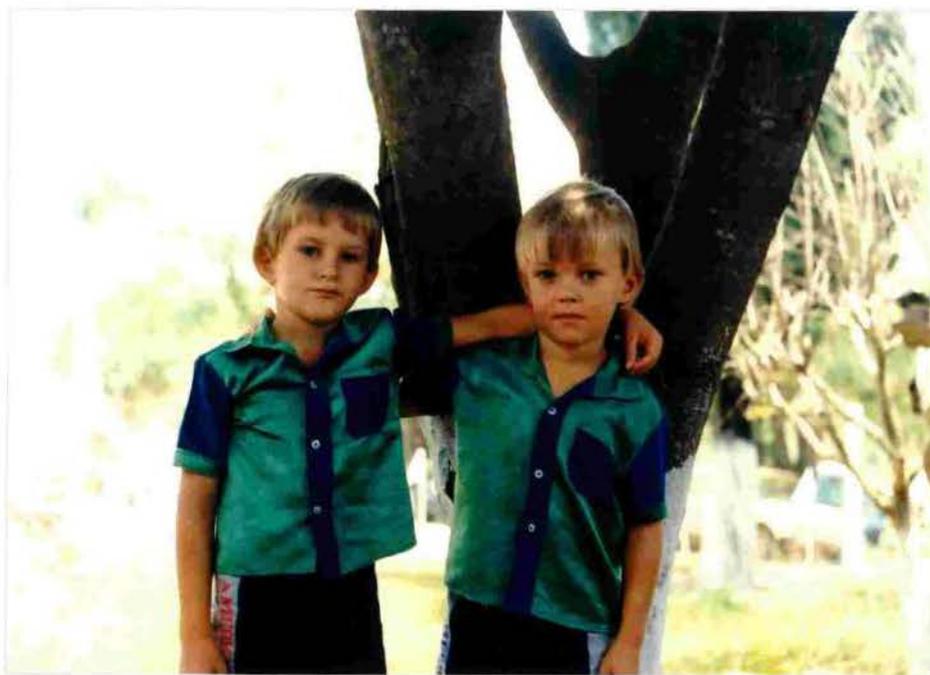
Par 7 - genealogia 3



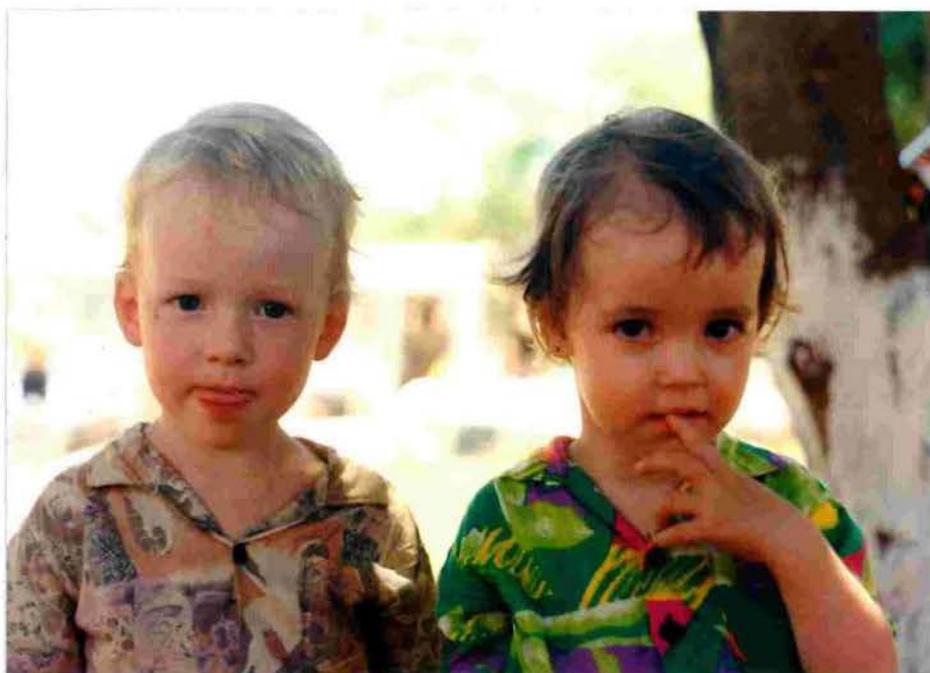
Par 8 - genealogia 3



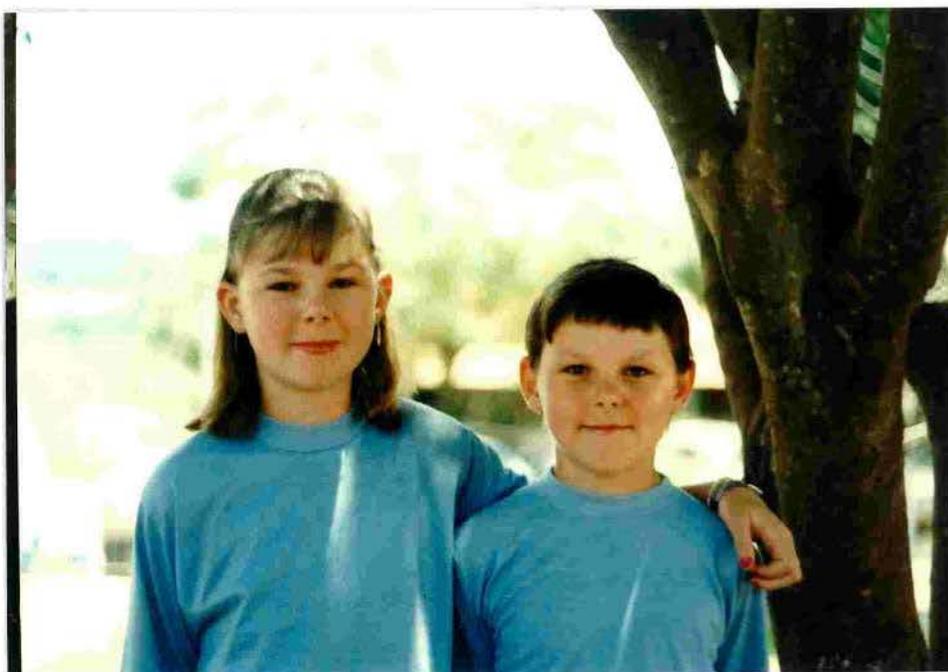
Par 9 - genealogia 3



Par 10 - genealogia 3



Par 11 - genealogia 5



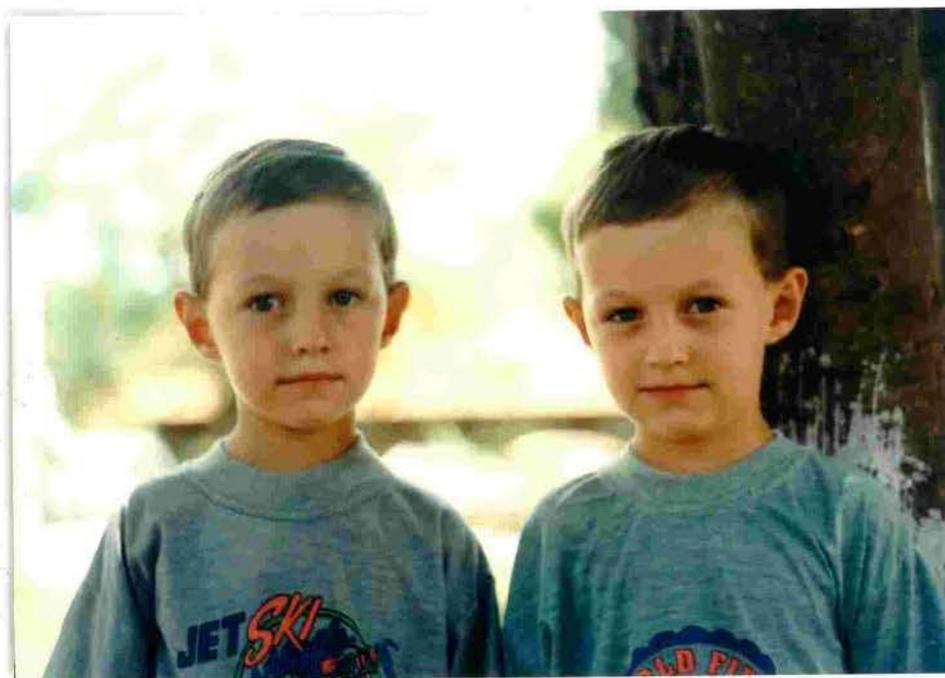
Par 12 - genealogia 6



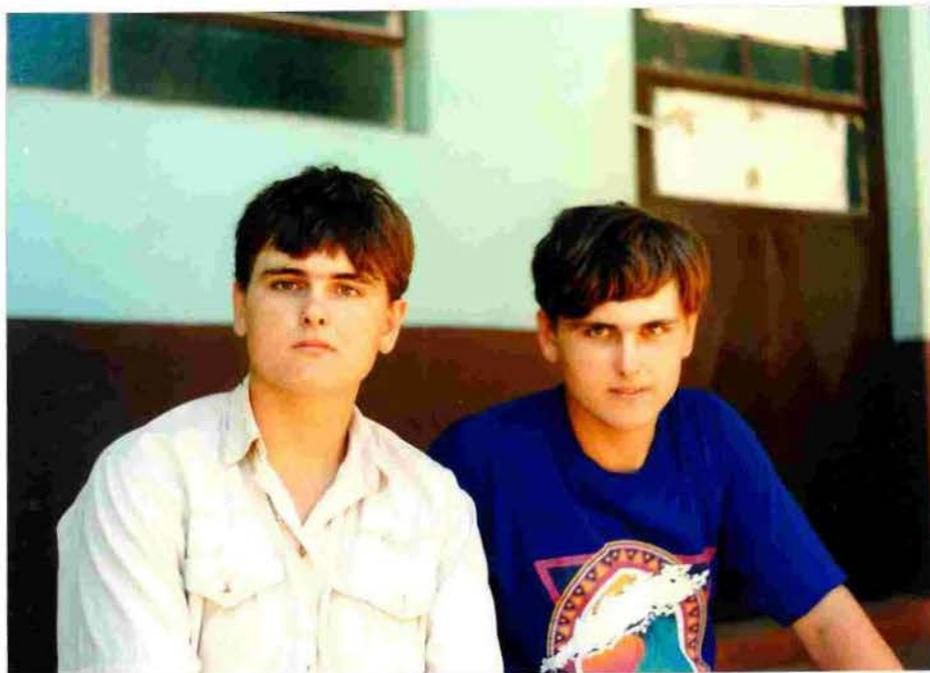
Par 13 - genealogia 6



Par 14 - genealogia 6



Par 15 - genealogia 6

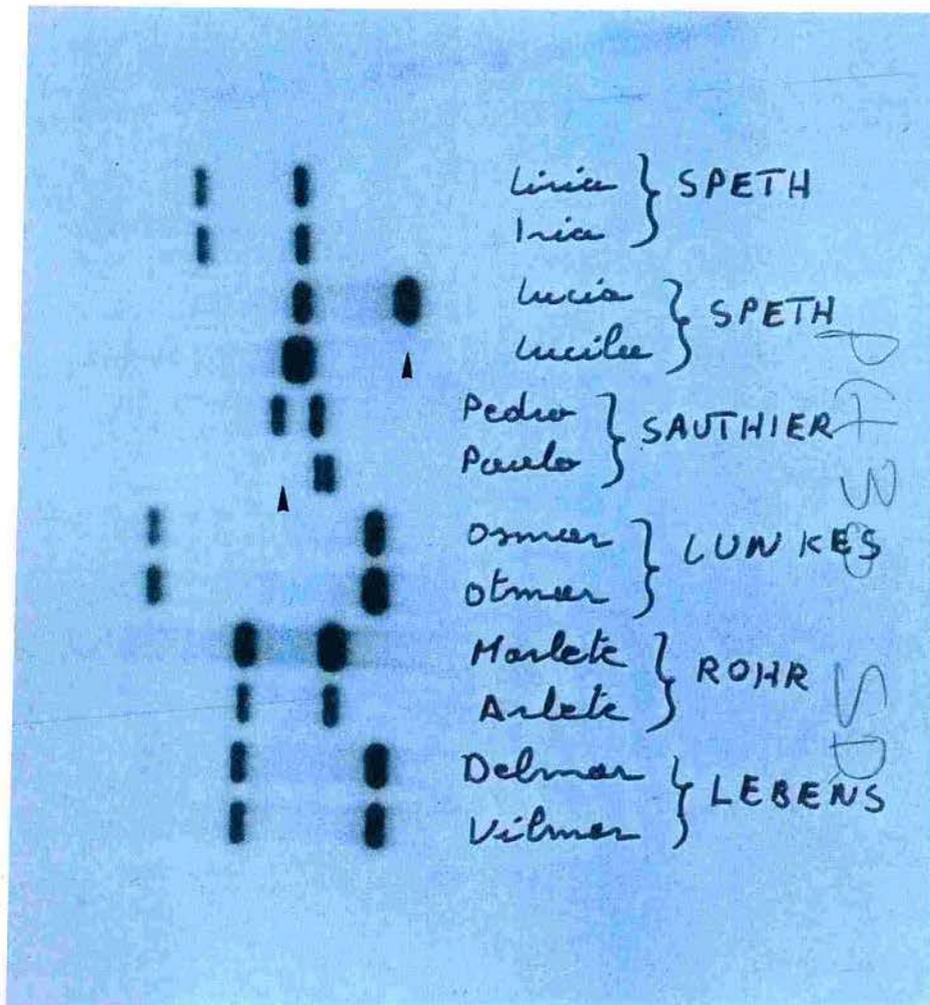


Par 16 - genealogia 8

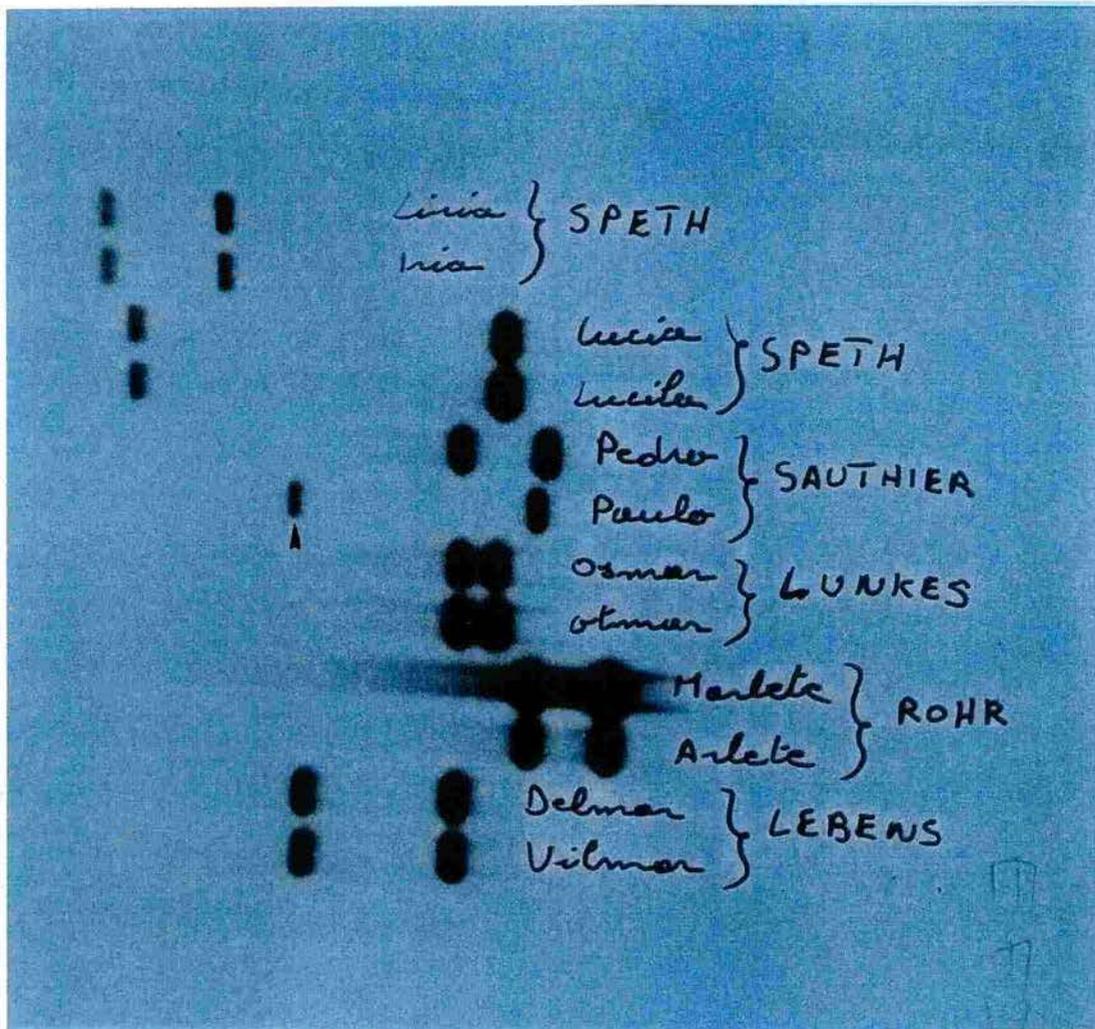


Par 17 - genealogia 8

Autoradiografia 1 - Padrões encontrados para sonda de VNTR PH30 em 6 pares de gêmeos. As diferenças na altura das bandas (indicadas pelas setas) são evidências de dizigosidade.



Autoradiografia 2 - Padrões encontrados para sonda de VNTR EFD 52 em 6 pares de gêmeos. Apenas um par apresenta diferença na altura das bandas (indicada pela seta).



Autorradiografia 3 - Padrões encontrados para sonda de VNTR Ceb 42 em 6 pares de gêmeos. As diferenças na altura das bandas (indicadas pelas setas) são evidências de dizigiosidade.



VI. DISCUSSÃO

Como já foi anteriormente mencionado, a etiologia da gemelaridade ainda não está totalmente definida. Neste sentido, fenômenos como o de Linha São Pedro constituem excelente fonte de estudo por apresentarem uma alta incidência de gêmeos restrita a uma região geográfica específica e com grande homogeneidade étnica. Assim sendo, os dados obtidos nesta população poderiam auxiliar na elucidação de fatores envolvidos na etiologia dos nascimentos gemelares.

Inicialmente comprovou-se que a taxa de gemelaridade em Linha São Pedro está realmente aumentada em relação ao descrito na literatura. Este fato chama ainda mais a atenção quando consideramos a origem étnica dos indivíduos, uma vez que, segundo Vogel e Motulsky (1986), populações caucasóides teriam incidências mais baixas do que, por exemplo, africanos. É importante ressaltar que a população em estudo não apresenta nenhum grau de cruzamento com indivíduos negróides, sendo sua imensa maioria de origem alemã.

A comparação da incidência de nascimentos gemelares no período de 1990 a 1994 em Linha São Pedro com a incidência de nascimentos gemelares no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 1994 revelou que esta taxa está bastante aumentada tanto na população de Linha São Pedro (10%) quanto no HCPA (3%) com relação ao descrito por Beiguelman e Villarroel-Herrera (1993) para a população brasileira (0,8%). Os dados obtidos para o HCPA, entretanto, não são representativos para o estado do Rio Grande do Sul por se tratar de um hospital para o qual são encaminhados casos de maior risco, o que não deixa de ser o caso de partos múltiplos. Por isso, deve-se comparar os dados obtidos em Linha São Pedro com os dados fornecidos pela Divisão de Informação em Saúde da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do estado. Esta comparação revela que realmente a incidência de nascimentos gemelares está aumentada em Linha São Pedro mas revela também que a incidência no Estado do Rio Grande do Sul (1,8%) parece estar aumentada em relação ao descrito para a população Brasileira por Beiguelman e Villarroel-Herrera (1993). Estes autores inclusive relatam um declínio da taxa de gemelaridade na população brasileira, devido à redução da proporção de parturientes negróides e a um declínio da paridade. Os dados obtidos para o estado não permitem inferências sobre tendências de declínio

ou aumento na taxa de gemelaridade pois compreendem um período muito curto de tempo (3 anos) mas, mesmo assim, refletem um fato interessante. Afinal, o componente negróide é considerado menos importante na população gaúcha do que em outros estados do Brasil. E, se considerarmos o caso específico de Linha São Pedro, a contribuição de parturientes negróides para a taxa de nascimentos múltiplos pode ser considerada nula. Talvez, a questão do número de filhos esteja contribuindo mais para a elevação desta taxa do que o componente étnico propriamente dito, especialmente no caso do Rio Grande do Sul como um todo. O caso de Linha São Pedro, até por estar localizado numa região com percentual relativamente baixo em comparação com o resto do estado, parece ser mesmo um fenômeno isolado, para o qual poderiam estar contribuindo outros fatores etiológicos.

Os fatores etiológicos sugeridos para gemelaridade diferem para gêmeos mono e dizigóticos. Para estes últimos influências genéticas e ambientais estão bem caracterizadas. Já para os primeiros, a maioria dos autores descarta a existência de uma predisposição genética. Por isso uma determinação confiável da zigosidade é de extrema importância em estudos desse tipo. A utilização do Método da Diferença de Weinberg se mostrou ineficiente para um número amostral tão pequeno, como pode ser visto pela comparação entre os percentuais de dizigotidade encontrados pela aplicação deste método (23%) e através da análise de DNA (65%) para os 17 pares estudados. Esta super-estimativa do número de gêmeos monozigóticos parece ser devida a ocorrência de um maior número de pares de gêmeos dizigóticos do mesmo sexo do que de sexos opostos (Bressers e cols., 1987). Teoricamente esta tendência desaparece à medida em que o número amostral torna-se maior (Vogel e Motulsky, 1986). Portanto, o valor obtido para os 42 pares de gêmeos (67% de dizigóticos e 33% de monozigóticos) pode ser tomado como uma aproximação mais razoável da realidade. Esta proporção, inclusive, está de acordo com a citada por Thompson e Thompson (1980) para americanos brancos.

A análise das genealogias revela alguns padrões em comum. O principal deles é a ausência de salto de geração. É preciso salientar que, de um modo geral, nas gerações I e II não foram registrados gêmeos mas isto pode ser, pelo menos em parte, devido à imprecisões na obtenção das informações, uma vez que esses indivíduos não foram entrevistados e muitos dos quais inclusive já são falecidos. Outro aspecto em

comum nas genealogias é que os pares de gêmeos monozigóticos encontram-se dispersos em meio aos pares de dizigóticos, geralmente como primos ou tios. Existem três possíveis explicações para este fenômeno. A primeira seria de que estes pares foram erroneamente classificados como sendo monozigóticos quando na verdade são dizigóticos. A probabilidade disto ter ocorrido, como já foi mencionado, é de 1/64. Uma outra hipótese seria que os pares de gêmeos monozigóticos estão distribuídos entre os dizigóticos apenas por casualidade e este fenômeno não tem significado biológico algum. A terceira possibilidade seria de que existem mecanismos comuns que favorecem a ocorrência tanto de gêmeos monozigóticos quanto dizigóticos e estes mecanismos estariam presentes nas famílias que apresentam os dois tipos de gêmeos. Estes fatores poderiam dizer respeito à formação dos gêmeos em si, uma vez que para Côté e Gyftodimou (1991) o processo de formação de gêmeos monozigóticos e dizigóticos compartilha parte das suas causas. Ou então, poderia ser algo relacionado à própria capacidade materna em levar um gravidez a termo, como proposto por Boomsma e cols. (1992).

Essa última possibilidade está relacionada às hipóteses que correlacionam gêmeos dizigóticos e fertilidade (Vogel e Motulsky, 1986; Boomsma e cols., 1992). Um dado que não ficou claro em todas as genealogias é o número de filhos, embora, de um modo geral, as famílias apresentem proles relativamente grandes. Essa característica pode ser atribuída, em parte, ao fato de se tratar de famílias da zona rural, onde há uma tendência a um número maior de filhos do que na cidade (Fellman e Eriksson, 1987). Mesmo assim parece estar havendo uma seleção para fecundidade nos moldes descritos por Vogel e Motulsky (1986), em que as mulheres com maior fertilidade contribuem mais para a taxa de nascimentos.

De qualquer forma, a alta recorrência familiar demonstrada nas genealogias sugere a presença de fatores genéticos para gemelaridade. Entretanto, a sua utilização para especulação do tipo de herança parece ser difícil pois não existe um padrão comum a todas as genealogias. A característica pode estar sendo transmitida tanto por linhagem materna quanto paterna, ou ainda, por ambos. Essa diversidade de padrões pode ser devida a genes de expressividade variada, bem como a variações de penetrância. Além disso, a maioria dos autores sugere que os fatores genéticos envolvidos, apesar de poucos, seriam pleiotrópicos (Côté e Gyftodimou, 1991), não

descartando efeitos poligênicos e heterogeneidade genética (Chenevix-Trench e cols., 1993).

A ausência de fatores ambientais que são comumente associados à ocorrência de gêmeos, como uso de anticoncepcionais e tratamentos para engravidar, faz com que aumentem ainda mais as possibilidades de fatores genéticos estarem envolvidos neste aumento da taxa de gemelaridade. Outros fatores externos que poderiam contribuir para o aumento da taxa de gemelaridade seriam o status marital e a situação sócio-econômica da mãe (Fellman e Eriksson, 1987). Não existem relatos de que agentes ambientais como mutagênicos poderiam influenciar a taxa de gêmeos (Bressers e cols., 1987) ainda que Campbell e cols. (1987) citem os pesticidas utilizados na agricultura como um dos responsáveis pelo declínio na taxa de gêmeos dizigóticos. Esse, entretanto, não parece ser o caso, mesmo em se tratando de uma população rural, potencialmente exposta a pesticidas agrícolas.

VII. CONCLUSÕES

O que parece ter ocorrido em Linha São Pedro é uma concentração de genes que predispõem à gemelaridade, provavelmente presentes no pequeno *pool* de genes que originou a população, a qual permaneceu relativamente isolada e com alto grau de endocruzamento. Essa situação, associada a condições externas como o fato de serem uma comunidade rural, com alto número de filhos por casal e razoável longevidade, favoreceram o aumento da taxa de gemelaridade verificado na região.

Entretanto, uma determinação mais precisa dos mecanismos envolvidos nessa predisposição para gemelaridade teria que compreender estudos a respeito dos genes relacionados ao controle hormonal, aos receptores de hormônios e à fertilidade de uma maneira geral. Além disso, estudos mais detalhados sobre os tipos de agentes ambientais aos quais estão expostos os moradores desta região também poderiam ser elucidativos. Ao mesmo tempo, os pares de gêmeos cujo DNA não foi analisado poderiam ser contactados para ter sua zigosidade determinada, e poderia haver um maior detalhamento das genealogias, com entrevista não apenas de familiares de gêmeos mas também de outros moradores da localidade e consultando dados de cartórios.

Nesse sentido este trabalho se constituiu num estudo preliminar que permitiu confirmar o aumento da taxa de gemelaridade em Linha São Pedro e atribuir sua causa principalmente a fatores genéticos, cujos mecanismos devem ser melhor investigados em estudos complementares.

VIII. RESUMO

A ocorrência de nascimentos múltiplos na espécie humana é um evento relativamente raro. São reconhecidos dois tipos de gêmeos: os monozigóticos, ou idênticos, e os dizigóticos, ou fraternos. A etiologia dessa característica não está bem determinada e acredita-se que fatores ambientais e genéticos poderiam estar envolvidos. De um modo geral, os fatores genéticos que predisõem para gemelaridade são melhor determinados no caso de gêmeos dizigóticos, enquanto que os monozigóticos seriam relativamente independentes de influências genéticas e ambientais.

Em Linha São Pedro, município de Cândido Godói, localizado a 35 km de Santa Rosa e 524 km de Porto Alegre, observou-se uma alta frequência de gêmeos, descobrindo-se 34 pares num levantamento inicial feito pelos próprios moradores. Por se tratar de uma população etnicamente homogênea, composta por descendentes de alemães, e restrita a uma região geográfica pequena, o estudo dessa comunidade poderia auxiliar a esclarecer os mecanismos genéticos e ambientais que influenciam o surgimento desta característica.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a real incidência de gêmeos em Linha São Pedro e a proporção de pares mono e dizigóticos, bem como tentar identificar fatores de risco para gemelaridade nesta população e propôr mecanismos que pudessem explicar os fenômenos observados.

Foi feita a determinação da zigosidade de 17 pares de gêmeos por análise de DNA (*Southern Blotting*) utilizando-se as sondas unilocais para VNTRs PH30, EFD 52, PLH1 e Ceb 42. Também foram realizadas análises de genealogias e entrevistas com a população. Além disso, foram obtidos dados a respeito da incidência de nascimentos gemelares na região, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no estado do Rio Grande do Sul.

No período de 1990 a 1994 a incidência de nascimentos gemelares em Linha São Pedro foi de 10%. A análise das genealogias mostrou uma alta recorrência de nascimentos múltiplos entre as famílias, bem como um elevado grau de endocruzamento na comunidade. Outro traço comum entre as genealogias é que não houve salto de

gerações. Os dados de zigosidade indicam que 11 dos 17 pares de gêmeos estudados eram dizigóticos (65%), sendo que a probabilidade dos outros 6 pares terem sido erroneamente classificados como monozigóticos foi de apenas 1/64. Não foi detectado um fator externo (ambiental) que pudesse estar influenciando no aparecimento desta característica.

A incidência de nascimentos gemelares em Linha São Pedro está realmente aumentada em relação ao descrito na literatura e mesmo em relação ao estado como um todo. A alta recorrência familiar, aliada à ausência de mecanismos externos que sabidamente influenciam as taxas de gemelaridade, sugere a presença de fatores genéticos que poderiam estar favorecendo este fenômeno na população estudada. A predominância de gêmeos dizigóticos está de acordo com essa hipótese de predisposição genética para a gemelaridade. No entanto, a determinação do tipo de herança que poderia estar envolvida é uma tarefa complexa, pois devem tratar-se de genes pleiotrópicos, de expressividade variável, não podendo-se descartar efeitos poligênicos ou heterogeneidade genética. Estudos mais detalhados, envolvendo pesquisas com as mães dos gêmeos e com o restante da população, seriam necessários para auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na predisposição genética para gemelaridade em Linha São Pedro.

IX. ABSTRACT

The incidence of multiple births in humans is an unusual event. Basically there are two kinds of twins: monozygotic (or identical) and dizygotic (or fraternal). The ethiology of twinning is not clear and it is supposed that both environmental and genetic factors could be involved. The genetic factors are best accepted for dizygotic twinning and it is thought that monozygotic twinning is independent of environmental and genetic influences.

At Linha São Pedro, in Cândido Godói, county, located at about 35 km of Santa Rosa and 524 km of Porto Alegre, South of Brazil, it has been observed a high frequency of twins. The residents found 34 twin pairs in a preliminar survey. As this population is ethnically uniform, originated from germany ancestors and restricted to a small region, the study of this community could help to find out the genetic and environmental factors that influence the twinning rate.

The aim of this work was to stablish the incidence of twinning at Linha São Pedro and the proportion of monozygotic and dizygotic twins, and also to search for risk factors for twinning in this community, and to identify possible mechanisms involved in the genesis of twinning.

The determination of zygosity was done by DNA analysis (Southern-Blotting) with probes for VNTRs PH30, EFD52, PLH1 and Ceb 42. We also interviewed the population and made detailed pedigrees. Data about the incidence of twinning at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Rio Grande do Sul state were also obtained.

Between 1990 to 1994 the twinning rate at Linha São Pedro was 10%. The pedigrees analysis showed a high familiar recurrence for twinning, and a high inbreeding rate as well. Regarding the zygosity, from 17 pairs studied by DNA analysis 11 were dizygotic (65%). The probability of the remaining 6 pairs were erroneously classified as monozygotic was only 1/64. It was not detected any environmental factor wich could be influencing the twinning rate.

We concluded that the incidence of twin births at Linha São Pedro is higher when compared both to literature and to data of Rio Grande do Sul state. The high familiar recurrence and the absence of external factors known to influence twinning rate suggests the occurrence of genetic factors causing this finding in the population studied. The higher proportion of dizygotic twins agrees with the hypothesis of genetic predisposition to twinning in this group. However, the determination of the mode of inheritance is a difficult task, as pleiotropic genes with variable expressivity are probably involved. Polygenic effects and genetic heterogeneity may also be present. More detailed studies, including research to be performed in the mothers of twins and in the overall population involved, would be necessary to further clarify the mechanisms related to the genetic predisposition to twinning in Linha São Pedro.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beiguelmann B, Villarroel-Herrera HO (1993) Factors Influencing the Decline of Twinning in a Southeastern Brazilian Population *Rev Brasil Genet* 16,3:793-801
- Boomsma DI, Frants RR, Bank RA, Martin NG (1992) Protease Inhibitor (Pi) Locus, Fertility and Twinning *Hum Genet* 89:329-332
- Bressers WMA, Eriksson AW, Kostense PJ, Parisi P (1987) Increasing Trend in the Monozygotic Twinning Rate *Acta Genet Med Gemellol* 36:397-408
- Brito ROA Análise de Polimorfismos de DNA (VNTRs) por PCR para Estudos de Investigação de Paternidade em População Brasileira - Tese de Mestrado do Depto. de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1993:88pp.
- Callegari SM Antígenos e Anticorpos do Sistema ABO em Gêmeos - Tese de Mestrado do Depto. de Genética da UFRGS, Porto Alegre, 1972:105 pp.
- Campbell D, Thompson B, Pritchard C, Samphier H (1987) Does the Use of Oral Contraception Depress Dizygotic Twinning Rate? *Acta Genet Med Gemellol* 36:409-415
- Chenevix-Trench G, Healey S, Martin NG (1993) Reproductive Hormone Genes in Mothers of Spontaneous Dizygotic Twins: An Association Study *Hum Genet* 91:118-120
- Côté GB, Gyftodimou J (1991) Twinning and Mitotic Crossing-Over: Some Possibilities and Their Implications *Am J Hum Genet* 49:120-130
- Derom C, Bakker E, Vlietnick R, Derom R, Van den Berghe H, Thiery M, Pearson P (1985) Zygosity determination in newborn twins using DNA variants. *J. Med. Genet.* 22:279-282.

- Derom C, Vlietinck R, Derom R, Van den Berghe H, Thiery M (1987) Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet I*:1236-1238.
- Edward RG, Mettler L, Walters DE (1986) Identical Twins and in vitro fertilization *J In Vitro Fertile Embryo Transplant* 3:114-117
- Fellmann JO, Eriksson AW (1987) Statistical Models for the Twinning Rate *Acta Genet Med Gemellol* 36:297-312
- Gleeson SK, Clark AB, Dugatkin LA (1994) Monozygotic Twinning: An Evolutionary Hypothesis *Proc Nat Acad Sci USA* 91:11363-11367
- Harvey MAS, Huntley RMC, Smith DW (1977) Familial Monozygotic Twinning *J. Pediat.* 90:246-248.
- Hill AVS, Jeffreys AJ (1985) Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygosity at birth *Lancet II*:1394-1395.
- Junqueira LC, Zago D *Embriologia Médica e Comparada* 3ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1982:291pp.
- McKusick VA, Francomano CA, Antonarakis SE *Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal recessive and X-linked phenotypes* 10ed. London:The Johns Hopkins University Press, 1992.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acid Res.* 16:1215.
- Thompson J, Thompson M *Genética Médica* 3ed. Rio de Janeiro:Guanabara, 1980:365pp.
- Vogel V, Motulsky AG *Human Genetics - Problems and Approaches* 2ed. Berlin:Springer-Verlag, 1986:807pp.

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. *Molecular Biology of the Gene* 4ed. Menlo Park:Benjamin/Cummings, 1988:1163pp.

Witschi E (1952) Overripeness of the egg as a cause of twinning and teratogenesis
Cancer Res 12:763-768

Wyshak G, White C (1965) Genealogical Study of Human Twinning *Am. J. Public Health* 55:1586-1593.

XI. ANEXOS

XI.1. PROTOCOLO DE ESTUDO

Entrevista nº

GÊMEOS

Nome:

Sobrenome:

Data Nascimento:

Evolução dos gêmeos:

Placenta:

Data Nascimento Mãe:

Uso de Anticoncepcional:

Período:

Tratamento para engravidar:

Época:

Atividades dos pais:

Concordância para canhoto/destro

tendência a engordar

temperamento

FAMÍLIA

Número de gêmeos

Origem dos antepassados

Consanguinidade

Doenças

XI.2. TERMO DE CONSENTIMENTO

Consentimento Pós-Informação

O presente projeto de pesquisa tem por objetivos determinar se a frequência de gêmeos na população de Linha São Pedro, município de Cândido Godói, RS, está significativamente aumentada; avaliar se os pares de gêmeos registrados são monozigóticos ou dizigóticos, e identificar a presença de possíveis fatores de risco para a gemelaridade na população estudada.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os gêmeos e seus familiares, bem como através da análise de DNA obtido a partir de sangue periférico.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo, ou familiares, no caso de menores de idade, terá acesso às mesmas.

Pelo presente Consentimento Pós-Informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são o dr. Roberto Giugliani (331-6699 ramal 2315) e a bióloga Ursula Matte (331-6699 ramal 2309).

Fui, igualmente informado da garantia de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa; da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e caráter confidencial das informações.

Data:

Indivíduo:

Responsável Legal:

Pesquisador:

XI.3. NASCIMENTOS GEMELARES NO RIO GRANDE DO SUL

Número e proporção de nascimentos múltiplos duplos no Rio Grande do Sul de 1992 a 1994 por Delegacia Regional de Saúde (D.R.S.). Fonte: Divisão de Informação em Saúde - Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, RS, 1995.

D.R.S.	Cidade Sede	Número de nascimentos gemelares	Percentual do total de nascimentos
1ª	Porto Alegre	1047	1,8
2ª	Porto Alegre	279	1,8
3ª	Pelotas	244	1,9
4ª	Santa Maria	156	1,8
5ª	Caxias do Sul	270	1,9
6ª	Passo Fundo	161	1,6
7ª	Bagé	88	1,8
8ª	Cachoeira do Sul	82	2,1
9ª	Cruz Alta	47	1,8
10ª	Alegrete	143	1,6
11ª	Erechim	71	1,7
12ª	Santo Angelo	108	1,6
13ª	Santa Cruz do Sul	81	1,6
14ª	Santa Rosa	76	1,6 *
15ª	Palmeira das Missões	149	2,0
16ª	Lajeado	97	1,9
17ª	Ijuí	65	1,9
18ª	Osório	100	2,0
Total do estado		3201	1,8

* Região de Linha São Pedro