

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *IGF-I* (CA_n) E *IGFBP-3-202* A/C E SUAS
POSSÍVEIS RELAÇÕES COM A GEMELARIDADE EM HUMANOS**

Mariana de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lavínia Schuler Faccini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ursula Matte

Porto Alegre
Dezembro de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho possui vínculo ao INCT – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e também no Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisa Experimental no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

A aluna recebeu bolsa de estudos de apoio técnico concedido pelo CNPq.

*“Só sabemos com exatidão
quando sabemos pouco; à medida
que adquirimos conhecimentos,
instala-se a dúvida.”*

Goethe

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma, seja por apoio técnico, financeiro ou emocional me ajudaram a finalizar este trabalho.

Em especial a cidade de Cândido Godói, que desde o início foi receptiva. A minha orientadora, Dr^a Lavínia Schuler Faccini e a minha co-orientadora Dr^a Ursula Matte, que estiveram presentes em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho, assim como a Alice Tagliani Ribeiro. Obrigada!

Agradeço também ao Nelson Fagundes, pelas discussões produtivas e que sempre acrescentaram muito, assim como a todos os colegas do Laboratório da UFRGS que fizeram dos meus dias de pesquisa muito mais produtivos e divertidos, vocês sabem o quanto são importantes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
<i>ABSTRACT</i>	4
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 BIOLOGIA DA GEMELARIDADE.....	6
1.2 FREQUÊNCIA DE NASCIMENTOS GEMELARES, DIZIGÓTICOS (DZ) E MONOZIGÓTICOS (MZ).....	7
1.3 FATORES ETIOLÓGICOS NA GEMELARIDADE.....	9
1.3.1 Fatores Ambientais.....	9
1.3.2 Fatores Genéticos.....	10
1.4 O FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-I): SUA IMPORTÂNCIA NA REPRODUÇÃO E POSSÍVEL ATUAÇÃO NA GEMELARIDADE.....	12
1.4.1 O gene <i>IGF-I</i>	13
1.4.2 O polimorfismo (CA) _n	14
1.5 O GENE <i>IGFBP-3</i>	15
1.5.1 Polimorfismo no gene <i>IGFBP3</i> (rs2854744).....	16
1.6 CÂNDIDO GODÓI E A GEMELARIDADE.....	16
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 3. ARTIGO.....	20
CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXOS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- : absence

+ : presence

BMP15: proteína morfogênica óssea 15

CG: Cândido Godói

DC: dicoriônico

DNA: ácido desoxirribonucléico

DZ: dizigótico

FSH: hormônio folículo estimulante

GDF9: fator de diferenciação 9

GH: hormônio do crescimento

IGF-2: fator de crescimento semelhante à insulina 2

IGFBP-3: proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina 1

IMC: índice de massa corporal

LH: hormônio luteinizante

MC: monocoriônico

MMP: metaloproteinases de matriz

MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase

MZ: monozigótico

PA: Porto Alegre

PCR: reação em cadeia da polimerase

SNP: polimorfismo de único nucleotídeo

RESUMO

Ainda que os fatores genéticos relacionados à gemelaridade na espécie humana tenham sido bastante investigados, há um grande desconhecimento sobre genes específicos influenciando este processo.

Neste estudo foram analisados dois genes, *IGF-I* e *IGFBP-3*, que sintetizam proteínas que formam um complexo, onde o gene *IGFBP-3* codifica a proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina, que é responsável por carregar 90% da proteína sintetizada pelo gene *IGF-I* (fator de crescimento semelhante à insulina). A proteína sintetizada pelo gene *IGF-I* atua nas células da granulosa promovendo o aumento no número de receptores de FSH e LH, retardando o processo de atresia folicular, promovendo assim a foliculogênese, ovulação, fertilização, implantação e subsequente desenvolvimento do embrião. O gene *IGF-I* apresenta o polimorfismo de (CA)_n, onde o número de repetições de citosina e adenina é variável. O gene *IGFBP-3* possui um SNP na posição – 202 em sua região promotora, no qual pode ocorrer troca de adenina para citosina (A/C). Há evidências de que estes *loci* influenciem os níveis IGF-I e de IGFBP-3 em mulheres jovens.

A amostra foi obtida na cidade de Candido Godoi (CG) no Rio Grande do Sul, Brasil, conhecida por ter uma alta prevalência de nascimentos gemelares independente de práticas de fertilização assistida. Foi desenvolvido um estudo do tipo caso – controle. Foram estudadas um total de 39 casos (mães de gêmeos naturais de CG) e 214 controles, sendo destes 97 mulheres residentes em CG e 117 em Porto Alegre, que tiveram apenas gestações únicas. Foi realizada extração de DNA a partir de sangue e genotipagem através da metodologia *TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA)*.

As análises indicaram que o alelo 198 (CA₂₂) do gene *IGF-I* está em maior frequência no grupo de mães de gêmeos, tanto quando comparado com controles de CG (p= 0,01), *odds ratio* de 95% de confiança, quando com controles de PA (p= 0,001). Os três grupos estudados não possuem diferenças significativas nas frequências dos alelos do polimorfismo do gene *IGFBP-3-202-A/C*.

Este estudo aponta o polimorfismo 198 do gene *IGF-I* como um fator envolvido na gemelaridade. Isto está de acordo com observações anteriores, que quanto maior o número

de repetições e CA, maior os níveis de IGF-I circulantes, que por sua vez induzem maior número de receptores FSH e LH, promovendo a foliculogênese, ovulação, fertilização e também desenvolvimento do embrião.

ABSTRACT

Although genetic factors related to twin births in humans have been largely investigated, there is great unknowledge about specific genes influencing this process.

On this study two genes were analyzed, *IGF-I* and *IGFBP-3*, which synthesize proteins that form a complex, where the gene *IGFBP-3* codify the connecting protein 3 to the growth factor similar to insulin, which is responsible for carrying 90% of the protein synthesized by the *IGF-I* gene (insulin-like growth factor). The protein synthesized by the *IGF-I* gene acts in granulosa cells promoting an increase in the number of receptors for FSH and LH, delaying the process of follicular atresia, promoting folliculogenesis, ovulation, fertilization, implantation and subsequent development of the embryo. *IGF-I* (CA)_n polymorphism, where the number of repetitions of cytosine and adenine is variable. The *IGFBP-3* gene has a SNP at position - 202 in its promoter region, in which can occur an exchange of cytosine to adenine (A/C). There are evidences that this lociis significantly a genetic factor of influence in the levels of IGFBP-3 and IGF-I in young women.

A study type case - control was developed. It was studied a total of 39 cases (mothers of twins from CG) and 214 controls, being 97 women who reside in CG (controls (CG)) and 117 in Porto Alegre, who had only single pregnancies (controls (PA)). DNA extraction was performed from blood and genotyping through the methodology TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA).

The analysis indicated that allele 198 (CA₂₂) of gene IGF-1 is more frequently in the group of mothers of twins, when compared with controls CG ($p = 0.01$) and with controls PA ($p = 0.001$). The three studied groups do not have significant differences in the alleles' frequencies of the polymorphism of gene IGFBP-3-202-A / C.

This study indicates polymorphism 198 of gene IGF-I as a factor involved in twinning. This is in agreement with previous observations that, the greater the number of repetitions and CA, the higher the levels of circulating IGF-I. These are directly involved with the larger number of FSH and LH receptors, promoting folliculogenesis, ovulation, fertilization and also embryo development.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Gestações múltiplas são eventos comuns na biologia de muitas espécies, mas não na espécie humana, já que esta possui adaptações para acomodar um único embrião e desenvolvê-lo (Beiguelman & Franchi-Pinto, 2000). Apesar das dificuldades e riscos que uma gravidez gemelar acarreta, esta persiste na espécie humana e continua a desafiar e intrigar médicos e geneticistas (Machin, 2009).

Os primeiros estudos com gêmeos foram realizados por Francis Galton em 1876, vinte e cinco anos antes da redescoberta dos trabalhos de Gregor Mendel. Galton procurou por meio de seus estudos com gêmeos avaliar que caracteres podiam ser herdáveis e quais eram adquiridos (Beiguelman, 2008). Este tipo de estudo, avaliando a herdabilidade de caracteres, é até hoje responsável pelo maior número de pesquisas envolvendo gêmeos, sendo que um menor número de pesquisadores se dedica ao estudo da própria natureza dos nascimentos gemelares.

1.1 BIOLOGIA DA GEMELARIDADE

A formação dos gêmeos pode ser dizigótica (DZ) ou monozigótica (MZ), sendo a primeira caracterizada por apresentar indivíduos com genótipos diferentes entre si. Se no momento da ovulação forem expelidos dois ou mais ovócitos, ao invés de um, e se ambos forem fertilizados, os zigotos darão origem a um par de gêmeos DZ. O outro modo de ocorrência de gêmeos é dado através de um único zigoto que sofre desenvolvimento irregular, no período de um a 14 dias após a fertilização, originando dois indivíduos com o mesmo genótipo, sendo estes sempre do mesmo sexo (Beiguelman, 2008). Dois terços dos gêmeos MZ são monocoriônicos (MC), isto é, gêmeos que estão conectados a uma única placenta e o terço restante dos gêmeos MZ são dicoriônicos (DC), desenvolvendo-se em placentas distintas (Machin, 2009).

A gemelaridade monozigótica é uma característica intrínseca da reprodução humana. Devido a muitas desvantagens da placentação monocoriônica, não é claro qual a vantagem evolutiva dos gêmeos monozigóticos, podendo ser apenas um fenocópia da gemelaridade dizigótica, cuja vantagem seria uma recuperação mais rápida da população após um evento de extinção (Barigye *et al.*, 2005).

O geneticista americano Charles Boklage (Boklage, 2006) estimou que 12% das concepções humanas são de gêmeos e que em mais de 80% delas há perda de um ou, mais

frequentemente, ambos os filhos. Quando a morte de um dos gêmeos ocorre na fase inicial do seu desenvolvimento, há total absorção do embrião, mas quando o óbito é mais tardio, o feto pode ocasionalmente ser encontrado em meio às membranas, como um feto papiráceo. A incidência desta condição é rara, de 1 em 12.500 casos de gêmeos (Abhijit *et al.*, 2000).

Gestações múltiplas constituem um problema para a saúde em muitos níveis. Riscos de malformações congênitas, estas responsáveis por 15% das mortes perinatais, morte ou restrição de crescimento intra-uterino, sequelas neurológicas e nascimento prematuro são algumas das implicações adversas (Weber & Sebire, 2010). Os nascimentos prematuros ocorrem em torno de 40% das gestações gemelares seis vezes maior do que em gestações únicas (Powers & Kiely, 1994). Hardin *et al.* em 2009 mostraram evidências de que a gemelaridade também está associada com maiores chances de desenvolvimento de problemas cardiovasculares ao recém nascido. Há também riscos maternos, tais como os decorrentes de aborto ou placentação anormal, diabetes gestacional, hipertensão arterial e anemia (Kapoor & Pal, 2009).

1.2 FREQUÊNCIA DE NASCIMENTOS GEMELARES, DIZIGÓTICOS (DZ) E MONOZIGÓTICOS (MZ)

A frequência de nascimentos gemelares varia consideravelmente em diferentes populações, com valores de 9/1000 a 18/1000 nascimentos em todo o mundo (Smits & Monden, 2011).

Na década de 1970 os valores eram de 8/1000 na Ásia e Oceania, 9 – 16/1000 na Europa, USA e Índia, e acima de 17/1000 na África (Smits & Monden, 2011).

A Nigéria é o país que apresenta maiores taxas de gemelaridade no mundo, há relatos de até 53,8/1000 (Nwobodo *et al.*, 2002). Akinboro *et al.* (2008) relataram taxas em torno de 46,5/1000, mas a média no país se mantém em 23,2/1000, segundo Kullima *et al.* (2011). As principais contribuições para esta alta taxa de nascimentos gemelares são fatores como dieta, histórico gemelar na família materna e fatores sócio-ambientais.

Em países não industrializados, de acordo com Smits & Monden (2011) que realizaram um levantamento da taxa de nascimentos gemelares em 76 países, a média é de 13,1 para cada 1000 nascimentos. Estes autores também observam que nos países desenvolvidos a taxa de gemelaridade aumentou, o que pode ser explicado devido às

práticas de fertilização assistida. Outros autores também descrevem acréscimo no número de nascimentos gemelares, como Martin *et al.* (2009), ao relatarem que nos Estados Unidos, entre 1980 e 2006, a taxa de nascimentos gemelares subiu em 101%. Derom *et al.* (2011) ao estudarem os nascimentos de gêmeos DZ e MZ em uma população da província Oriental de Flandres na Bélgica, por um período de quatro décadas (1964 a 2009), observaram um aumento gradativo na taxa de nascimentos ao acaso de gêmeos DZ de 4,3/1000 para 6,1/1000.

O nascimento de gêmeos DZ depende da ocorrência de poliovulação, que depende, por sua vez, do nível de hormônio folículo-estimulante (FSH), e este apresenta variação genética e populacional, sendo mais alto em mulheres de ancestralidade africana do que em européias (Nylander, 1981). Kullima *et al.* (2011) observaram que 63% dos nascimentos gemelares na Nigéria são de gêmeos DZ. O nível de FSH também está relacionado com o tamanho da hipófise, cujo peso máximo é atingido aos 40 anos de idade, assim mães com idade mais avançada têm maiores chances de ter gêmeos (Martin *et al.*, 2009). Em 2006, 20% dos nascimentos de gêmeos foram de mães com idade entre 45 e 54 anos, já mães mais novas, com idade entre 20 e 24 anos, compunham 2% das mães de gêmeos (Martin *et al.*, 2009).

Estudo feito por Beiguelman *et al.* em 1995 mostrou que a taxa de gêmeos MZ é mais frequente em mães mais jovens (Figura 1), já Satija *et al.* (2008) apontaram que estas se mantêm constantes, sem influência da idade, e que constituem 30% de todas as gestações gemelares.

Figura 1. Porcentagem de pares MZ em 1306 partos gemelares segundo o grupo etário de mães (Beiguelman *et al.*, 1995).

Idade	No. de gêmeos	MZ
< 20	77	66,2
20 – 25	289	55,7
25 – 30	444	43,7
30 – 35	339	39,2
35 – 40	123	38,2
≥40	34	41,1

1.3 FATORES ETIOLÓGICOS NA GEMELARIDADE

A gemelaridade é classificada por possuir etiologia complexa, ou multifatorial. Tanto fatores ambientais como genéticos estão implicados e desempenham maior ou menor papel em diferentes grupos populacionais.

1.3.1 Fatores Ambientais

a) Administração de Ácido Fólico

O aumento da ingestão de ácido fólico e o aumento nas taxas de gemelaridade são dois processos paralelos descritos nos últimos anos, mas sua associação permanece controversa, e as relações de causa-efeito também não são conhecidas (Levy & Blickstein, 2006).

b) Idade Materna

Existe um paradoxo em relação à idade materna, pois há um declínio na fertilidade com o avanço da idade materna e aumento na taxa de nascimentos gemelares (Beemsterboer *et al.* 2006). Satija *et al.* (2008) apontam que na idade entre 30 e 34 anos, há uma chance 10 vezes maior de nascimento gemelar dizigótico do que com uma idade inferior a 20 anos, já para o nascimento gemelar monozigótico não há variação pela idade, sendo sempre constante.

c) Peso Materno ao Nascimento

Nohr *et al.* em 2009 realizaram estudo relacionando o peso da mãe ao nascimento e sua taxa de gestação gemelar, foi realizada uma comparação entre mães que nasceram com peso entre 3001 – 4000g com mães que nasceram com peso superior a 4500g, e aponta que as mães que tiveram maior peso ao nascimento apresentaram maior chance de terem gestações gemelares, e que mulheres com baixo peso ao nascimento poderiam implicar em uma gravidez complicada, com alto risco de diabetes gestacional.

d) Índice de Massa Corporal (IMC)

O índice de massa corporal é uma medida internacional usada para calcular se o indivíduo está em seu peso ideal, sendo calculada de acordo com altura e peso do indivíduo. Basso *et al.* em 2004 realizaram um estudo chegando a conclusões de que mulheres com IMC inferior a 20 possuem uma menor chance de terem filhos gêmeos, e que mulheres com IMC superior a 30 possuem maior chance de terem filhos gêmeos.

e) Tratamento para Infertilidade

Mulheres que realizam tratamento para infertilidade apresentam uma chance em torno de 15% maior do que mulheres que não realizam este tipo de tratamento de terem gestações gemelares (Vela *et al.*, 2011; Ismail *et al.* 2012).

Diferentemente da gemelaridade DZ, a MZ não apresenta fatores ambientais associados, se mantendo sempre estável e parecendo ser um processo aleatório que pode acontecer a qualquer mulher que tenha filhos (Obi-Osius *et al.*, 2004).

1.3.2 Fatores Genéticos

Atualmente há um consenso de que a gemelaridade dizigótica é um traço expresso na linhagem materna, mas que pode ser herdado tanto pelo lado materno como paterno (Nylander, 1981; MacGillivray *et al.*, 1988; Fellman & Eriksson, 1999; Martin *et al.*, 2005; Fauser *et al.*, 2005). Apesar das características genéticas da gemelaridade dizigótica não estarem totalmente elucidadas, estudos apostam na influência de vários genes, não sendo, portanto, o fenótipo “ter gêmeos DZ” um traço simplesmente dominante ou recessivo (Hoekstra *et al.*, 2008). Do contrário, ainda não existem claras associações de gestações de gêmeos monozigóticos com fatores genéticos, mesmo havendo na literatura alguns registros de famílias com histórico de gemelaridade monozigótica (Hamamy *et al.*, 2004; Machin, 2009).

Alguns genes já foram apontados como possíveis candidatos a influenciar a gemelaridade, o gene *GDF9* (*growth differentiation factor-9* - fator de diferenciação 9) é um deles, este apresenta variações mais comuns em mães de gêmeos DZ do que em mães controles (Palmer *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2004). Outro gene é o *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15* - proteína morfogênica óssea 15), este apresenta mutações que provocam um aumento na taxa de ovulação (Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004), mas que não apresentaram relação com a gemelaridade dizigótica segundo Zhao *et al.* (2008), estes autores analisaram 14 variantes no gene *BMP15* em 279 mães de gêmeos concluíram que o gene não possui variantes que desempenham papel significativo na gemelaridade dizigótica humana.

Outra demonstração da participação de fatores genéticos no nascimento de gêmeos DZ foi dada por Hasbargen *et al.* (2000), os quais demonstraram que as mulheres que

possuem o alelo determinador da deficiência de redutase de metilenotetra-hidrofolato (MTHFR) têm menor probabilidade de gerar gêmeos DZ. Nas gestações gemelares a demanda de ácido fólico é muito maior. Por ser a deficiência de MTHFR responsável pela pouca produção de 5-metiltetra-hidrofolato e elevação da concentração plasmática de homocisteína, o alelo que causa essa deficiência diminui a probabilidade de gestação gemelar. Além disso, os autores apresentaram em seus dados também que a frequência desse alelo em parturientes de recém-nascidos únicos foi 30%, enquanto que em mães de gêmeos, essa frequência foi praticamente, a metade, 16%.

Em 2006, Derom *et al.* realizou um estudo de *genome wide scan* em 57 mães de gêmeos DZ de 14 famílias e encontrou nos cromossomos 2, 7 e 18 uma possível correlação com o fenótipo ter filhos gêmeos. Em 2010, Painter *et al.*, ao também realizar um estudo de *genome wide scan*, encontrou em 525 famílias com mães de gêmeos, alguns cromossomos possivelmente relacionados à gemelaridade, um desses é o cromossomo 12, onde o gene *IGF-I* está situado.

A incidência natural de gêmeos dizigóticos tem sido proposta como um marcador potencial de fecundidade em mulheres (Tong *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 2007) e em homens, por apresentarem melhor qualidade de sêmen (Asklund *et al.*, 2007).

Até o momento existem diversos estudos relacionando genes a gemelaridade dizigótica, mas sobre a gemelaridade monozigótica? Cyranoski (2009) refere um estudo realizado na Jordânia, onde existem diversos pequenos vilarejos com alta incidência de nascimentos gemelares, onde foi encontrada uma região no cromossomo 4 que pode estar associada com a gemelaridade MZ. Esta região cromossômica é conservada através da evolução nos vertebrados, e codifica uma proteína que é expressa no blastocisto de camundongos em estágio embrionário. Sua atividade diminui à medida que as células se diferenciam, fazendo-se supor que sua atividade tenha um papel importante no início do desenvolvimento, como a divisão do embrião em dois. Não foi identificado um gene específico, mas os autores acreditam que os nascimentos múltiplos podem ter uma base genética nos mamíferos.

1.4 O FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-I): SUA IMPORTÂNCIA NA REPRODUÇÃO E POSSÍVEL ATUAÇÃO NA GEMELARIDADE

O IGF-I é um polipeptídeo importante para crescimento e diferenciação celular, sua função é similar à da insulina, sendo membro da família das proteínas envolvidas com a mediação do crescimento e desenvolvimento (Rietveld, 2009).

Os IGFs são produzidos pela maioria dos tecidos e têm capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos parácrinos e/ou autócrinos (Hafez & Hafez, 2004). Suas ações também podem prevenir ou retardar o processo de atresia folicular (Mondschein *et al.*, 1989), que é um fenômeno normal representado pela morte do folículo ovariano, seguido da não fertilização do óvulo.

A concentração de IGF-I circulante no plasma sanguíneo durante o crescimento do indivíduo está inteiramente relacionada com a liberação do hormônio GH (*growth hormone* - hormônio do crescimento), este estimula o crescimento e a reprodução celular em diversos organismos (Rosen *et al.*, 1998).

Echternkamp *et al.* (1990) realizaram o primeiro estudo correlacionando o gene *IGF-I* e a gemelaridade. Ao comparar vacas com múltiplas gestações e vacas com gestações únicas, observaram uma concentração maior de IGF-I tanto fluídica como no folículo ovariano das vacas que tiveram gestações múltiplas. O mesmo autor, em estudo posterior (Echternkamp, 1999), encontrou também uma maior concentração de IGF-I em folículos ovarianos maiores e em 2004 (Echternkamp *et al.*, 2004) apontou o IGF-I como responsável por um maior recrutamento e crescimento de mais de um folículo ovariano em vacas que tiveram gestações gêmeas.

Portela *et al.* (2009), também encontraram maiores concentrações de IGF-I no sangue e no fluido folicular de vacas fêmeas gêmeas e, no mesmo ano, Kim *et al.* (2009) relacionou o gene *IGF-I* à gemelaridade em bovinos.

Vários estudos, em diferentes espécies de mamíferos (incluindo bovinos e suínos), demonstraram que a insulina, o IGF-I e o IGF-2 estimulam a produção de progesterona pela célula da granulosa, na seguinte ordem, em relação à potência: IGF-I > IGF-2 > insulina. A progesterona é responsável por terminar o preparo do endométrio para a implantação do embrião, entre o sexto e o oitavo dia após a ovulação, o nível de

progesterona no sangue atinge o máximo. Se a medida no sangue deste hormônio for baixa, pode causar infertilidade (Spicer *et al.*, 1993).

O fator de crescimento semelhante à insulina I (*IGF-I*) é um regulador pituitário de crescimento folicular potencializando também a ação das gonadotrofinas no ovário, estas por sua vez agem estimulando a produção de estrógeno, progesterona e testosterona. As duas principais gonadotrofinas são o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). O *IGF-I* também atua nas células da granulosa promovendo o aumento no número de receptores de FSH e LH, retardando o processo de atresia folicular, estimulando a sua multiplicação, promovendo a esteroidogênese e foliculogênese, ovulação, fertilização, implantação e subsequente desenvolvimento do embrião (Lackey *et al.*, 2000; Silva *et al.* 2009; Steinman 2009; Portela *et al.*, 2009).

Metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas-chave envolvidas na remodelação tecidual. Dentro do ovário, acredita-se que exerçam um papel importante na ovulação e estão sendo associadas à atresia folicular. Essas MMP são reguladas, por sua vez, pela FSH e IGF-I em células da granulosa bovina *in vitro* (Portela *et al.*, 2009), mostrando mais uma relação entre o gene *IGF-I* e a ovulação.

1.4.1 O gene *IGF-I*

O gene do fator de crescimento semelhante à insulina *IGF-I* está presente nos seguintes grupos: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100860838> acesso: 03/04/2012). Está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q22 – 24.1), e é constituído de 6 éxons, medindo 85 Kb (Figura 2) (Bonapace *et al.*, 2003; Rietveld, 2009).

O gene *IGF-I* pode ser usado como biomarcador para as seguintes doenças, em ordem de “eficiência”: acromegalia, deficiência de IGF-I, neoplasmas mamários, neoplasmas da bexiga urinária, neoplasmas de próstata, doenças do trato urogenital feminino e desordens do espectro autista (Rietveld, 2009).

Figura 2. Apresentação esquemática do gene *IGF-I*, o gene contém seis éxons e cinco íntrons, apresentando duas regiões promotoras, sendo que o polimorfismo (CA)_n está localizado na primeira região promotora (Rietveld, 2009).



1.4.2 O Polimorfismo (CA)_n

Existe uma variabilidade individual considerável nos níveis de IGF-I e da proteína responsável pelo seu transporte, a IGFB-3 (*Insulin-like growth factor-binding protein 3*-proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina), presentes na circulação (Morimoto *et al.*, 2005). Estes níveis podem ser influenciados por fatores ambientais, tais como origem étnica (indivíduos afro descendentes possuem maiores níveis séricos de IGF-I), idade (níveis caem com avanço da idade em ambos os sexos), sexo (homens possuem níveis maiores), fumo, álcool (uso aumenta níveis de IGFI em ambos os sexos), massa corporal, uso ou não de contraceptivos orais (mulheres que fizeram uso destes tiveram redução dos níveis de IGF-I) (Morimoto *et al.*, 2005; Kaklamani *et al.*, 1999; DeLellis *et al.*, 2004; Goodman-Gruen & Barret-Connor, 1997; Jernstrom *et al.*, 2001).

Jernstrom *et al.* em 2001 fizeram uma relação entre alguns fatores ambientais e os níveis de IGF-I, demonstrando que 18% da variação nos níveis é dada pela idade, 4% pelo uso de anticoncepcionais e 2% pelo consumo de álcool.

Além de fatores externos, fatores genéticos também podem influenciar nos níveis de IGF-I circulantes. Estudos com gêmeos revelam que cerca de 50% da variabilidade individual é de fundo genético (Rosen *et al.*, 1998).

O polimorfismo (CA)_n é uma repetição dos nucleotídeos citosina (C) e adenina (A), esta repetição é variável entre as diversas etnias, apresentando 14 diferentes alelos (178 a 204 pares de bases), sendo o mais comum o alelo 192, que corresponde a um número de 19 repetições de CA (Rietveld, 2009), o número de 20 repetições corresponde ao alelo 194, o de 21 repetições ao alelo 196 e assim sucessivamente.

Javadi *et al.*, em 2011, ao estudar o câncer de mama e sua associação com polimorfismo (CA)_n em mulheres iranianas, observou maior frequência de pacientes e controles com o alelo 192. Este alelo também foi observado em maior frequência em populações Européias e de Americanos europeu-descendentes (Missmer *et al.*, 2002, Bageman *et al.*, 2007). Por outro lado, em populações asiáticas e africanas este alelo é menos frequente (DeLellis *et al.*, 2003). Em 2007, Uthra *et al.* ao estudar uma população

de indivíduos sul indianos, obteve como mais frequente as repetições (CA)₁₇ e (CA)₁₈.

O genótipo 192/192 está associado com menores níveis séricos de IGF-I (Frayling *et al.*, 2002; Rosen *et al.*, 1998; Fehringner *et al.*, 2009a; Fehringner *et al.*, 2009b), tanto em homens como em mulheres, já o genótipo 194/ - mostrou um aumento de até 25% nos níveis de IGF-I se comparado com o genótipo 192/192, havendo também níveis mais elevados FSH Rosen *et al.* (1998). A ação de FSH no folículo ovariano regula a diferenciação de células da granulosa e o desenvolvimento do folículo, podendo influenciar na taxa de gemelaridade (Erickson & Shimasaki, 2001).

Kim *et al.*, em 2002, também associou o genótipo 194/194 a maiores níveis de IGF-I, sendo que o genótipo 194/ - seria responsável por uma diminuição nos níveis de IGF-I e que sem a presença do alelo 194 os níveis de IGF-I são ainda menores.

Níveis mais elevados de IGF-I também são encontrados em homens com sêmen de alta qualidade e em homens com histórico gemelar na família (Yilmaz *et al.*, 2004). Em particular, IGF-I promove a maturação de espermatozóides e uma esteroidogênese normal (Vickers *et al.*, 1999). No testículo, o IGF-I modula o efeito do hormônio folículo estimulante, bem como nas mulheres (Steinman, 2008).

Maiores níveis de IGF-I também estão associados à maior risco de câncer de mama (Cleveland *et al.*, 2006; Figer *et al.*, 2002; Javadi *et al.*, 2011), diabetes tipo 2 (Vaessen *et al.*, 2001), acromegalia (Akin *et al.*, 2010), baixo peso ao nascimento (Arends *et al.*, 2002), entre outras doenças crônicas.

No Brasil este polimorfismo foi analisado por Della Coletta *et al.* (2008) em crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG), porém não encontraram relação entre a presença em homozigose do alelo 192 e baixo peso ao nascimento como sugeriram Vaessen *et al.* (2001) em Roterdã (Europa).

1.5 O GENE *IGFBP-3*

A proteína codificada pelo gene *IGF-I* forma um complexo com a proteína codificado pelo gene *IGFBP-3* (*Insulin-like growth factor-binding protein 3* - proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina), sendo responsável por carregar 90% do IGF-I circulante e capaz de regular os níveis de IGF-I presentes no plasma (Jernstrom *et al.*, 2001). O gene está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p14-

p12) (Ehrenborg *et al.* 1992).

Morimoto *et al.* em 2005 relacionaram o número de repetições 19/19 do polimorfismo (CA)_n do gene *IGF-I* a menores níveis de IGFBP-3 e outros genótipos a maiores níveis de IGFBP-3. Apontou também os genótipos 19/20 e 19/21 como responsáveis por maiores níveis de IGFBP-3.

1.5.1 Polimorfismo no gene *IGFBP-3* (rs2854744)

O gene *IGFBP-3* possui um SNP na posição – 202 em sua região promotora, no qual pode ocorrer troca de adenina para citosina (A/C). Há evidências de que este *locus* é significativamente um fator genético de influência nos níveis de IGFBP-3 e IGF-I em mulheres jovens (Jernstrom *et al.*, 2001).

Mulheres com genótipo AA possuem maiores níveis de IGFBP-3 circulantes, as que apresentam genótipo AC possuem níveis intermediários de IGFBP-3 e as que possuem genótipo CC apresentam níveis menores de IGFBP-3 (Jernstrom *et al.*, 2001).

Na população Norte Americana o alelo C é mais comum (53,5%) que o alelo A (46,5%) (Deal *et al.* 2001, Schernhammer *et al.* 2003). Em Asiáticos a incidência do alelo A é mais comum (75,2%) em relação ao alelo C (24,8%) (Wang *et al.* 2003).

Os níveis de IGFBP-3 são também influenciados por idade (8%), consumo de álcool (3%) e uso de anovulatórios orais (2%).

1.6 CÂNDIDO GODÓI E A GEMELARIDADE

A cidade de Cândido Godói (lat 27°57'07"S long 54°45'07"W), 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 (Figura 3). Em um levantamento a partir do DATASUS do Ministério da Saúde do Brasil (www.datasus.gov.br) entre os anos de 1994 a 2006, foi observado que Cândido Godói apresenta prevalência média acima de 2% de nascimentos gemelares maior que a média nacional, que é de 1,63%. Particularmente um distrito de Cândido Godói conhecido como Linha São Pedro, povoado basicamente por descendentes de alemães que ali se estabeleceram no início do século XX, apresenta

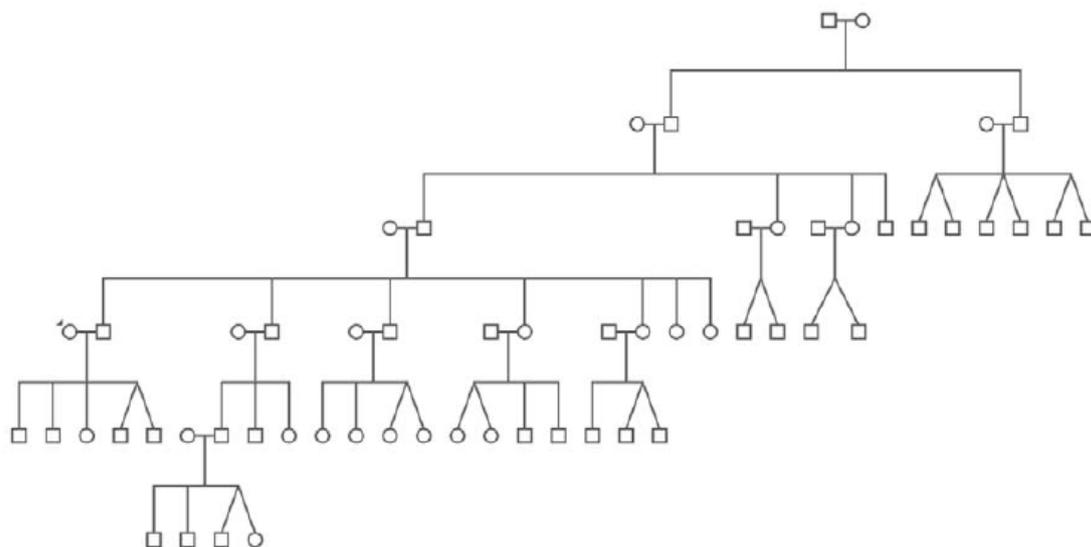
prevalências entre 7 e 10% de gemelaridade (Matte *et al.*, 1996; Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2011). Nos últimos anos muitas hipóteses a cerca da gemelaridade em Cândido Godói foram levantadas: a mais controversa liga o fenômeno da gemelaridade a supostos experimentos do médico nazista Joseph Mengele realizados na década de 60, há ainda a hipótese de que a água do poço artesiano localizado na Linha São Pedro contenha substâncias que fazem com que as mulheres que bebem a água tenham filhos gêmeos.

Estudo realizado por nosso grupo demonstrou que não há suporte científico para a “teoria do médico nazista”. Foram levantados os registros de 127 gestações múltiplas ocorridas em um período de 1927 a 2008 (125 duplas e 2 triplas) no município. Foi confirmado que Linha São Pedro concentra a maioria dos nascimentos de gêmeos (35,9%), como afirmavam os moradores da região. A comparação dos nascimentos de gêmeos durante a década de 60 e os outros anos mostra que não há diferença significativa na taxa de nascimentos gemelares, indicando não haver uma “explosão” de gestações duplas após a suposta visita de Joseph Mengele (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2011).

Outro estudo prévio realizado por nosso grupo na população mostrou uma associação entre variantes no gene *TP53* e predisposição a gemelaridade (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012), sugerindo que o alelo P72 do polimorfismo P72R, envolvido com a implantação do zigoto, é um forte fator de risco para gemelaridade em Cândido Godói.

Esta população tem se mantido em tamanho estável, baseada em propriedades rurais de agricultura e pecuária de pequeno porte, com pouca entrada de outras famílias posteriormente à sua colonização inicial. Baseados na história de colonização da cidade no início do século XX, por aproximadamente oito famílias de descendência alemã provindas de cidades da região do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, a ação de fatores genéticos potencializados por um efeito fundador é a explicação mais provável para a alta frequência de nascimentos gemelares.

Figura 3. Heredograma ilustrativo de uma família residente em Linha São Pedro, no município de Cândido Godói (Tagliani-Ribeiro *et al.* 2011).



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Analisar a influência de polimorfismos nos genes *IGF-I* e *IGFBP3* na gemelaridade em humanos.

Objetivos específicos:

- Analisar a frequência do polimorfismo $(CA)_n$ do gene *IGF-I* em mulheres mães de gêmeos residentes em Cândia Godói e de mães de não gêmeos tanto do município de Cândia Godói, como da região metropolitana do Rio Grande do Sul.
- Analisar a frequência do polimorfismo localizado na posição -202 do gene *IGFBP-3* nestes mesmos grupos de mulheres.

CAPÍTULO 3

ARTIGO

POSSIBLE ROLE OF IGF (CA) 22 GENE POLYMORPHISM IN HUMAN TWINNING

M.Oliveira^{a,b}, A. Tagliani-Ribeiro^{a,b}, U. Matte^{b,c}, L.R..Fraga^{a,b}, N.J.R Fagundes^{a,b}, G. Steinman^d, Schuler-Faccini^{a,b,*}, L

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional

^c Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Autor correspondente: Tel: +55 51 33089318. Email:lavinia.faccini@ufrgs.br (L. Schuler-Faccini)

^d Department of Obstetrics & Gynecology, Long Island Jewish Medical Center, New Hyde Park, New York 11040

Keywords:

Twinning

IGF-1 gene polymorphism

IGFBP-3 gene polymorphism

ABSTRACT

Objetivo: Investigar se há relação do polimorfismo *IGF-1* (CA_n) e do polimorfismo *IGFBP-3-202 A/C* com a gemelaridade em uma população localizada ao sul do Brasil, Cândido Godói (CG), com altas taxas de nascimentos gemelares.

Material e Métodos: Foi desenvolvido estudo do tipo caso – controle. Foram estudadas um total de 39 casos (mães de gêmeos naturais de CG) e 217 controles, sendo destes 97 mulheres residentes em CG (controles CG) e 117 em Porto Alegre, que tiveram apenas gestações únicas (controles PA). Foi realizada extração de DNA a partir de sangue e genotipagem através da metodologia *TaqMan SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems, USA*).

Resultados: As análises indicaram que o alelo 198 (CA_{22}) do gene *IGF-1* está em maior frequência no grupo de mães de gêmeos, tanto quando comparado com controles de CG ($p=0,01$), quando com controles de PA ($p=0,001$). Os três grupos estudados não possuem diferenças significativas nas frequências dos alelos do polimorfismo do gene *IGFBP-3-202-A/C*.

Conclusão: Este estudo aponta o polimorfismo 198 do gene *IGF-1* como um fator envolvido na gemelaridade. Isto está de acordo com observações anteriores, que quanto maior o número de repetições e CA, maior os níveis de IGF-I circulantes. Estes estão diretamente envolvidos com o maior número de receptores FSH e LH, promovendo a foliculogênese, ovulação, fertilização e também desenvolvimento do embrião.

1. Introdução

Ainda que os fatores genéticos relacionados à gemelaridade na espécie humana tenham sido bastante investigados, há um grande desconhecimento sobre genes específicos influenciando este processo.

A frequência de nascimentos gemelares varia consideravelmente em diferentes populações, com valores de 9 nascimentos para cada 1000 (Ásia e Oceania) a 18/1000 (África) ^[1], sendo a Nigéria o país que apresenta as maiores taxas de nascimentos gemelares em todo mundo, com relatos de até 53,8/1000 ^[2]. No Brasil a frequência média de nascimentos gemelares está em torno de 18/1000. Entretanto uma pequena localidade no sul do Brasil, Cândido Godói (CG), RS (lat 27°45'07" long 54°45'07"), chama a

atenção de pesquisadores e curiosos por apresentar altas taxas de nascimentos gemelares, entre 20/1000 e 70/1000 ^[3] ^[4]. Um trabalho prévio nesta população mostrou uma associação entre variantes no gene p53 e predisposição a gemelaridade ^[5].

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I) é um polipeptídeo importante para crescimento e diferenciação celular, estimulando também o crescimento linear em todos os mamíferos. Além disso, possui um importante papel na reprodução humana, pois age como regulador pituitário de crescimento folicular e potencializa a ação das gonadotrofinas hormônio luteinizante (LH) e o hormônio estimulador do folículo (FSH) no ovário, este por sua vez regula a diferenciação de células da granulosa e o desenvolvimento do folículo, podendo influenciar na taxa de gemelaridade ^[7]^[15].

Em 1990, Echterkamp *et al.* ^[9] fizeram o primeiro estudo correlacionando IGF-I com gemelaridade. Ao comparar vacas com múltiplas gestações e vacas com gestações únicas, observaram uma concentração maior de IGF-I tanto no fluido sanguíneo como no folículo ovariano das vacas que tiveram gestações múltiplas. Portela *et al.* ^[8], em 2009, também encontraram maiores concentrações de IGF-I no sangue e no fluido folicular de vacas fêmeas gêmeas. Porém até o momento não localizamos estudos correlacionando polimorfismos do gene *IGF-I* com a gemelaridade em humanos.

O gene *IGF-1*, responsável pela síntese do hormônio IGF-I, apresenta um polimorfismo de repetição dos nucleotídeos citosina e adenina (CA)_n, que possui 16 diferentes alelos (174 a 204 pares de bases), sendo mais comum o alelo 192, que corresponde a um número de 19 repetições de CA^[9]. O genótipo 192/192 está associado com menores níveis séricos de IGF-I ^[11] ^[12] ^[13] ^[14] tanto em homens como em mulheres, já o genótipo 194/- mostrou um aumento de até 25% nos níveis de IGF-I se comparado com o genótipo 192/192, havendo também níveis mais elevados de hormônio folículo estimulante (FSH) ^[12].

O outro gene alvo de nosso estudo, o *IGFBP-3* sintetiza a proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina, responsável por carregar 90% do IGF-I circulante e capaz de regular os níveis de IGF-I presentes no plasma ^[6]. Há evidências de que um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) envolvendo a troca de A/C na posição – 202 em sua região promotora, seja um fator genético de influência nos níveis de IGFBP-3 e IGF-I em mulheres jovens ^[6]. Mulheres homozigotas para o alelo A possuem

maiores níveis de IGF-BP-3 circulantes, e conseqüentemente níveis maiores de IGF-I circulante.

2. Material e Métodos

Delineamento: estudo de caso-controle.

Amostra: Grupo caso: 39 mulheres mães de gêmeos residentes no município de CG, este fundado por famílias de origem alemã que migraram para o Brasil durante o século XIX, os casos representam 40% das mães de gêmeos que nasceram em CG após 1955. Grupos controle: 97 mulheres mães de filhos não gêmeos residentes no município de CG e outro grupo controle constituído por 117 mulheres mães de filhos não gêmeos da população de PA (Table 1).

Análise Molecular: O DNA das amostras de sangue foi extraído conforme descrito em Lahiri & Nurnberger, Jr (1991) ^[16]. O DNA das amostras de saliva foi extraído utilizando *Invisorb Spin Swab Kit* conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), sendo posteriormente diluídas na concentração de 20ng/μL.

a) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o polimorfismo *IGF-1* (CA) foi realizado um PCR convencional utilizando 2 μL (25ng) de DNA correspondente a cada amostra; 2,5 μL de solução tampão (10 X); 3 μL de dNTP (2μM); 1,5 μL de MgCl₂ (50μM); 1 μL de *primer sense* (20ng); 1 μL de *primer anti-sense* (20ng); 0,2 μL de Taq polimerase (5 u/μL) e 13,8 μL de H₂O para um total de 25 μL. As condições da reação foram as seguintes: 94° por 5 minutos; 35 ciclos constituídos de 94° por 30 segundos; 54° por 30 segundos; 72° por 30 segundos com extensão final de 10 minutos a 72°. Em seguida foi realizada a análise de fragmentos por eletroforese capilar no sequenciador *Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzers*, com uso dos seguintes *primers*:

IGF-I *sense*: 5` ACCACTCTGGGAGAAGGGTA 3`

IGF-I *anti-sense*: 5`GCTAGCCAGCTGGTGTATT 3`, este último marcado com o fluorocromo FAM (Della Coletta, 2008). Para testar a veracidade dos resultados, uma amostra de cada par homocigoto para os alelos CA₁₉, CA₂₀, CA₂₁ e CA₂₂ foram sequenciadas. Para tal foi PCR com as seguintes concentrações: 4 μL de DNA (25ng); 2,5 μL de solução tampão (10X); 1 μL de dNTP (2μM); 1,5 μL de MgCl₂ (50μM); 1 μL de

primer sense (20ng); 1 µL de *primer anti-sense* (20ng); 0,2 µL de Taq polimerase (5 u/µL) e 13,8 µL de H₂O para um total de 25 µL. As amostras foram purificadas com as enzimas EXO I e SAP para então serem sequenciadas.

b) Genotipagem

A genotipagem do polimorfismo -202 A/C do gene IGFBP-3 (rs2854744) foi determinada por discriminação alélica utilizando o ensaio C___1842665_10 da tecnologia *TaqMan SNP Genotyping Assay*.

c) Análise Estatística

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado pelo programa Arlequin versão 3.11^[28]. Foram realizadas comparações simples entre frequências alélicas do IGF-I entre casos e controles através do Teste G (*Likelihood ratio-ch-sq*), com intervalo de confiança de 95%, pelo programa WinPEPI versão 11.15^[29]. Para análise do gene *IGFBP-3* foi calculado o qui-quadrado através do programa WinPEPI versão 11.15^[29].

3. Resultados

As amostras, tanto de caso quanto de controles, estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para ambos os polimorfismos testados.

As análises do polimorfismo *IGF-I* (CA_n) estão sumarizadas na Tabela 2. Conforme o esperado, o alelo mais frequente nos três grupos em estudo foi o 192 (CA_{19}). Foi observada uma maior frequência do alelo 198 (CA_{22}) no grupo de mães de gêmeos quando comparado com os grupos controles (casos: 7.7%; controles CG: 1.5%; controles PA: 0.8%; $p < 0.001$), frequência esta correspondente a apenas alelos em heterozigose.

Quanto ao polimorfismo *IGFBP-3-202 A/C*, não houve diferença significativa entre casos e controles (Tabela 3).

4. Discussão

Nosso estudo é o primeiro a investigar o polimorfismo *IGF-I* (CA_n) e o polimorfismo *IGFBP-3-202 A/C* em mulheres mães de gêmeos, observando-se aumento significativo na frequência do alelo 198 (CA_{22}), comparativamente aos controles de CG, e de PA. Ao analisar os resultados obtidos por estudos em diversos continentes (Tabela 4), nota-se que a frequência da presença do alelo 198 é pequena, não passando de 3.36% em

estudo realizado na China ^[18] e de 1.63% na América do Norte ^[19]. Na amostra de mulheres que tiveram gestações gemelares em CG, este alelo tem uma frequência de 7.7%. Nos controles, tanto de Cândido Godói, quanto de Porto Alegre, estas frequências são similares às observadas em estudos na Europa e América.

Quanto ao polimorfismo *IGFBP-3-202 A/C*, este se mantém de acordo com o que consta a literatura ^{[22][23]}.

Com relação a fatores ambientais o que hoje está mais atrelado à gemelaridade, que é o tratamento para infertilidade ^{[24][25]}, não foi registrado em CG. O gene *IGF-I*, por sua vez, também sofre com fatores ambientais influenciando em seus níveis, como idade, uso de contraceptivos orais, consumo de álcool, massa corporal. Porém 50% dos seus níveis circulantes são de base genética ^[12], onde o polimorfismo de $(CA)_n$ é o principal responsável por estas alterações. Quanto maior o número de repetições de CA, maior os níveis de IGF-I circulantes ^[12] e estes, por sua vez, estão diretamente envolvidos com o número de receptores FSH e LH. Autores já associaram o genótipo 192/192 com menores níveis séricos de IGF-I ^{[11] [12] [13] [14]}, tanto em homens como em mulheres, já o genótipo 194/ - já foi apontado por elevar em até 25% os níveis de IGF-I se comparado com o genótipo 192/192, havendo também níveis mais elevados FSH ^[12].

O aumento de receptores de FSH e LH, retarda a atresia folicular, estimulando a sua multiplicação, ovulação, fertilização e também desenvolvimento do embrião. Desta forma podemos apontar o polimorfismo 198 do gene *IGF-I* como um fator relacionado à gemelaridade em humano.

Encontramos no efeito fundador, forma de deriva genética ^[26], a explicação para este aumento na frequência do alelo 198, onde um dos fundadores originais da população de Cândido Godói carregou este alelo. Se levarmos em conta a história de colonização da cidade no início do século XX, por aproximadamente oito famílias de descendência alemã provindas de cidades da região do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul ^[4], a explicação do efeito fundador se torna ainda mais evidente.

Table 1. Characteristics of the study population

Characteristic	Cases (n: 39)	Controls CG (n: 97)	Controls PA (n: 117)
Number of pregnancies, mean	3.1	2.1	2.5
Age at first pregnancy, mean	24.5	24.2	22.6
Mean age at twin pregnancy	28.5	-	-

Table 2. Frequency of *IGFI* (CA)_n polymorphism in cases and controls.

	Cases (n:39)		Controls CG (n: 97)			Controls PA (n: 117)		
	N	%	N	%	valor p	N	%	Valor p
176	-	-	1	0.5	0.55	1	0.4	0.55
186	-	-	2	1.0	0.40	2	0.9	0.40
188	1	1.3	3	1.5	0.66	3	1.3	0.97
190	4	5.1	15	7.8	0.37	21	9.0	0.25
192	50	64.1	112	57.8	0.31	148	63.2	0.75
194	13	16.7	47	24.2	0.13	29	12.4	0.38
196	4	5.1	11	5.7	0.86	26	11.1	0.10
198	6	7.7	3	1.5	0.01	2	0.9	0.001
200	-	-	-	-	-	1	0.4	0.55
202	-	-	-	-	-	1	0.4	0.55

Test G

Table 3. Frequency of *IGFBP-3-202A/C* gene polymorphism in cases and controls.

Allele	Cases (n= 39)		Controls PA (n= 117)		Controls CG (n= 97)	
	N	%	N	%	N	%
C	44	56	113	48	104	54
A	34	44	123	52	90	46
Genotype	N	%	N	%	N	%
CC	14	36	32	27	32	33
AA	9	23	37	31	25	26
CA	16	41	49	42	40	41

Chi-squared test

Table 4. Percentage of *IGF-1* CA_n gene polymorphism in various regions of the world.

Allele	NORTH AMERICA		SOUTH AMERICA	EUROPE		CHINA		
	Cleveland <i>et al.</i> (2006) N= 736	Kato <i>et al.</i> (2003) White N= 112	Kato <i>et al.</i> (2003) Black N= 114	Della Coletta (2008) N= 297	Rietvel <i>et al.</i> (2004) N= 5386	Vaessen <i>et al.</i> (2001) N= 1080	Wen <i>et al.</i> (2005) N= 2172	Xie <i>et al.</i> (2010) N= 446
174		0.9						
176	0.14						0.05	
180		0.9	0.9					
184		0.9	9.7			0.2	0.18	
186	0.27	2.7	3.5			0.3	0.14	0.22
188	1.36	7.1	18.4		1.9	1.9	10.54	7.62
190	5.98	36.6	25.4	10	4.6	4.1	16.67	15.92
192	64.27	30.4	18.4	55	65.3	65.9	35.13	38.79
194	18.75	16.1	14.9	16	19.4	18.7	7.73	6.28
196	7.47	4.5	6.1	11	6.9	7.4	26.29	27.13
198	1.63		1.8	*others= 8	1.5	1.5	3.13	3.36
200	0.14		0.9		*others= 0.4		0.14	0.45
202								0.22

References

- [1] J. Smits, C. Monden, Twinning across the Developing World, PLoS ONE 6(9):e25239 (2011).
- [2] E.I. Nwobodo, D.N. Bobzom, J. Obed, Twin births at University of Maiduguri Teaching Hospital: incidence, pregnancy complications and outcome, Niger J Med. 11(2) (2002) 67-9.
- [3] U. Matte, M.G. Le Roux, B. Bénichou, J.P. Moisan, R. Giugliani, Study on possible increase in twinning rate at a small village in south Brazil, Acta Genet. Med Gemellol 45 (1996) 431-437.
- [4] A. Tagliani-Ribeiro, M. Oliveira, A.K. Sassi, M.R. Rodrigues, M. Zagonel-Oliveira *et AL*, Twin Town in South Brazil: A Nazi's Experiment or a Genetic Founder Effect?, PLoS ONE 6(6): e20328 (2011).
- [5] Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJR, Schuler-Faccini L, Matte U. High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility. Hum. Reprod. 27(9): (2012) 2866-71
- [6] H. Jernstrom, C. Deal, F. Wilkin, W. Chu, Y. Tao, N. Majeed, T. Hudson, S.A. Narod, M. Pollak, Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in healthy premenopausal women, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 10 (2001) 377–384.
- [7] B.R. Lackey, S.L.L Gray, D.M. Henricks, Physiological basis for use of insulin like growth factors in reproductive applications: a review, Theriogenology 53 (2000) 1147-1156.
- [8] V.M. Portela, A. Veiga, C.A. Price, Regulation of MMP2 and MMP9 metalloproteinases by FSH and growth factors in bovine granulosa cells, Genetics and Molecular Biology, 32 (2009) 516-520.
- [9] S.E. Echtenkamp, L.J. Spicer, K.E. Gregory, S.F. Canning, M. Hammond, Concentrations of Insulin-Like Growth Factor-I in Blood and Ovarian Follicular Fluid of Cattle Selected for Twins. Biology of Reproduction 43 (1990) 8-14.
- [10] I.Rietveld, The Role of a CA Repeat Polymorphism in the Promoter Region of the Insulin like Growth Factor-I gene in Physiology and the Pathophysiology of Diabetes Mellitus, Erasmus Universite Rotterdam (2009)
- [11] T.M. Frayling, A.T. Hattersley, A. McCarthy, J. Holly, S.M. Mitchell, A.L. Gloyn, K. Owen, D. Davies, G.D. Smith, Y. Ben-Shlomo, A putative functional polymorphism in the IGF-I gene—association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in UK populations, Diabetes 51 (2002) 2313–2316.

- [12] C.J. Rosen, E.S. Kurland, D. Vereault, R.A. Adler, P.J. Rackoff, W.Y. Craig, S. Witte, J. Rogers, J.P. Bilezikian, Repeat in IGF-I Gene: Implications for Genetic Studies of Bone Mineral Density Association Between Serum Insulin Growth Factor-I (IGF-I) and a Simple Sequence, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 2286-2290.
- [13] G. Fehringer, N.F. Boyd, J.A. Knight, A.D. Paterson, G.S. Dite, G.G. Giles, M.C. Southey, I.L. Andrulis, J.L. Hopper, H. Ozcelik, Family-based genetic association study of insulin-like growth factor I microsatellite markers and premenopausal breast cancer risk, *Breast Cancer Res Treat* 118 (2009) 415–424.
- [14] G. Fehringer, H. Ozcelik, J.A. Knight, A.D. Paterson, N.F. Boyd, Association between IGF1 CA microsatellites and mammographic density, anthropometric measures, and circulating IGF-I levels in premenopausal Caucasian women, *Breast Cancer Res Treat* 116 (2009) 413–423.
- [15] G.F. Erickson, S. Shimasaki, The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors, *Fertility and Sterility*, 76 (2001) 943–949.
- [16] D.K. Lahiri, J I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Research*, 19 (1991).
- [17] W. Wen, Y.T. Gao, X. Shu, H. Yu, Q. Cai, W. Smith, W. Zheng, Insulin-Like Growth Factor-I Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk in Chinese Women, *Int. J. Cancer* 113 (2005) 307–311.
- [18] L. Xie, Y. Gong, S. Lian, J. Yang, S. Gao, L. Xu, Y. Zhang, A microsatellite polymorphism in IGF1 gene promoter and longevity in a Han Chinese population, *BMC Research Notes* 3 (2010) 55.
- [19] R.J. Cleveland, M.D. Gammon, S.N. Edmiston, S.L. Teitelbaum, J.A. Britton, M.B. Terry, S.E. Eng, A.I. Neugut, R.M. Santella, K. Conway, IGF1 CA repeat polymorphisms, lifestyle factors and breast cancer risk in the Long Island Breast Cancer Study Project, *Carcinogenesis* 27 (2006) 758–765.
- [20] N. Vaessen, P. Heutink, J.A. Janssen, J.C. Witteman, L. Testers, A. Hofman, S.W. Lamberts, B.A. Oostra, H.A. Pols, C.M. van Duijn, A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction, *Diabetes* 50 (2001) 637–642.
- [21] R.R. Della Coletta, Análise das repetições CA do gene IGF1, VNTR do gene da insulina e região promotora P4 do gene IGF2 em indivíduos nascidos pequenos para a idade gestacional, *Dissertação de doutorado, USP – São Paulo* (2008).
- [22] J. Deal, F. Ma, J. Wilkin, F. Paquette, B. Rozen, T. Ge, M. Hudson, M. Stampfer, .M.N. Pollak, Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 1274 –1280.

- [23] E.S. Schernhammer, S.E. Hankinson, D.J. Hunter, M.J. Blouin, M.N. Pollak, Polymorphic variation at the 2202 locus in IGFBP3: Influence on serum levels of insulin-like growth factors, interaction with plasma retinol and vitamin D and breast cancer risk, *Int. J. Cancer* 107 (2003) 60–64.
- [24] Vela G, Luna M, Barritt J, Sandler B, Copperman AB. Monozygotic pregnancies conceived by in vitro fertilization: understanding their prognosis. *Fertil Steril.* 95 (2011) 606-10.
- [25] Ismail L, Mittal M, Kalu E. IVF twins: buy one get one free? *J Fam Plann Reprod Health Care.* 4 (2012) 252-7.
- [26] Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine.* 2008. Elsevier 7th ed.
- [27] Kato I, Easthan J, Li B, Smith M, Yu H. Genotype-phenotype analysis for the polymorphic CA repeat in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene. *Genet Epidemiol.* 18 (2003) 203-209.
- [28] Excoffier L, Laval G., Schneider S. *Arlequin: a software for population data analysis.* Version 3.1. Geneva: University of Geneva (2007).
- [29] Abramson JH. WinPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiologic Perspectives & Innovation* (2011) 8:1.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

Através das análises realizadas neste estudo, verificou-se que as frequências do polimorfismo (CA)_n do gene *IGF-I* estão de acordo com a literatura ao redor do mundo (Rietveld, 2009; Missmer *et al.*, 2002; Bageman *et al.*, 2007) (tabela 4 - artigo), onde o alelo 192, que corresponde a 19 repetições de CA, é o mais frequente, inclusive em estudos realizados na China (Wen *et al.* 2005; Xie *et al.* 2010), o segundo mais frequente em nossa amostra é o alelo 194, que corresponde a 20 repetições de CA, sendo também o segundo mais frequente em estudos realizados por Cleveland *et al.* (2005) na América do Norte, Rietveld *et al.* (2004) e Vaessen *et al.* (2001) na Europa.

Della Coletta (2008) analisou o mesmo polimorfismo no gene *IGF-I* em uma amostra da população do Estado de São Paulo (Brasil) e os resultados obtidos são similares aos obtidos na população caso de nosso estudo, Cândido Godói.

A hipótese inicial, de que o alelo 194, por ser responsável por um aumento nos níveis de *IGF-I* (Rosen *et al.* 1998; Kim, 2002) e consequente aumento nos níveis de FSH, estivesse influenciando a gemelaridade em Cândido Godói, não pode ser confirmada. Ao realizar uma análise de cada alelo separadamente, observou-se aumento da frequência do alelo 198, correspondente a 22 repetições de CA, nas mães de gêmeos com relação aos dois grupos de controle. Ao analisar os resultados obtidos por estudos em diversos continentes (tabela 5 - artigo), nota-se que a frequência da presença do alelo 198 é pequena, não passando de 3.36% em estudo realizado na China (Xie *et al.*, 2010) e com valor de 1.63% na América do Norte (Cleveland *et al.*, 2005), e na população de CG está presente com uma porcentagem de 7.7 %, valor significativamente maior.

Quanto ao polimorfismo no gene *IGFBP-3-202-A/C*, este se mantém de acordo com o que consta na literatura (Deal *et al.*, 2001; Schernhammer *et al.*, 2003), e não apresentou diferença significativa em relação a casos e controles, e também não apresentou correlação com o polimorfismo presente no gene *IGF-I*.

A gemelaridade é classificada por possuir etiologia complexa, com fatores ambientais e genéticos implicados, porém o fator ambiental que hoje está mais atrelado à gemelaridade não está presente no município de Cândido Godói, que é o tratamento para infertilidade (Vela *et al.*, 2011; Ismail *et al.* 2012).

O gene *IGF-I*, por sua vez, também sofre com fatores ambientais influenciando em seus níveis, como idade, uso de contraceptivos orais, consumo de álcool, massa corporal. (Basso *et al.*, 2004; Satija *et al.*, 2008). Porém 50% dos seus níveis circulantes, segundo

estudo realizado por Rosen *et al.* (1998), são de fundo genético, onde o polimorfismo de (CA)_n é o principal responsável por estas alterações.

Levando também em consideração, que autores apontam que, quanto maior o número de repetições de CA, maior os níveis de IGF-I circulantes (Rosen *et al.*, 1998), e que estes estão diretamente envolvidos com o maior número de receptores FSH e LH, retardando assim a atresia folicular, estimulando a sua multiplicação, promovendo a foliculogênese, ovulação, fertilização e também desenvolvimento do embrião. Desta forma podemos apontar o polimorfismo 198 do gene *IGF-I* como um fator relacionado à gemelaridade em humanos.

Encontramos no efeito fundador, forma de deriva genética (Nussbaum *et al.* 2008), a explicação para a ação de fatores genéticos potencializados, como aumento na frequência do alelo 198, onde um dos fundadores originais da população de Cândido Godói carregou este alelo. Se levarmos em conta a história de colonização da cidade no início do século XX, por aproximadamente oito famílias de descendência alemã provindas de cidades da região do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2011), a explicação do efeito fundador se torna ainda mais evidente.

REFERÊNCIAS

- Abhijit SD, Lalita SD, Ashwini D, Aditi AD. Fetus papyraceus - a case report. 2000. *J Obstet Gynaecol India* 50:118.
- Akin F, Turgut S, Cirak B, Kursunluoglu R. IGF(CA)19 and IGFBP-3-202A/C gene polymorphism in patients with acromegaly. 2010. *Growth Horm IGF Res* 20:399–403.
- Akinboro A, Azeez MA, Bakare AA. Frequency of twinning in southwest Nigeria. 2008. *Indian J Hum Genet.* 14(2):41-7.
- Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, van Duijn C, Ridder M, Savage M, Clark A. Polymorphism in the IGF-I Gene: Clinical Relevance for Short Children Born Small for gestational age (SGA). 2002. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2720.
- Asklund C, Jensen TK, Jorgensen N, Tabor A, Sperling L, Skakkebaek NE. Twin pregnancy possibly associated with high semen quality. 2007. *Hum Reprod.* 22:751–755.
- Bageman E, Ingvar C, Rose C, Jernstrom H. Absence of the common Insulin-like growth factor-1 19-repeat allele is associated with early age at breast cancer diagnosis in multiparous women. 2007. *Br J Cancer.* 96:712–7.
- Barigye O, Pasquini L, Galea P, Chambers H, Chappell L, *et al.* High risk of unexpected late fetal death in monochorionic twins despite intensive ultrasound surveillance: A cohort study. 2005. *PLoS Med* 2:172.
- Basso O, Nohr EA, Christensen K, Olsen J. Risk of twinning as a function of maternal weight and body mass index. 2004. *JAMA.* 291(13):1564-1566.
- Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PG, Lambalk CB. The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. 2006. *Hum Reprod.* Jun;21(6):1531-2. Epub 2006 Feb23.
- Beiguelman B & Franchi-Pinto C. Perinatal mortality among twins and singletons in a city in southeastern Brazil. 2000. *Genet Mol Biol* 23: 15-23.
- Beiguelman B. *O Estudo de Gêmeos.* 2008. Ribeirão Preto, SP : SBG.
- Beiguelman B., Franchi-Pinto, C., Dal Colletto, G.M. & Krieger, H. Annual variation of sex ratio in twin births and in singletons in Brazil. 1995. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 44: 163-168.
- Boklage CE. Embryogenesis of chimeras, twins and anterior midline asymmetries. 2006. *Hum Repod* 21:579-91.

Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P. A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. 2003. *J Med Genet* 40:913–917.

Cleveland RJ, Gammon MD, Edmiston SN, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Eng SE, Neugut AI, Santella RM and Conway K. IGF1 CA repeat polymorphisms, lifestyle factors and breast cancer risk in the Long Island Breast Cancer Study Project. 2006. *Carcinogenesis* 27(4): 758–765.

Cyranoski D. Developmental biology: Two by two. 2009. *Nature*. 458(7240):826-9.

Deal J, Ma F, Wilkin J, Paquette F, Rozen B, Ge T, Hudson M, Stampfer M, Pollak. Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. 2001. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86: 1274 –1280.

DeLellis K, Ingles S, Kolonel L, McKean-Cowdin R, Henderson B, Stanczyk F, Probst Hensch NM. IGF1 genotype, mean plasma level and breast cancer risk in the Hawaii/Los Angeles multiethnic cohort. 2003. *Br J Cancer* 88:277–82.

DeLellis K, Kaaks SRR, et al. Dietary and Lifestyle Correlates of Plasma Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF Binding Protein-3 (IGFBP-3): The Multiethnic Cohort. 2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13:1444-1451.

Della Coletta, RR. Análise das repetições CA do gene IGF1, VNTR do gene da insulina e região promotora P4 do gene IGF2 em indivíduos nascidos pequenos para a idade gestacional. 2008. Dissertação de doutorado, USP – São Paulo.

Derom C, Gielen M, Peeters H, Frijns JP, Zeegers MPA. Time trends in the natural dizygotic twinning rate. 2011. *Hum Reprod* 26(8):2247-52.

Derom C, Jawaheer D, Chen WV, McBride KL, Xiao X, Amos C, Gregersen PK, Vlietinck R. Genome-wide linkage scan for spontaneous DZ twinning. 2006. *Eur J Hum Genet* 14:117–122.

Ehrenborg E, Larsson C, Stern I, Janson M, Powell DR, Luthman H. Contiguous localization of the genes encoding human insulin-like growth factor binding proteins 1 (IGBP1) and 3 (IGBP3) on chromosome 7. 1992. *Genomics* 12:497–502.

Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond M. Concentrations of Insulin-Like Growth Factor-I in Blood and Ovarian Follicular Fluid of Cattle Selected for Twins. 1990. *Biol Reprod* 43:8-14.

Echternkamp SE. Endocrinology of increased ovarian folliculogenesis in cattle selected for twin births. 1999. *Proceedings of the American Society of Animal Science*.

Echternkamp, SE, Roberts AJ, Lunstra DD, Wise T, Spicer LJ. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. 2004. *J Anim Sci* 82:459-471.

Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. 2001. *Fertility and Sterility* 76:943-949.

Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. 2005. *Lancet* 365:1807-16.

Fehringer G, Boyd NF, Knight JA, Paterson AD, Dite GS, Giles GG, Southey MC, Andrulis IL, Hopper JL, Ozelik H. Family-based genetic association study of insulin-like growth factor I microsatellite markers and premenopausal breast cancer risk. 2009. *Breast Cancer Res Treat* 118:415-424.

Fehringer G, Ozelik H, Knight JA, Paterson AD, Boyd NF. Association between IGF1 CA microsatellites and mammographic density, anthropometric measures, and circulating IGF-I levels in premenopausal Caucasian women. 2009. *Breast Cancer Res Treat* 116:413-423.

Fellman J, Eriksson AW. Statistical analysis of the seasonal variation in the twinning rate. 1999. *Twin Res* 2:22-29.

Ferrari RM, Cooney MA, Vexler A, Liu A, Buck Louis GM. Time to pregnancy and multiple births. 2007. *Hum Reprod* 22:407-413.

Figer A, Karasik YP, Baruch RG, Chetrit A, Papa MZ, Bar Sade RB, Riezel S, Friedman E. Insulin-Like Growth Factor I Polymorphism and Breast Cancer Risk in Jewish Women. 2002. *IMAJ* 4:759±762

Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy A, Holly J, Mitchell SM, Gloyn AL, Owen K, Davies D, Smith GD, Ben-Shlomo Y. A putative functional polymorphism in the IGF-I gene—association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in UK populations. 2002. *Diabetes* 51 2313-2316.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luro K, Dodds KG, Montgomery GW et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. 2000. *Nat Genet* 25:279-283.

Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Epidemiology of Insulin-like Growth Factor-I in Elderly Men and Women. 1997. *Am J Epidemiol* 145:970-6.

Hafez ESSE, Hafez B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. 2004. *Reprodução Animal* 7:69.

Hamamy HA, Ajlouni HK, Ajlouni KM. Familial monozygotic twinning: report of an extended multi-generation family. 2004. *Twin Res* 7:219-222.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). 2004. *Biol Reprod* 70:900–909.

Hardin J, Carmichael SL, Selvin S, Lammer EJ, Shaw GM. Increased prevalence of cardiovascular defects among 56,709 California twin pairs. 2009. *Am J Med Genet A*. May;149A(5):877-86.

Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C-->T mutation. 2000. *Hum. Reprod.* 15: 2659-2662.

Hoekstra C, Zhao ZZ, Lambalk CB, Willemsen G, Martin NG, Boomsma DI, *et al.* Dizygotic twinning. 2008. *Hum Reprod Update* 14: 37–47.

Ismail L, Mittal M, Kalu E. IVF twins: buy one get one free? 2012. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 38(4):252-7.

Javadi M, Hematti S, Tavassoli M. Polymorphic CA repeat length in insulin-like growth factor 1 and risk of breast cancer in Iranian women. 2011. *Med Oncol* 29(2):516-20.

Jernstrom H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, Hudson T, Narod SA, Pollak M, Genetic and nongenetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in healthy premenopausal women, *Cancer Epidemiol.* 2001. *Biomarkers Prev.* 10 377–384.

Kaklamani VG, Linos A, Kaklamani E, Markaki J, Mantzoros C. Age, Sex, and Smoking Are Predictors of Circulating Insulin-Like Growth Factor 1 and Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein 3. 1999. *J Clin Oncol* 17:813-817. by American Society of Clinical Oncology

Kapoor M, Pal L. Epidemic of plurality and contributions of assiste reproductive technology therein. 2009. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C:128–135.

Kim ES, Shi X, Cobanoglu O, Weigel K, Berger PJ, Kirkpatrick BW. Refined mapping of twinning rate quantitative trait loci on bovine chromosome 5 and analysis of insulin-like growth factor-1 as a positional candidate gen. 2009. *J Anim Sci.* 87(3):835.

Kim JG, Roh KR, Lee JY. The relationship among serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal women in Korea. 2002. *Am J Obstet Gynecol* 186:345 – 50.

Kullima AA, Audu BM, Geidam AD. Outcome of twin deliveries at the University of Maiduguri Teaching Hospital: A 5-year review. 2011. *Niger J Clin Pract.* 14:345-8.

Lackey BR, Gray SLL, Henricks DM. Physiological basis for use of insulin like

growth factors in reproductive applications: a review. 2000. *Theriogenology* 53:1147-1156.

Levy T, Blickstein I. Does the use of folic acid increase the risk of twinning? 2006. *Int J Fertil Womens Med.* May-Jun;51(3):130-5.

MacGillivray I, Campbell DM, Thompson B. *Twinning and twins.* 1988. New York: John Wiley and Sons New York 67–97.

Machin GF. Amilial monozygotic twinning: A report of seven pedigrees. 2009. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* May 15;151C(2):152-4.

Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, et al. Births: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep* 2009; 57:1-102

Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. Births: final data for 2003. 2005. *Natl Vital Stat Rep* 54: 1–116.

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

Missmer SA, Haiman CA, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Pollak MN, Hankinson SE. A sequence repeat in the insulin-like growth factor-1 gene and risk of breast cancer. 2002. *Int J Cancer.* 100:332–6.

Mondschein JS, Canning SF, Miller DO *et al.* Insulin-like growth factor (IGFs) as autocrine/paracrine regulators of granulosa cell differentiation and growth: studies with a neutralizing monoclonal antibody to IGF-I. 1989. *Biol Reprod* 40:79-85.

Montgomery GW, Zhao ZZ, Marsh AJ, Mayne R, Treloar SA, James M, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL. A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. 2004. *Twin Res* 7:548–555.

Morimoto LM, Newcomb PA, White E, et al. Variation in Plasma Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3: Genetic Factors. 2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1394-1401.

Nohr EA, Rasmussen S, Ramlau-Hansen CH, Olsen J. Twinning rates according to maternal birthweight. 2009. *Twin Res Hum Genet.* Dec;12(6):591-7.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine.* 2008. Elsevier 7th ed.

Nwobodo EI, Bobzom DN, Obed J. Twin births at University of Maiduguri Teaching Hospital: incidence, pregnancy complications and outcome. 2002. *Niger J Med.* Apr-Jun;11(2):67-9.

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

Obi-Osius N, Misselwitz B, Karmaus W, Witten J. Twin frequency and industrial pollution in different regions of Hesse, Germany. 2004. *Occup Environ Med* 61: 482 – 487.

Painter JN, Willemsen G, Nyholt D, Hoekstra C, Duffy DL, Henders AK, Wallace L, Healey S, Cannon-Albright LA, Skolnick M, Martin, NG, Boomsma DI, Montgomery GW. A genome wide linkage scan for dizygotic twinning in 525 familie of mothers of dizygotic twins. 2010. *Human Reproduction* 25:1569–1580.

Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL, Montgomery GW. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. 2006. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4713–4716.

Portela VM, Veiga A, Price CA. Regulation of MMP2 and MMP9 metalloproteinases by FSH and growth factors in bovine granulosa cells. 2009. *Genet Mol Biol* 32(3): 516-520.

Powers WF, Kiely JL. The risks confronting twins: a national perspective. 1994. *Am J Obstet Gynecol.* Feb;170(2):456-61.

Rietveld I. The Role of a CA Repeat Polymorphism in the Promoter Region of the Insulin like Growth Factor-I gene in Physiology and the Pathophysiology of Diabetes Mellitus. 2009. Erasmus Universite Rotterdam.

Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J and Bilezikian JP. Repeat in IGF-I Gene: Implications for Genetic Studies of Bone Mineral Density Association Between Serum Insulin Growth Factor-I (IGF-I) and a Simple Sequence. 1998. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2286-2290.

Satija M, Sharma S, Soni RK, Sachar RK, Singh GP. Twinning and its correlates: community-based study in a rural area of India. 2008. *Hum Biol.* Dec;80(6):611-21.

Schernhammer ES, S. E . Hankinson , D . J . Hunter , M. J . Blouin , M. N. Poll a k, Polymorphic variation at the 2202 locus in IGFBP3: In fluce on serum levels of insulin-like growth factors, interaction with plasma retinol and vitamin D and breast cancer risk. 2003. *Int. J. Cancer* 107 60 –64.

Silva JRV, Figueiredo JR & Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. 2009. *Theriogenology* 71, 1193 – 1208.

Smits J, Monden C. Twinning across the Developing World. 2011. *PLoS ONE* 6(9): e25239.

Spicer LJ *et al.* Effects of insulin, insulin-like growth factor-1 and gonadotropins on bovine granulosa cells proliferation, progesterone production, estradiol production, and

(or) insulin-like growth-factor-1 production in vitro. 1993. *J Ani Sci* 71:1232-1241.

Steinman G. Mechanisms of twinning: X. The male factor. 2008. *J Reprod Med.* 53(9):681-4.

Steinman G. Why the twinning rate is higher in Africa than elsewhere: an analysis of selected factors. 2009. *J. Reprod. Med.* 54, 609 – 616.

Tagliani-Ribeiro A, Oliveira M, Sassi AK, Rodrigues MR, Zagonel-Oliveira M *et al.* Twin Town in South Brazil: A Nazi's Experiment or a Genetic Founder Effect? 2011. *PLoS ONE* 6(6): e20328.

Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJR, Schuler-Faccini L, Matte U. High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility. 2012. *Hum. Reprod.* 2012. Sep;27(9):2866-71.

Tong S, Caddy D, Short RV. Use of dizygotic to monozygotic twinning ratio as a measure of fertility. 1997. *Lancet* 349:843–845.

Uthra S, Raman R, Mukesh BN, Rajkumar SA, Kumari R P, Agarwal S, Paulm PG, Lakshmi pathy P, Gnanamoorthy P, Sharma T, McCarty CA, Kumaramanickavel G. Diabetic retinopathy and IGF-1 gene polymorphic cytosine-adenine repeats in a Southern Indian cohort. 2007. *Ophthalmic Res.* 39(5):294-9.

Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM. A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. 2001. *Diabetes* 50: 637–642.

Vela G, Luna M, Barritt J, Sandler B, Copperman AB. Monozygotic pregnancies conceived by in vitro fertilization: understanding their prognosis. *Fertil Steril.* 2011 Feb;95(2):606-10.

Vickers, MH, Casey, PJ, Champion, ZJ, et al. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat, *Growth Horm & IGF Res* 1999. 9:236-40.

Wang L, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Ohyama C, Sato K, Kinoshita H, Kamoto T, Nakamura A, Ogawa O, Kato T. Insulin-like growth factor-binding protein-3 gene 2202 A/C polymorphism is correlated with advanced disease status in prostate cancer. 2003. *Cancer Res.* 63 4407 –4411.

Weber MA, Sebire NJ. Genetics and developmental pathology of twinning. 2010. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15 313 e318

Wen W, Gao YT, Shu X, Yu H, Cai Q, Smith W, Zheng W. Insulin-Like Growth Factor-I Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk in Chinese Women. *Int. J. Cancer*: 113, 307–311 (2005) 2004. Wiley-Liss, Inc.

Xie L, Gong Y, Lian S, Yang J, Gao S, Xu L, Zhang Y. A microsatellite polymorphism in IGF1 gene promoter and longevity in a Han Chinese population. 2010. *BMC Research Notes* 3:55.

Yilmaz, A, Davis, ME, Simmen, RC, Estimation of (co)variance components for reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum IGF-I concentration. 2004. *J Anim Sci* 82:2285-92.

Zhao ZZ, Painter JN, Palmer JS, Webb PM, Hayward NK, Whiteman DC, Boomsma DI, Martin NG, Duffy DL, Montgomery GW. Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. 2008. *Hum Reprod*. Oct;23(10):2372-9. Epub 2008 Jul 9.

ANEXOS

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. 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. 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 (51-3359-8011) e a bióloga Ursula Matte (51-3359- 8838), que poderão ser contatadas em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (51-3359-8304).

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 sangue para extração de DNA para análise de fatores envolvidos com nascimento de gêmeos.
- Não concordo em fornecer amostra de sangue 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: _____

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?)

11. Seu cônjuge tem irmãos gêmeos ou outro parente gêmeo na família?

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

12. A sra teve filhos gêmeos?

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 conjuge.
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 avós? 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 cancer?
35. Outras observações:

PARTE A SER PREENCHIDA PARA AS FAMÍLIAS COM GÊMEOS

Evolução dos gêmeos:

Placenta: univitelinas

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