

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO P72R
(rs1042522) DO GENE *TP53* COM NASCIMENTOS
GEMELARES EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO SUL (RS)**

TESE DE DOUTORADO

ANA CAROLINA MARDINI

Porto Alegre, Brasil

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO P72R
(rs1042522) DO GENE *TP53* COM NASCIMENTOS
GEMELARES EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO SUL (RS)**

ANA CAROLINA MARDINI

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, Brasil

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Mardini, Ana Carolina

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO P72R (rs1042522) DO GENE TP53 COM NASCIMENTOS GEMELARES EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO SUL (RS) / Ana Carolina Mardini. -- 2016.
95 f.

Orientador: Ursula Matte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. gêmeos. 2. TP53. 3. rs1042522. 4. polimorfismo. I. Matte, Ursula, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

22 / 03 / 2016

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profª .Dra. Clarice Sampaio Alho

Coordenadora do Laboratório de Genética Humana e Molecular da PUC-RS

Pontifícia Universidade católica do Rio grande do Sul

Maria Teresa Vieira Sanseverino

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora Prof. Dra. Ursula Matte, pela disponibilidade e confiança em mim depositada, pois esta luta vem desde o mestrado com sua ajuda incansável na publicação do artigo. Sem este apoio, eu não teria nem iniciado o doutorado. Registro aqui os meus SINCEROS AGRADECIMENTOS!!

À Fernanda Santos Pereira pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, sempre com muita paciência e disponibilidade em ajudar no que fosse possível;

À Patrícia Koehler por facilitar minhas atividades na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA);

À amiga e colega Juliana Pitt Giacomazzi, pelas explicações sobre P53, pela disponibilidade e pela ajuda na organização deste trabalho;

Aos colegas e amigos da Fepps (Rodrigo, Simone, Fernanda, André, Susinéia e Jarbas), pelas risadas, pela paciência e ajuda nas diversas dificuldades durante o desenvolvimento deste trabalho, com informações das amostras, com as soluções das minhas dúvidas de informática e formatação;

À Prof. Dra. Lavínia Schuler-Faccini pela ajuda com os resultados e discussões sobre nascimentos gemelares;

Aos meus pais Alfredo Mardini e Diva Fernandes Mardini, pelo apoio em todas as horas, pela credibilidade depositada em mim, pelo amor e pelo eterno incentivo em me tornar uma profissional muito bem preparada;

Ao meu irmão Jorge Alexandre Mardini por me proporcionar convites agradáveis nos momentos mais cansativos deste trabalho e por me incentivar sempre nas minhas decisões.

Algo só é impossível até que alguém
duvide e resolva provar o contrário.
(Albert Einstein).

RESUMO

Introdução: Embora o nascimento de gêmeos tenha sempre chamado atenção, não há fatores genéticos ou ambientais conhecidos que podem determinar o nascimento de monozigóticos gêmeos (MZ). E mesmo para gêmeos dizigóticos (DZ), influências genéticas não são completamente compreendidas. **Objetivos:** Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que o alelo C do polimorfismo rs1042522 no gene *TP53* foi mais frequente nas mães de gêmeos do que nas mães de gestação única em uma pequena cidade no sul do Brasil. A fim de esclarecer se este foi um fator isolado, foi realizado um estudo observacional de caso-controle de base populacional. **Métodos:** As amostras foram selecionadas a partir de um programa de investigação de paternidade financiado pelo estado do Rio grande do Sul. As amostras foram consideradas casos em que duas das crianças tinham a mesma data de nascimento e os controles eram de amostras em que pelo menos dois filhos nasceram em datas diferentes. O método de escolha dos controles foi sequencial, sendo utilizados os primeiros que preenchessem esta condição a cada ano. **Resultados:** De 2007 a 2013, foram 32.661 registros pesquisados e 283 (0,9%) gêmeos foram encontrados (119 MZ e 164 DZ). Frequências alélicas e genotípicas não foram diferentes entre as mães de gêmeos ou mães de não gêmeos. No entanto, as mães de gêmeos MZ apresentaram uma maior frequência do genótipo GG e menor frequência do alelo C quando comparado com as mães de gêmeos DZ. Além disso, a proporção de gêmeos monozigóticos (42%) é maior do que normalmente relatado (30%). Finalmente, a proporção de gêmeos encontrados neste estudo parece ser mais realista, já que esta amostra não é supostamente de usuárias de técnicas de reprodução assistida.

Palavras chave: gêmeos, gene *TP53*, polimorfismo, rs1042522.

ABSTRACT

Introduction: Although the birth of twins has always attracted attention, there are no known genetic or environmental factors that can determine the birth of monozygotic (MZ) twins. And even for dizygotic (DZ) twins, genetic influences are not completely understood. **Objective:** A previous study from our group has shown that the C allele of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene was more frequent in the mothers of twins than in the mothers of singletons in a small village in South Brazil. In order to clarify if this was an isolated factor, we performed a population-based observational case-control study. **Methods:** Samples were selected from a state-funded program of paternity investigation. Samples were considered cases when two of the children had the same date of birth whereas controls were those samples in which at least two children were born in different dates. The first subsequent sample fulfilling control criteria was included after each case. **Results:** From 2007 to 2013, 32,661 records were searched and 283 (0.9%) twins were found (119 MZ and 164 DZ). Genotypic and allele frequencies were not different between mothers of twins or mothers of singletons. However, mothers of MZ twins showed a higher frequency of GG genotype and lower frequency of the C allele when compared to mothers of DZ twins. Also, the proportion of MZ twins (42%) is higher than usually reported (30%). Finally, the proportion of twins found in this study seems to be more realistic, as this sample is allegedly not user of assisted reproduction techniques.

Keywords: twins, gene *TP53*, polimorfism, rs1042522.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das regiões de procedência das amostras no estado do Rio Grande do Sul (RS). O inserto em destaque mostra a localização do RS no Brasil..... 40

Figura Suplementar 1. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D811S79, D21S11, D7S820, CSF1PO..... 56

Figura Suplementar 2. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338..... 57

Figura Suplementar 3. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D19S433, vWA, TPOX, D18S51..... 58

Figura Suplementar 4. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores Amelogenina, D5S818, FGA..... 59

Figura Suplementar 5. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D811S79, D21S11, D7S820, CSF1PO..... 60

Figura Suplementar 6. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338..... 61

Figura Suplementar 7. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D19S433, vWA, TPOX, D18S51..... 62

Figura Suplementar 8. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores Amelogenina, D5S818, FGA..... 63

Figura Suplementar 9. Resultados da genotipagem por TaqMan..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos e controles incluídos no estudo ao longo de sete anos. Os percentuais são relativos ao total de investigações de paternidade a cada ano.	39
Tabela 2. Distribuição da procedência de casos (gêmeos MZ e DZ) e controles nas diferentes regiões analisadas.	41
Tabela 3. Distribuição da procedência das mães de gêmeos MZ e DZ nas diferentes regiões analisadas.	42
Tabela 4. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene TP53 nos casos (n=283) e controles (n=300).	43
Tabela 5. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene TP53 nas mães de gêmeos monozigóticos (MZ, n=119) e de gêmeos dizigóticos (DZ, n=164).	43
Tabela 6. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene TP53 entre casos (MZ e DZ) e controles.	44
Tabela Suplementar 1. Número total de nascimentos gemelares (gestação dupla) no Rio Grande do Sul durante o período de 2007 a 2013.	65
Tabela Suplementar 2. Regiões do RS e associação entre mãe de gêmeos (casos) e mãe de não gêmeos (controle).	65
Tabela Suplementar 3. Distribuição da procedência de gêmeos MZ e DZ nas diferentes regiões analisadas.	65
Tabela Suplementar 4. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene TP53 entre casos e controles.	66
Tabela Suplementar 5. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene TP53 entre casos (MZ e DZ).	66

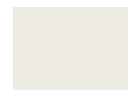



Tabela Suplementar 6. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R
do gene TP53 entre casos (MZ e DZ) e controles. 66

LISTA DE ABREVIATURAS

- BMP15 - proteína morfogenética óssea-15 (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*)
- BMPR1B - receptor de proteína morfogenética óssea 1B (do inglês *Bone Morphogenetic Protein Receptor*)
- DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- DZ - dizigóticos
- ESHRE - Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia
- FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
- FIV – fertilização *in vitro*
- FSH - hormônio folículo-estimulante (do inglês *Follicle Stimulating Hormone*)
- GDF-9 - fator de crescimento de diferenciação-9 (do inglês *Growth Differentiation Factor-9*)
- HAUSP - protease ubiquitina-específica associada ao herpesvirus (do inglês *Ubiquitin Specific Peptidase 7 – Herpes Virus Associated*)
- HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LIF - fator inibidor da leucemia (do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*)
- LIP - Laboratório de Investigação de Paternidade
- MDM2 - E3 ubiquitina proteína ligase (do inglês *Murine Double Minute 2 Homolog*)
- MDM4 – Regulador de p53 (do inglês *Murine Double Minute 4 Homolog*)
- MTHFR - folato metilenotetrahidrofolato redutase (do inglês *Methylenetetrahydrofolate Reductase*)
- MZ - monozigóticos
- P53 - proteína tumoral p53
- P63 - proteína tumoral p63
- P73 - proteína tumoral p73
- PCR - reação da polimerase em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
- PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
- SNP - polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)
- STRs - repetições curtas *in tandem* (do inglês *Short Tandem Repeat*)
- TP53 – gene da proteína tumoral p53

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Gemelaridade.....	17
2.2 Zigosidade	18
2.3 Prevalência da gemelaridade	21
2.4 Causas da gemelaridade	24
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo principal.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5. METODOLOGIA	36
5.1 Delineamento	36
5.2 População	36
5.3 Extração de DNA	37



5.4 Determinação de Zigosidade.....	37
5.5 Análise do Polimorfismo rs1042522.....	38
5.6 Tamanho Amostral.....	38
5.7 Aspectos Éticos	38
6. RESULTADOS.....	39
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1 – Figuras da análise MOLECULAR	56
ANEXO 2 – TABELAS DE CÁLCULO	65
ANEXO 3 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	67
ANEXO 4 - Artigo em Português.....	68
ANEXO 5 - Artigo em Inglês	83

1. INTRODUÇÃO

A etiologia do nascimento de gêmeos em seres humanos é, em grande parte, desconhecida e é assunto de um grande número de investigações (TAGLIANI RIBEIRO *et al.*, 2011). Em mentes curiosas, o nascimento de gêmeos gera mitos e fantasias, mas eles também fornecem uma possibilidade de compreensão do desenvolvimento embrionário inicial e, em particular, podem fornecer uma visão sobre vários mecanismos de doenças. Usualmente os gêmeos são classificados como monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) (HALL, 1996).

Os gêmeos MZ surgem da divisão de um único embrião após a fertilização e possuem o mesmo material genético. Não se conhecem influências ambientais ou genéticas capazes de determinar o nascimento de gêmeos MZ, que parecem ser um evento aleatório. Acredita-se que a incidência de MZ é independente da raça, idade, paridade e estado nutricional da mãe (TONG; SHORT, 1998). Por outro lado, estímulo para a geminação monozigótica pode ser influenciado por componentes do cromossomo sexual, como evidenciada pela maior prevalência de indivíduos do sexo feminino em geminação monozigótica (WEBER; SEBIRE, 2010).

Os gêmeos DZ surgem quando dois óvulos distintos são fertilizados por dois espermatozoides e, portanto, os indivíduos compartilham o material genético na proporção média de 50% dos genes (HANKINS; SAADE, 2005). Para gêmeos DZ, fatores hereditários são sugeridos pela maior prevalência em mulheres cuja mãe ou irmã tiveram gêmeos dizigóticos. Também há uma importante variação na proporção de gêmeos DZ entre diferentes populações (HOEKSTRA *et al.*, 2008).

Ainda não há consenso na literatura sobre os genes candidatos para gestações gemelares. Alguns trabalhos pesquisaram alterações no fator de crescimento de diferenciação-9 (GDF9) e na proteína morfogenética óssea-15 (BMP15), essenciais para a fertilidade humana normal e que desempenham papel crucial na determinação do crescimento folicular e na taxa de ovulação. Mutações no gene que codifica a proteína do metabolismo do folato metileno-tetra-hidrofolato redutase (*MTHFR*), em especial o polimorfismo 677 C>T, também podem estar associadas à gestação gemelar (HASBARGEN *et al.*, 2000).

No Brasil, em estudo feito no período de 1995 a 1998 foi observado um aumento na média das taxas de nascimentos duplos ou triplos. As taxas médias calculadas por 1.000 nascimentos para dizigóticos (DZ) foram de 19,51 e para trigêmeos foi de 2,13. Essas médias são as mais elevadas descritas no Brasil até os dias atuais. Estas taxas são, respectivamente, cerca de 4 e 14 vezes maiores do que as estimativas feitas para as mulheres no sudeste do Brasil pertencentes a todas as classes sociais (4,72/1.000 para gêmeos dizigóticos e 0,15/ 1.000 de trigêmeos) (COLLETTI, 2003).

No Rio Grande do Sul, na cidade de Candido Gódoi, foi descrita uma população com alta taxa de nascimentos gemelares. A análise genética do gene *TP53* e seus reguladores (genes *MDM2*, *MDM4* e *HAUSP*), demonstraram uma associação entre o polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* e gemelaridade nesta população (TAGLIANI RIBEIRO *et al.*, 2012). Este fator potencialmente está associado ao nascimento de gêmeos MZ e DZ nesta população. Entretanto, não existem estudos sobre a associação deste polimorfismo com gemelaridade em outras cidades do Rio Grande do Sul, permanecendo a dúvida sobre ser este um fenômeno isolado ou generalizável.

O Laboratório de Investigação de Paternidade (LIP) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) recebe, desde 2007, amostras de sangue de todo o estado do Rio Grande do Sul através de convênio firmado com o Tribunal de Justiça e Defensoria Pública/RS para que indivíduos de um nível socioeconômico baixo possam usufruir de seus direitos através da Assistência Judiciária Gratuita. Em média são avaliados 400 casos de investigação de paternidade por mês, que provêm de 8 municípios: Alegrete, Caxias do Sul, Ijuí, Palmeira das Missões, Passo Fundo, Pelotas, Santa Cruz do Sul, Santa Maria, além das coletas realizadas em Porto Alegre. Estas amostras podem ser consideradas representativas das diferentes regiões do estado, e provavelmente, sua frequência de nascimentos gemelares não é influenciada por tratamentos para infertilidade, dado que provem de uma população de nível sócio-econômico em que esta prática não está tão difundida. Logo, o estudo destas amostras como um estudo de base populacional pode auxiliar na investigação de fatores que influenciam a taxa de nascimentos gemelares no estado Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GEMELARIDADE

O nascimento de gêmeos sempre despertou uma curiosidade muito grande na história da humanidade. Tal fenômeno tem fascinado os cientistas ao longo dos séculos, visto que do ano de 1809 já era documentado o fenômeno de gêmeos e de outros nascimentos múltiplos (HALL, 1996). Os não cientistas são igualmente fascinados por gêmeos. Eles falam sobre a singularidade de um indivíduo e a ligação natural entre irmãos. Em algumas sociedades, gêmeos são reverenciados e em outras são vistos com desconfiança. Ao mesmo tempo, estudos com gêmeos são fundamentais para a compreensão científica do papel da herança biológica e da contribuição do ambiente sobre diferentes características (GALTON, 2012).

A pesquisa com gêmeos provou-se inestimável para ajudar a separar os efeitos de genes e do ambiente na variação das características humanas, comportamentos, e susceptibilidade a doenças (GALTON, 2012). Atualmente é bem reconhecido na comunidade científica que estudos com gêmeos são ferramentas poderosas para a compreensão do substrato biológico de doenças humanas complexas e comportamentos. O estudo da concordância e discordância entre gêmeos, tradicionalmente usado para estimar a herdabilidade, agora evoluiu para localizar variações genéticas que explicam a herdabilidade, estudar a regulação da expressão gênica, incluindo modificações epigenéticas sobre o material genético, processos celulares que envolvem metabólitos, o microbioma humano e farmacogenômica para variações humanas em resposta aos medicamentos (HUR; CRAIG, 2013).

2.2 ZIGOSIDADE

Tradicionalmente, os gêmeos são classificados como monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Em termos gerais se estima que cerca de 70% dos gêmeos são DZ e 30% são gêmeos MZ. No entanto, em algumas populações específicas estas percentagens estão modificadas (HANKINS; SAADE, 2005).

Dois terços dos gêmeos são dizigóticos. Cerca de 30% dos pares dizigóticos são de sexo oposto. Gêmeos monozigóticos ocorrem a uma taxa relativamente constante de 3 a 5/1000 nascimentos em todo o mundo, enquanto a incidência de gêmeos dizigóticos é considerado por grupo étnico (1/1000 nascimentos no Japão, em comparação com cerca de 50/1000 nascimentos em partes da Nigéria), idade materna (2% aos 35 anos) e paridade (2% após quatro gestações). A incidência de gemação, tanto dizigótica quanto monozigótica, também aumentou com a fertilização assistida. Cerca de um quarto das gravidezes por fertilização *in vitro* (FIV) são múltiplas, principalmente como resultado de vários óvulos fertilizados e, secundariamente, por causa de um aumento da taxa de divisão espontânea (RAO *et al.*, 2004).

Os gêmeos MZ surgem da divisão de um único embrião após a fertilização e possuem o mesmo material genético. Não se conhecem influências ambientais ou genéticas capazes de determinar o nascimento de gêmeos MZ, que parecem ser um evento aleatório. Acredita-se que a incidência de MZ é independente da raça, idade, paridade e desnutrição materna (TONG; SHORT, 1998). Por outro lado, estímulo para a gemação monozigótica pode ser influenciado por componentes do cromossomo

sexual, como evidenciada pela maior prevalência de indivíduos do sexo feminino em geminação monozigótica (WEBER; SEBIRE, 2010).

No início do desenvolvimento humano (geralmente pelo 4º dia), as membranas da placenta começam a se formar. Benirschke e colaboradores (1973) sugeriram que o exame das membranas da placenta poderia ser útil na distinção da zigosidade e, de fato, hoje os gêmeos são classificados por suas membranas, como gêmeos monócóricios, com maior risco para inúmeras complicações, ou dicóricios. Gêmeos DZ têm placentas e membranas separadas (dicóricio diamniótico). De 70-75% de gêmeos monozigóticos vivos compartilham uma placenta com membranas separadas (monócóricio diamniótico), enquanto que 25-30% têm placentas e membranas completamente distintas (dicóricio diamniótico). De 1-2% de gêmeos monozigóticos vivos têm um conjunto de membranas e uma placenta (monócóricio monoamniótico); estes gêmeos estão em risco de comprometimento vascular por causa da torção de seus cordões umbilicais em torno deles. As membranas e a placenta também são uma boa maneira de estimar o estágio do desenvolvimento em que ocorreu a geminação (BENIRSCHKE; KIM, 1973; HALL, 2003).

Em gêmeos monozigóticos com placentas e membranas separadas, acredita-se que essa separação ocorra no início, isto é, até o 3º dia. Como na embriogênese normal, o córion começa a se formar em torno do 3º dia. Gêmeos monozigóticos com placenta monócórica diamniótica surgem após a formação do córion, logo este tipo de desenvolvimento em gêmeos monozigóticos seria esperado para ocorrer entre o 4º e 7º dia do desenvolvimento embrionário normal, uma vez que o âmnio começa a se formar entre o 6º e 8º dia. Já gêmeos monozigóticos que têm placentas monócóricas monoamnióticas provavelmente surgem entre o 7º e 14º dia. Não está claro o número de

gêmeos monozigóticos concebidos atualmente, porque é muito provável que a taxa de abortamento seja alta. Os gêmeos siameses devem surgir após a formação da linha primitiva, teoricamente após o 14º dia. No entanto, quanto tempo depois e por qual mecanismo não está claro (BENIRSCHKE; KIM, 1973; HALL, 2003).

A incidência de complicações fetais é semelhante entre os gêmeos DZ e gêmeos MZ dicoriônicos; no entanto, gêmeos monocoriônicos são suscetíveis a complicações adicionais. A maioria dos gêmeos monocoriônicos tem anastomoses vasculares, e este suprimento de sangue compartilhado pode resultar em síndrome de transfusão feto-fetal, uma condição caracterizada pela partilha desigual do suprimento de sangue materno. Como resultado dessas complicações, temos crescimento fetal assimétrico e mortalidade fetal em 80% ou mais dos casos não tratados (FIENI S *et al.*,2004).

Apesar de haver um consenso geral de que os gêmeos são mais propensos a terem malformações congênitas do que de um único filho na gestação, há dados conflitantes sobre o risco preciso de anomalias congênitas em gêmeos em comparação com gestações únicas. As contribuições relativas de zigosidade, corionicidade e genética também permanecem pouco claras (WEBER; SEBIRE, 2010). Gêmeos MZ acarretam um risco maior de distúrbios de perfusão da placenta, acidentes de cordão umbilical e anomalias de desenvolvimento. As taxas de mortalidade são sempre mais elevadas com gêmeos MZ do que com nascimentos únicos (SOBEK *et al.*,2015).

Enquanto gêmeos MZ são geralmente concordantes para doenças cromossômicas ou defeitos genéticos, a maioria das gestações gemelares é discordante para malformações fetais, independentemente do tipo de anomalia. Dados derivados da maior série de relatório disponíveis na literatura relatam uma discordância de 81% para

todos os tipos de anomalias, consistente com taxas semelhantes relatados em estudos menores (ROCA DE BES M *et al.*, 2009).

A taxa de concordância das principais malformações congênitas é de cerca de 20% para gêmeos MZ, com a maioria dos pares de gêmeos DZ sendo discordantes. Isto é consistente com a hipótese de que malformações em gêmeos dizigóticos ocorrem em um ritmo semelhante ao de gestações únicas, tornando a probabilidade de dois afetados dizigóticos muito pequena, enquanto que a maioria das anomalias em gêmeos monozigóticos é ou o resultado do processo de geminação ou o efeito de complicações hemodinâmicas interfetal, ambos os quais podem afetar os dois fetos desigualmente (WEBER; SEBIRE, 2010).

2.3 PREVALÊNCIA DA GEMELARIDADE

Até os anos 1980, gestações múltiplas eram consideradas um fenômeno raro, devido à sua menor frequência. No entanto, por causa das técnicas de reprodução assistida o número de gestações múltiplas aumentou significativamente. Na Espanha, estudos mostram que nos últimos 20 anos as gestações gemelares dobraram, e as gestações de trigêmeos aumentaram seis vezes (ROCA DE BES M *et al.*, 2009).

De cada 30 pessoas de origem européia ou norte-americana, uma delas deve ter um irmão ou irmã gêmea. A menor chance de encontrar irmãos gêmeos é na Ásia, onde 1 em 70 pessoas é um membro de um gêmeo e a maior probabilidade se encontra na Nigéria, onde 1 em cada 12 pessoas é um membro de um par de gêmeos. Na maioria dos países, a taxa de gemelaridade tem aumentado constantemente desde a década de

1980 na sequência de um declínio de longo prazo das gemelaridade de 1900 em diante (OHM; DEROM, 2006).

Esta tendência mudou recentemente, particularmente nos países do norte da Europa, como resultado de relatórios publicados pela Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e da legislação sobre o número de embriões que podem ser transferidos em ciclos de FIV. Em alguns países, a legislação limita o número de embriões que podem ser transferidos em um (Suécia e Bélgica), dois (Reino Unido e Holanda) ou três (Espanha, Itália e Hungria). Em outros países, como a Dinamarca, Finlândia, Áustria, Polônia, França, Irlanda, Portugal e República Checa, há recomendações, mas nenhuma legislação sobre esta matéria. Consequentemente, o número de nascimentos múltiplos (trigêmeos ou mais) caiu. No entanto, na Europa, o número de gêmeos manteve-se estável em cerca de 22% das gestações de FIV. Os resultados do programa europeu de monitorização da ESHRE FIV em 2003 mostrou que o número de gestações gemelares variou menos de 15% de todas as gestações de FIV na Suécia a 35% na Ucrânia. Do mesmo modo, tem havido uma diminuição do número de gestações múltiplas nos Estados Unidos com menos embriões transferidos por ciclo. Esta nova tendência é devido ao fato de que muitos países estão adotando eletivamente uma única transferência de embrião para reduzir os elevados custos e riscos de nascimentos múltiplos (ROCA DE BES M *et al.*, 2009).

No Brasil, dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), entre 1992 e 1999 mostram um total de 1.033 mães de gêmeos contra 194.903 mães de não gêmeos (BENUTE *et al.*, 2013), o que representa 5,3/1.000 nascimentos. Colletto (2003) aponta que, na capital paulista em 2003, a incidência de gêmeos foi 10,45 e a de trigêmeos 0,29/1.000

nascimentos. Esse aumento é associado ao uso de procedimentos de reprodução assistida (COLLETO, 2003). Não obstante os riscos mais elevados, os casais que passam por esses procedimentos têm muitas vezes uma preferência para múltiplas gestações, talvez devido a um desejo de construir uma família imediata (GLEICHER; BARAD, 2009), ou a aspectos culturais, tais como crenças e mitos sobre vários filhos e ideais sobre a maternidade com gêmeos (BAOR; BLICKSTEIN, 2005).

Embora gêmeos muitas vezes sejam considerados como uma boa notícia e um meio para alcançar uma família instantaneamente, na verdade, as taxas de mortalidade neonatal têm sido estimadas como sendo cinco vezes maior em gêmeos do que com um único neonato, com 8-15 % de nascimentos prematuros (<33 semanas) e 7-11% de nascidos com baixo peso (<1500 g) nesse grupo. Além disso, gestação múltipla e nascimentos múltiplos aumentam os riscos para a mãe e para criança. Crianças prematuras e de baixo peso ao nascer tem risco aumentado de dificuldades respiratórias; deficiências neurosensoriais incluindo paralisia cerebral, surdez e cegueira; e níveis mais baixos de funcionamento cognitivo. Quando comparados com crianças de gestação única, os gêmeos exibem desenvolvimento da linguagem atrasada e baixa inteligência verbal. Após o nascimento múltiplo, as mães têm risco aumentado para depressão e maior estresse parental (NEWTON *et al.*, 2007).

Embora o aumento da incidência de gêmeos MZ após a reprodução assistida seja amplamente reconhecido, mecanismos gerais subjacentes a este fenômeno são mal compreendidos. No estudo de Sobek e colaboradores (2015) foi usado um extenso conjunto de dados envolvendo o desempenho de pacientes de FIV. Foram focados os efeitos da função do ovário, micromanipulação e fatores genéticos. Estes autores descreveram que a incidência de gêmeos monozigóticos está associada com elevados

níveis de estradiol e baixo consumo de hormônio folículo estimulante (FSH) por ovócitos. Em contraste, as técnicas de micromanipulação ou o tipo de meio de cultivo não tiveram um efeito sobre a frequência de gêmeos MZ. Um questionário pormenorizado sobre os componentes hereditários em famílias de pacientes revelaram a evidência de um fundo genético subjacente em gêmeos MZ (SOBEK *et al.*, 2015).

2.4 CAUSAS DA GEMELARIDADE

As causas da geminação de monozigóticos em seres humanos são desconhecidas. A inativação do cromossomo X enviesada ($\geq 80\%$ das células tiverem a inativação preferencial do cromossomo proveniente da mãe ou do cromossomo proveniente do pai) foi sugerida para explicar o excesso de geminação de monozigóticos femininos. Danos no interior da massa celular também poderiam contribuir para a geminação em seres humanos. A partir da FIV em seres humanos, óvulos envelhecidos, atraso na fertilização ou drogas ovulatórias que poderiam levar ao endurecimento da zona pelúcida, poderia produzir gêmeos MZ, separando fisicamente a concepção em duas massas celulares (HALL, 1996). A geminação em famílias com gêmeos monozigóticos poderia estar associado com uma anomalia hereditária da zona pelúcida ou algum outro mecanismo, levando à falha nos primeiros blastocistos à ficarem juntos (LEWIS *et al.*, 1996). Anormalidades na zona pelúcida poderiam ser responsáveis por 5-10% de gêmeos monozigóticos espontâneos e para o excesso visto nas geminações com tecnologias reprodutivas artificiais em seres humanos (HALL, 1996).

Os gêmeos DZ ocorrem quando dois óvulos distintos são fertilizados por dois espermatozóides e, portanto, os indivíduos compartilham o material genético na

proporção média de 50% dos genes (HANKINS; SAADE, 2005). Para gêmeos DZ, fatores hereditários são sugeridos pela maior prevalência em mulheres cuja mãe ou irmã tiveram gêmeos dizigóticos. Conforme descrito por White e Wyshak (1964), para uma mãe com um irmão gêmeo dizigótico, a probabilidade de ela gerar gêmeos dizigóticos é de 1 em 58. Em comparação, se o pai tiver um irmão gêmeo dizigótico, essa frequência é de 1 em 116. A conclusão foi de que o componente genético materno exerce uma influência muito maior do que o componente genético paterno na geminação de dizigóticos. No entanto, a base genética para geminação de dizigóticos ainda está por ser mapeado em humanos, e não está claro se esta é uma herança dominante ou recessiva (WHITE; WYSHAK, 1964).

Acredita-se que a causa das gestações gemelares DZ seja multifatorial e estudos epidemiológicos relatam história familiar materna, etnia, idade, níveis de gonadotrofinas, uso da tecnologia de concepção artificial e fatores dietéticos, todos susceptíveis de desempenhar um papel neste tipo de gestação. Em contrapartida, o estímulo para geminação de monozigóticos permanece pouco claro, mas pode estar relacionado com influências ambientais, juntamente com uma possível suscetibilidade para o desenvolvimento de eixos de co-dominantes ou influenciada por componentes dos cromossomas sexuais, evidenciado pela maior prevalência feminina em geminações monozigóticas. O impacto das influências ambientais é demonstrado pelo aumento da taxa de gêmeos monozigóticos encontrados em gestações de FIV e após indução de ovulação. No entanto, geminação de monozigóticos tem sido cada vez mais descrita, muitos casos mostram um aparente padrão de herança autossômica dominante (WEBER; SEBIRE, 2010).

O fator mais importante associado com a gemação de dizigóticos é a idade materna. O número de gestações gemelares aumenta substancialmente com a idade materna, até a idade de 38 anos, e depois diminui novamente. As mulheres que produzem gêmeos DZ são, em certo sentido, uma elite reprodutiva. Está provado que as mães de gêmeos são mais altas e mais pesadas do que outras mães (HOEKSTRA *et al.*, 2008). Outros fatores associados à gemação é a paridade (o número de gestações vividas pela mãe antes da gravidez de gêmeos), altura materna, ser fumante, uso de contraceptivo oral e raça/etnia. Há também um componente hereditário substancial, que vem através da linha feminina (SMITS; MONDEN, 2011).

A conclusão geral tirada a partir de descobertas de poucos artigos publicados era de que as taxas de gemações naturais eram baixas no Leste da Ásia e Oceania (menos de 8 nascimentos de gêmeos por mil nascimentos), intermediário na Europa, EUA e Índia (9 a 16/1000 nascimentos) e alta em alguns países africanos (17 ou mais/1000 nascimentos). No entanto, para as partes menos desenvolvidas do nosso mundo, esta conclusão baseia-se em baixa qualidade e dados não representativos de apenas uma parte de alguns países. A maioria dos dados foi obtida a partir de registros de nascimentos locais, que muitas vezes são de qualidade duvidosa ou a partir de registros hospitalares, que são notórios por seus problemas de seletividade. Em dados hospitalares, nascimentos de gêmeos podem ser mal interpretados, porque gestações gemelares são frequentemente associadas a complicações, ou interpretados de maneira errônea, quando os casos complicados são encaminhados para os hospitais especiais. Informações nacionais comparáveis e representativas sobre a incidência de nascimentos de gêmeos nos países em desenvolvimento estão em falta até agora (SMITS; MONDEN, 2011).

Ainda não há consenso na literatura sobre os genes candidatos para gestações gemelares. Alguns trabalhos pesquisaram alterações no gene do fator de crescimento de diferenciação-9 (*GDF9*) e no gene proteína morfogenética óssea-15 (*BMP15*), essenciais para a fertilidade humana normal e que desempenham um papel crucial na determinação do crescimento folicular e na taxa de ovulação. Além disso, a variação no gene *BMP15* pode contribuir na variação de geminação em humanos (BORTOLUS *et al.*, 1999) . Mutações nos genes *BMP15*, *GDF9* e receptor de proteína morfogenética óssea 1B (*BMPRI1B*) em ovinos aumentam as taxas de ovulação e de gemelaridade (CHAUHAN *et al.*, 2010).

Ovelhas provaram ser um modelo útil para elucidar a importância da *BMP15* e do *GDF9* na foliculogênese. Na maioria dos ovinos, o número típico de oócitos ovulados por ciclo é um ou dois. Ao longo dos anos, os agricultores têm cuidadosamente estabelecido e mantido as linhagens de ovelhas por sua alta prolificidade. Tipicamente, estas ovelhas têm uma taxa maior de gestações gemelares e triplas (MOORE *et al.*, 2004).

As consequências notáveis nas mutações e deleções nos genes *BMP15* e *GDF9* no número de folículos dominantes e, em parte, na ovulação de ratos e ovelhas demonstraram uma importância crucial destes fatores de crescimento dos oócitos na determinação do número de óvulos em cada ovulação em mamíferos. As diferenças entre os efeitos das deleções dos genes do *BMP15* e *GDF9* na fertilidade de ratos fêmea quando comparados com os efeitos das mutações na proteína *BMP15* e *GDF9* na fertilidade de ovelhas fêmeas é um ponto crucial, importante na diferença funcional dos sistemas da *BMP15* / *GDF9* nestas duas espécies. A descoberta de que estes fatores desempenham um papel fundamental na determinação de uma parte na ovulação,

juntamente com as diferenças cruciais nos papéis de BMP15 e GDF9 em ratinhos na poliovulação e nas ovelhas a mono-ovulação, conduziram à hipótese de que estes genes podem ter papéis primordiais na determinação das diferenças específicas da ovulação de cada espécie e, em parte, no tamanho da ninhada (MOORE *et al.*, 2004).

Mutações no gene do metabolismo do folato MTHFR, como 677 C>T podem estar associadas à gestação gemelar. Os achados deste estudo sugerem que a mutação 677C>T no gene MTHFR, pode interferir no tamanho da prole, provavelmente influenciando a proliferação, acelerando a divisão celular materna e embrionária (HASBARGEN *et al.*, 2000).

Em gestações múltiplas, o rápido crescimento dos embriões durante as primeiras semanas de vida resulta em um aumento da exigência de ácido fólico. A mutação 677C> T no gene *MTHFR* aumenta ainda mais a dependência de ácido fólico para remetilação adequada da metionina, uma vez que 5-metil-THF é o co-substrato necessário na reação de remetilação catalisada pela enzima metionina-sintetase, e os indivíduos afetados têm de aumentar a sua ingestão de folato, a fim de substituir a diminuição da atividade MTHRF. Acredita-se que essa mutação poderia afetar a incidência de gestação múltipla alterando homocisteína - metionina - metabolismo de S-Adesilmetionina na presença das concentrações de folato abaixo da média (HASBARGEN *et al.*, 2000).

A idade materna avançada também tem sido documentada como um fator que influencia a incidência de gestações múltiplas em uma faixa etária entre 35 até 39 anos, o que provavelmente está associado com aumento do FSH. Vários estudos de base populacional, tanto nos Estados Unidos como em outros países industrializados, têm

documentado um aumento na frequência e taxa de nascimentos múltiplos. Duas razões principais são atribuídas ao aumento temporal de nascimentos múltiplos: as mulheres que optam por adiar a sua (primeira) gestação, o que implica um efeito da idade materna avançada, e o uso liberal de métodos de reprodução assistida (HOEKSTRA *et al.*, 2008). A indução da ovulação ou de agentes estimulantes e de tecnologias de reprodução assistida desde a sua criação teve uma enorme influência sobre o aumento nas taxas de gestações múltiplas (TONG; SHORT, 1998).

Gêmeos dizigóticos ocorrem freqüentemente em uma base hereditária, mas até agora, nenhum *locus* genético específico tem sido associado a este fenômeno. Segundo Ayman Al-Hendy e colaboradores (2000), o FSH tem um papel na foliculogênese e na geminação espontânea. Utilizando a abordagem do gene candidato, foram procuradas mutações no gene que codifica o receptor de FSH em uma mulher que tinham dado à luz a dois pares de gêmeos dizigóticos sem tratamento de fertilidade. Foram identificadas duas mutações associadas (Thr307Ala e Asn680Ser) que foram estreitamente associados a este fenótipo. Estes autores sugeriram que a expressão de ambas as mutações aumenta a sensibilidade do receptor de FSH e pode estar associadas à geminação espontânea (AL-HENDY *et al.*, 2000).

Crescimento múltiplo do folículo e subsequente ovulação múltipla parece ser uma explicação lógica para gestação gemelar. Ambos foram demonstrados em mães de gêmeos dizigóticos com histórico familiar de gestação gemelar. Normalmente, o desenvolvimento contínuo de um folículo dominante ocorre quando um determinado limiar do nível de FSH no plasma é apenas levemente ultrapassado. Crescimento múltiplo folicular está relacionado com níveis de FSH mais elevados do que este limiar

levemente ultrapassado, ou para níveis acima do limiar durante um tempo prolongado (LAMBALK *et al.*, 2015).

No ponto de vista do estudo de Lambalk e colaboradores (1998), parece válido supor ser um traço hereditário ter gêmeos dizigóticos como resultado de hiperestimulação endógena por FSH em uma proporção significativa de mães. Uma alta proporção de mães de gêmeos neste estudo tinha um ou mais valores de FSH acima de 10 UI/L. Dentro das especificações do teste que foi utilizado, esta observação geralmente foi associada com a insuficiência ovariana incipiente quando observado em mulheres que menstruam regularmente, a qual pode ser causada por uma diminuição na reserva ovariana (LAMBALK *et al.*, 2015).

Há indícios de que ser mãe de gêmeos dizigóticos (quer numa base hereditária ou não) é um risco para menopausa precoce. Ainda no estudo de Lambalk e colaboradores (1998), não houve diferença na idade da menopausa entre as mães de gêmeos DZ com história familiar positiva e os controles. Este resultado pode ter sido influenciado pelo pequeno tamanho da amostra, mas também pode indicar que a falência ovariana incipiente e suscetibilidade hereditária para gêmeos DZ são entidades diferentes. Por outro lado, o aumento natural dos níveis de FSH na fase folicular, tal como observado em geral depois de 30 anos de idade, pode ser a causa subjacente do risco de geminação dizigótica não hereditária associada ao aumento da idade materna. De qualquer maneira, deve-se notar que nem todas as mulheres com níveis elevados de FSH na fase folicular precoce devem ser consideradas como tendo insuficiência ovariana precoce (LAMBALK *et al.*, 2015).

Nos Estados Unidos, gêmeos agora constituem cerca de 3-4% de todos os nascimentos com variações significativas por região (os estados do Nordeste apresentam os maiores índices), etnia materna (caucasianos apresentam os maiores índices) e idade materna. Em particular, a taxa de gêmeos aumentou 75% nas últimas 3 décadas nos Estados Unidos, com aumento ainda maior nas taxas de trigêmeos. Na Europa, as taxas de nascimento de gêmeos tiveram uma variação considerável em 2003. A taxa média de gemelaridade foi de 16,4/1000 nascimentos, mas as taxas variaram amplamente de país para país, de 11/1000 nascimentos em Luxemburgo e em Portugal e de 20/1000 nascimentos na Dinamarca, Grécia e Holanda (HALL, 1996); HOEKSTRA *et al.*, 2008). As taxas de gemelaridade de MZ geralmente ocorrem constantemente de 4/1000 nascimentos em todo o mundo (COLLETTTO *et al.*, 2001).

No Brasil, em um estudo feito no período de 1995 a 1998, foi observado um aumento na média das taxas de nascimentos duplos ou triplos. As taxas médias calculadas por 1.000 nascimentos para dizigóticos foram de 19,51 e para trigêmeos foi de 2,13. Essas médias são as mais elevadas descritas no Brasil até os dias atuais. Tais taxas são, respectivamente, cerca de 4 e 14 vezes maiores do que as estimativas feitas para as mulheres no sudeste do Brasil pertencentes a todas as classes sociais (4,72/1.000 para gêmeos DZ e 0,15/1.000 de trigêmeos). Já a gemelaridade média de MZ foi de 4,5/1000, o que foi semelhante à encontrada anteriormente no Brasil, onde a média era de 4,1/1.000 (COLLETTTO *et al.*, 2003).

Como nos EUA, a explicação para esse aumento pode ser atribuída à fertilização assistida e também a um efeito residual do uso de anticoncepcionais orais por longo período (MOORE *et al.*, 2004).

Mais recentemente, um número de estudos demonstrou polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) em genes na via do P53, associados com “infertilidade inexplicada” em mulheres. A implantação ineficiente pode ser uma importante causa da infertilidade inexplicada. Em camundongos, o fator de inibição de leucemia (LIF) tem sido sugerido como um fator importante para a implantação em seres humanos. Níveis de LIF na maioria das mulheres com infertilidade inexplicada são significativamente diminuídos, conforme medido no lavado uterino. A regulação de LIF e implantação de blastocistos por P53 em camundongos sugere um potencial papel do P53 e sua via na fertilidade humana (KANG *et al.*, 2009). Falha de implantação também é a causa mais frequente da não gravidez em humanos após FIV e transferência de embriões. Ter proteína LIF uterina suficiente é uma condição essencial para a implantação e baixos níveis de LIF foram relatados em mulheres inférteis (HU *et al.*, 2007).

A via do gene TP53 é crucial para a prevenção de tumores. Em algumas circunstâncias, a interrupção da função de P53 normal é um pré-requisito para o desenvolvimento ou a progressão de tumores. TP53 é o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos. Mais de 50% dos tumores possuem mutações neste gene. Recentemente, uma função previamente não descrita de P53 na reprodução foi descoberta; P53 desempenha um papel importante na implantação de blastocistos e reprodução materna por meio da regulação do LIF em camundongos. LIF é uma das citocinas mais importantes na implantação. Em muitas espécies de mamíferos, incluindo os camundongos e os humanos, o aumento transitório da expressão de LIF uterino é coincidente com o início da implantação. Camundongos têm a implantação prejudicada pela diminuição dos níveis de LIF uterino (HU *et al.*, 2007).

Em seres humanos, foram identificados SNPs em genes que participam em pontos críticos das vias de p53, incluindo além do próprio *TP53*, *MDM2*, *MDM4* e *HAUSP*. Alguns SNPs tais como SNP TP53, códon 72 e SNP 309 de MDM2, têm sido mostrados na modificação da atividade ou nos níveis da proteína P53 e da influência na suscetibilidade ao câncer. Além disso, recentes estudos das estruturas de haplótipos desses SNPs em populações com diferentes origens étnicas sugerem que estes genes estão sob pressão seletiva evolutiva para determinados alelos. Por conseguinte, é possível que os genes submetidos a seleção na via do p53 possam influenciar a fertilidade humana. O SNP no códon 72, também denominado rs1042522 resulta em uma arginina (R72) ou prolina (P72) no resíduo 72 da proteína (KANG *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICATIVA

No Rio Grande do Sul, na cidade de Candido Gódoi, foi descrita uma população com alta taxa de nascimentos gemelares. Estudos epidemiológicos nesta população sugerem a existência de um efeito fundador. A análise genética dos genes *TP53* e seus reguladores (MDM2, MDM4 e HAUSP), demonstraram uma associação entre o polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* e gemelaridade nesta população (TAGLIANI RIBEIRO *et al.*, 2012). Este fator potencialmente está associado ao nascimento de gêmeos MZ e DZ nesta população. Entretanto, não existem estudos sobre a associação deste polimorfismo com gemelaridade em outras cidades do Rio Grande do Sul, permanecendo a dúvida sobre ser este um fenômeno isolado ou generalizável.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Associação da presença do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* com nascimento gemelar em uma amostra de base populacional.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se há diferença entre as regiões de procedência dos nascimentos gemelares nos casos enviados para investigação de paternidade.

Determinar o percentual de gêmeos monozigóticos e dizigóticos a partir de dados moleculares.

Determinar a frequência do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* em mães de gêmeos monozigóticos e dizigóticos.

5. METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO

Estudo observacional de casos e controles em uma amostra de base populacional.

5.2 POPULAÇÃO

Foi utilizado o banco de dados do Laboratório de Investigação de Paternidade (LIP) localizado na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) para seleção de casos e controles nos anos de 2007 à 2013.

Os casos foram compostos por amostras submetidas a investigação de paternidade em que os filhos eram gemelares, isto é, apresentaram a mesma data de nascimento e em que não houve exclusão de maternidade.

Os controles foram compostos por amostras submetidas a investigação de paternidade em que havia registro de pelo menos dois filhos, sem que nenhum fosse gemelar, ou seja, não apresentaram a mesma data de nascimento, e em que não houve exclusão de maternidade. O método de escolha dos controles foi sequencial, sendo utilizados os primeiros que preenchessem esta condição a cada ano.

Os seguintes dados foram coletados: região de procedência das amostras, (considerada como região de nascimento dos gêmeos), idade da mãe ao nascimento dos

gêmeos ou do primeiro filho para os controles. Também foram obtidos os dados de identificação genética dos gêmeos para determinação de zigosidade.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O kit comercial FTA Classic Card (Whatman) foi utilizado na extração de DNA destas amostras. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue impregnado em cartão FTA segundo instruções do fabricante.

5.4 DETERMINAÇÃO DE ZIGOSIDADE

Após a extração de DNA as amostras foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, utilizando o kit comercial de amplificação AmpFISTR® Identifiler® (Life Technologies), o qual possibilita, pelo emprego de primers fluorescentes, a análise simultânea dos seguintes marcadores (STRs): CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX, VWA e amelogenina, seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos deste PCR foram analisados por eletroforese capilar no analisador genético ABI PRISM 3130 XL (Life Technologies), utilizando 500 LIZ™ como marcador de peso molecular interno. Os dados foram coletados pelo programa DataCollection® 3.0 e analisados através do programa GeneMapper® 3.2.1. Com a utilização deste software foi possível identificar a zigosidade dos gêmeos. Figuras representativas destas análises são apresentadas no anexo 1 (figuras suplementares 1 a 8).

5.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO rs1042522

O DNA armazenado no LIP/FEPPS das mães de casos e controles foi utilizado para determinação da frequência do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53*. Para isso foi realizado o ensaio TaqMan C_2403545_10 conforme descrito por Tagliani-Ribeiro e colaboradores (2012) no equipamento StepOne[®] (Life Technologies). Essas análises foram realizadas na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Figuras representativas destes resultados estão no anexo 1 (figura suplementar 9).

5.6 TAMANHO AMOSTRAL

Foram avaliadas amostras existentes no LIP/FEPPS desde 2007 até 2013, sendo o número de controles pareados com o número de casos. Ao total, foram avaliadas de 583 amostras, incluindo casos e controles.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob número 13-0542 (anexo 3). Uma vez que as amostras foram obtidas de forma anônima, não foi necessário o uso de termo de consentimento livre e esclarecido.

6. RESULTADOS

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2013, o LIP/FEPPS realizou 32.661 investigações de paternidade. Deste total, 283 (0,9%) eram de mães de gêmeos e foram incluídas neste estudo. Destas 283 mulheres, 119 foram mães de gêmeos MZ, 164 mães de gêmeos DZ (ambas denominadas casos) e 300 mães de pelo menos dois filhos não gêmeos (denominadas controles). Sendo assim, das 583 mães incluídas no estudo, 283 (48%) eram casos. Entre os 283 casos, 119 (42%) foram de mães de gêmeos MZ. Este percentual difere do descrito na literatura, que estima que um terço dos casos de nascimentos gemelares sejam MZ

A tabela 1 apresenta a distribuição de casos e controles ao longo de sete anos (2007-2013). Observa-se que não há uma variação importante nesta distribuição ao longo dos anos. No entanto, dados do DATASUS mostram que nesse período o estado do Rio Grande do Sul teve um aumento de gestações gemelares duplas de 21,24% (tabela suplementar 1, anexo 2).

Tabela 1. Número de casos e controles incluídos no estudo ao longo de sete anos. Os percentuais são relativos ao total de investigações de paternidade a cada ano.

Ano	Casos		Controles	Total de investigações de paternidade
	MZ (%)	DZ (%)		
2007	18 (0,6)	20 (0,7)	36	2885
2008	23 (0,3)	31 (0,4)	54	6952
2009	13 (0,3)	29 (0,6)	38	4805
2010	16 (0,3)	17 (0,4)	47	4759
2011	16 (0,4)	12 (0,3)	33	4391
2012	20 (0,5)	29 (0,7)	52	4327
2013	13 (0,3)	26 (0,6)	40	4542
Total	119 (0,42)	164 (0,58)	300	32661
	283			

Legenda: MZ-gêmeos monozigóticos; DZ-gêmeos dizigóticos

Além da cidade de encaminhamento das amostras, a idade materna ao nascimento dos gêmeos (para os casos) ou do primeiro (para os controles) foi analisada. A média de idade gestacional entre casos foi de $26,4 \pm 6,9$ anos e $25,4 \pm 6,6$ anos para controles ($p=0,08$).

As amostras foram provenientes de doze cidades do estado Rio Grande do Sul, as quais podem ser agrupadas em cinco regiões (figura 1): metropolitana, central, noroeste, serra e sul.

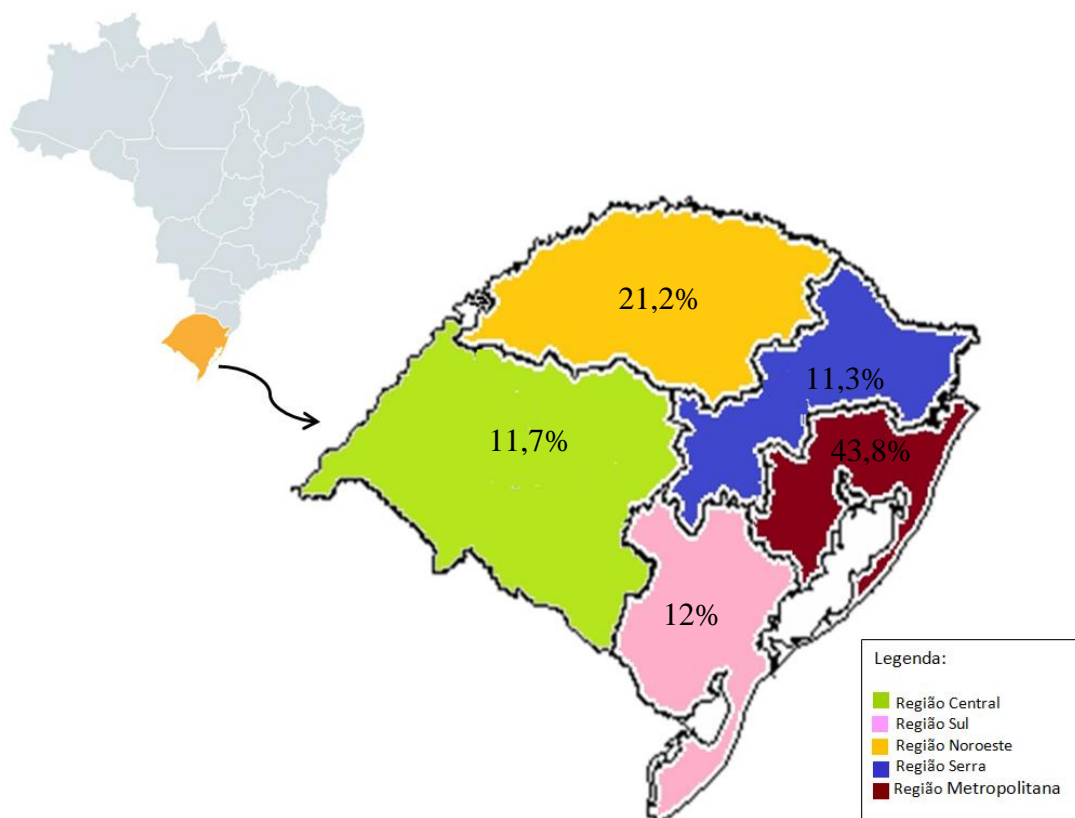


Figura 1. Distribuição das regiões de procedência das amostras no estado do Rio Grande do Sul (RS). O inserto em destaque mostra a localização do RS no Brasil.

A distribuição da procedência dos casos (mãe de gêmeos) e dos controles (mãe de não gêmeos) nas diferentes regiões pode ser observada na tabela 2. A tabela suplementar 2 (anexo 2) apresenta os valores esperados e o qui-quadrado calculado para

cada região. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões em relação ao percentual de nascimentos gemelares como um todo ($p=0,0872$).

Tabela 2. Distribuição da procedência de casos (gêmeos MZ e DZ) e controles nas diferentes regiões analisadas.

Região	Casos (MZ e DZ)	Controles
	N (%)	N (%)
Central	33 (11,7)	43 (14,3)
Metropolitana	124 (43,8)	128 (42,7)
Noroeste	60 (21,2)	63 (21,0)
Serra	32 (11,3)	29 (9,7)
Sul	34 (12,0)	37 (12,3)
Total	283 (49,0)	300 (51,0)

Legenda: *Regiões: Metropolitana- Porto Alegre; Central- Alegrete, Santa Maria; Sul-Camaquã, Pelotas, Rio Grande; Noroeste- Passo Fundo, Palmeira das Missões, Ijuí, Santo Angelo; Serra-Caxias do Sul, Santa Cruz; MZ: gêmeos monozigóticos; DZ: gêmeos dizigóticos.

No entanto, quando gêmeos MZ e DZ são analisados separadamente, a região Serra apresentou uma tendência a um menor percentual de gêmeos MZ do que as demais ($p=0,063$), conforme pode ser observado na tabela 3 e tabela suplementar 3 (anexo 2).

Tabela 3. Distribuição da procedência das mães de gêmeos MZ e DZ nas diferentes regiões analisadas.

Região	Casos (MZ)	Casos (DZ)
	N (%)	N (%)
Central	18 (15,1)	15 (9,14)
Metropolitana	54 (45,4)	70 (42,7)
Noroeste	21 (17,6)	39 (23,8)
Serra	8 (6,7)	24 (14,6)
Sul	18 (15,1)	16 (9,7)
Total	119 (42,0)	164 (58,0)

Legenda: *Regiões: Metropolitana- Porto Alegre; Central- Alegrete, Santa Maria; Sul- Camaquã, Pelotas, Rio Grande; Noroeste- Passo Fundo, Palmeira das Missões, Ijuí, Santo Angelo; Serra- Caxias do Sul, Santa Cruz; MZ: gêmeos monozigóticos; DZ: gêmeos dizigóticos;

Figuras representativas dos ensaios de genotipagem estão apresentadas na figura suplementar 9 do anexo 1. A distribuição genotípica e alélica do polimorfismo P72R no gene *TP53* entre casos e controles está apresentada na tabela 4 e tabela suplementar 4 (anexo 2). Não foi observada significância estatística entre as frequências de genótipos e alelos entre os dois grupos ($p=0,371$ e $p=0,183$, respectivamente). Foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, verificando que estas amostras estão em equilíbrio, o que significa que as frequências dos alelos e dos genótipos se encontram constantes ao longo das gerações.

Tabela 4. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene TP53 nos casos (n=283) e controles (n=300).

	Casos (MZ e DZ)	Controles
	N (%)	N (%)
Genótipo		
GG	140 (49,5)	131 (44)
GC	116 (41)	136 (45)
CC	27 (9,5)	33 (11)
Alelo		
G	396 (69,80)	398 (66,3)
C	170 (30,20)	202 (33,7)

No entanto, quando os dados foram analisados em relação à zigosidade, houve uma diferença nas proporções genótípicas ($p=0,027$) e alélicas ($p=0,0122$) entre mães de gêmeos MZ e DZ (tabela 5 e tabela suplementar 5 - anexo 2). O genótipo GG do polimorfismo P72R do gene *TP53* foi encontrado em proporção maior que a esperada nas mães de gêmeos MZ, bem como o alelo C em proporção menor que a esperada na mãe destes indivíduos.

Tabela 5. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene TP53 nas mães de gêmeos monozigóticos (MZ, n=119) e de gêmeos dizigóticos (DZ, n=164).

	Casos (MZ)	Casos (DZ)
	N (%)	N (%)
Genótipo		
GG	70 (59)	70 (43)
GC	40 (33,5)	76 (46)
CC	9 (7,5)	18 (11)
Alelo		
G	180 (75,2)	216 (65,8)
C	58 (24,8)	112 (34,2)

Quando as mães de gêmeos MZ e DZ foram analisadas separadamente em relação aos controles, observou-se uma diferença estatisticamente significativa quanto a frequência do alelo C ($p=0,0198$) nas mães de gêmeos MZ mas não em relação às frequências genotípicas, apesar do valor de p ser marginal ($p=0,056$), conforme mostrado na tabela 6 e tabela suplementar 6 (anexo 2).

Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene TP53 entre casos (MZ e DZ) e controles.

	Casos MZ (%)	Casos DZ (%)	Controles (%)
Genótipo			
GG	70 (59)	70 (43)	131 (43,6)
GC	40 (33,6)	76 (46)	136 (45,4)
CC	9 (7,5)	18 (11)	33 (11)
Alelo			
G	180 (75,2)	216 (65,8)	398 (66,3)
C	58 (24,8)	112 (34,2)	202 (33,7)

7. DISCUSSÃO

Ainda que existam evidências de suscetibilidade familiar para gestações gemelares, os fatores genéticos envolvidos não são conhecidos. Entre os genes candidatos já estudados estão o GDF9 e a BMP15, essenciais para a fertilidade humana normal e que desempenham um papel crucial no crescimento folicular e na taxa de ovulação (HASBARGEN *et al* 2000). Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o alelo C do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene *TP53* era mais frequente em mães de gêmeos do que em mães de não gêmeos (TAGLIANI RIBEIRO *et al.*, 2012).

O presente estudo buscou correlacionar a frequência deste polimorfismo com a prevalência de nascimentos gemelares nas diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul em uma amostra de base populacional. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre mães de gêmeos e mães de não gêmeos, assim como entre mães de gêmeos MZ e DZ. Além disso, os dados foram avaliados separadamente de acordo com a região de encaminhamento das amostras.

Os resultados encontrados não mostraram diferença nas frequências alélicas ou genotípicas entre mães de gêmeos e de não gêmeos. No entanto, foi observada uma menor frequência do alelo C nas mães de gêmeos MZ quando comparado às mães de gêmeos DZ. É possível que a diferença encontrada no estudo anterior em relação a mães de não gêmeos fosse devida a uma proporção maior de mães de gêmeos DZ, algo que não foi possível avaliar, uma vez que naquele trabalho não foi coletado material dos gêmeos para determinação de zigosidade. Outra possibilidade é que os dados de

Tagliani-Ribeiro e colaboradores (2012) refletem um efeito fundador na cidade de Candido Godói, que não possa ser generalizável para outras regiões do RS (TAGLIANI RIBEIRO *et al.*, 2012).

Este é, até o momento, o segundo estudo a avaliar o papel de *TP53* na gestação gemelar. Embora haja uma vasta lista de publicações a respeito de *TP53* e sua relação com a supressão tumoral, poucos estudos associam este gene a um possível papel na fertilidade ou gestação gemelar. A proteína p53 é codificada por um gene supressor de tumor, que desempenha um papel crucial na preservação da integridade do genoma. Mutações em *TP53* ou inativação de parte do seu circuito regulador ocorre em quase todos os tipos de câncer (LEVINE *et al.*, 2006). A proteína p53 é um fator de transcrição de ligação específica da sequência de DNA que é mantida a um nível baixo em células em circunstâncias normais. Vários sinais de estresse tais como danos no DNA, podem estabilizar e ativar p53. Após a ativação, p53 liga-se à porção reguladora de genes alvo e modula sua transcrição, iniciando programas celulares que representam a maior parte das suas funções como supressor de tumor. (LEVINE *et al.*, 2006).

As proteínas da família p53 consistem em três fatores de transcrição: p53, p63 e p73. Estas proteínas têm uma organização de domínio muito semelhante, todas com funções de supressão de tumor. Além disso, p63 é essencial para a morfogênese epidérmica e desenvolvimento dos membros, enquanto p73 está envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central e do sistema imunitário (HU *et al.*, 2007).

Estudos recentes em ratos e seres humanos têm demonstrado que as proteínas da família p53 desempenham um papel importante na regulação da reprodução, incluindo a

manutenção primordial e primária do tamanho *pool* folicular, integridade genômica das células germinativas, desenvolvimento pré-implantação e a implantação embrionária. Portanto a regulação da reprodução parece ser uma função evolutivamente conservada e importante da família das proteínas p53 (HU *et al.*, 2007).

A proteína p53 também parece desempenhar um papel importante na implantação de blastocistos e na reprodução materna por meio da regulação do fator inibidor de leucemia (LIF) em camundongos (HU *et al.*, 2007). LIF é uma das citocinas mais importantes na implantação. Em muitas espécies de mamíferos, incluindo os camundongos e humanos, o aumento transitório da expressão de LIF uterino é coincidente com o início da implantação. Camundongos *Lif*^{-/-} têm um defeito na reprodução materna atribuível à falha de implantação (CHEN, 2015). Por outro lado, camundongos *Tp53*^{-/-} apresentam falha de implantação pela diminuição dos níveis de LIF. A injeção de LIF exógeno nesses animais melhora significativamente a implantação e é capaz de resgatar a capacidade reprodutiva. Cogita-se que *TP53* possa ter um papel importante como causa de infertilidade humana (HU *et al.*, 2007). Uma das variantes de *TP53* mais comumente estudadas é o polimorfismo rs1042522, que leva à substituição de uma Citosina (C) por uma Guanina (G) e à troca de uma Prolina (P) por uma Arginina (R) na posição 72 (P72R). Estudos em primatas não-humanos indicam que o alelo ancestral é a Prolina (alelo C), ainda que em algumas populações Arginina (alelo G) ocorra em frequências maiores que 50% em algumas populações (WHIBLEY *et al.*, 2009). Esta alteração está associada com diferenças funcionais da proteína, uma vez que a variante P72 é mais eficiente na iniciação da senescência e parada do ciclo celular, enquanto que a variante R72 é mais ativa na indução de apoptose e supressão de transformação celular (DUMONT *et al.*, 2003).

No trabalho de Kang e colaboradores (2009), o impacto do códon 72 do SNP p53 na implantação e gravidez após fertilização *in vitro* foi investigado em pacientes com infertilidade. Em pacientes jovens com idade inferior a 35 anos, P72 (alelo C) parece ser um fator de risco para falha de implantação. A taxa de implantação é significativamente mais baixa nos pacientes homozigóticos para o P72 (19%) em comparação com pacientes portadores de pelo menos um alelo R72 (42%) ($p= 0,0028$), o que, por sua vez, leva a uma taxa de gravidez clínica significativamente menor nestas pacientes (KANG *et al.*, 2009). A forte associação de P72 com a diminuição da fertilidade e implantação em pacientes jovens sugere que p53 regula a fertilidade humana. Estes achados corroboram com os resultados do nosso estudo, já que o alelo C não parece influenciar o nascimento de gêmeos MZ ou DZ.

De acordo com dados da Holanda de 1996, cerca de 1% das mulheres grávidas de gêmeos tinham idade inferior a 25 anos, enquanto mais de 2% dos nascimentos em mulheres com mais de 35 anos foram gestações gemelares indicando a forte relação entre a idade e a gemelaridade (LITTLE, 2011). Embora haja alguma discordância quanto ao impacto da idade materna sobre a taxa de gemelaridade MZ, tem sido relatado um aumento de 12-22% na geminação MZ em mulheres com idade superior a 35 anos em comparação com as mulheres mais jovens do que 25 anos, enquanto a paridade tem sido demonstrada que têm pouco ou nenhum efeito. Por outro lado, uma revisão epidemiológica de um número maior de estudos concluiu que a taxa de gemelaridade MZ não é afetada pela idade materna (ASTON *et al.*, 2008). De outro modo, sabe-se que a idade materna maior está relacionada a um aumento da taxa de nascimento de gêmeos DZ (LAMBALK *et al.*, 1998). Como as mulheres envelhecem,

elas têm uma maior incidência de liberar mais de um óvulo aumentando suas chances de gêmeos DZ, e a paridade também parece influenciar a taxa de gêmeos (LITTLE, 2011).

No presente estudo não observamos uma relação entre idade materna e gemelaridade, já que a média de idade de mães de gêmeos e não gêmeos foi respectivamente de 26,4 e 24,5 anos. Mesmo quando comparando mães de gêmeos MZ e DZ não houve diferença. Um dos fatores que pode influenciar este resultado é o tipo de amostra, composta por mulheres que buscam investigação de paternidade. Esta amostra é composta predominantemente por mulheres jovens, que engravidaram de forma não planejada, o que pode confundir os resultados referentes à idade materna e gemelaridade.

Este é um fator importante que deve ser ressaltado em relação a este trabalho: em princípio, a amostra não apresenta influência em relação ao uso de tratamentos para fertilidade, que poderia alterar os resultados. O aumento da prevalência de nascimentos gemelares observada no RS pode ser devido ao aumento dos casos de inseminação artificial, ainda que esses dados não sejam de fácil obtenção. Por outro lado, a taxa relativamente estável de nascimentos gemelares ao longo de 7 anos observada neste estudo corrobora a hipótese de que esse grupo de indivíduos não está sendo influenciado por questões externas que possam interferir na gemelaridade.

Cabe ressaltar que o número de nascimentos gemelares encontrados neste estudo (283) corresponde a apenas 0,9% de todos os casos de investigação de paternidade avaliados pelo LIP/FEPPS. Uma vez que a incidência de gemelaridade no estado do RS é estimada em 2% segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

do Brasil (DATASUS, 2015), seria de se esperar que entre as 32.661 amostras analisadas, cerca de 653 fossem de gemelares. No entanto, o número encontrado é quase a metade desse valor. Uma vez que não há porque imaginar que mães de gêmeos busquem os serviços de identificação de paternidade gratuitos em uma proporção diferente de mães de não gêmeos, podemos inferir que esse percentual de nascimentos gemelares é mais próximo do valor real, sem influência de técnicas de fertilização assistida. Uma maneira de comprovar essa hipótese seria avaliar o percentual de nascimentos gemelares antes da introdução das técnicas de fertilização *in vitro*. No entanto, o dado mais antigo disponível no DATASUS é de 1994 e indica uma proporção de 1,77% de nascimentos gemelares no RS.

Ainda neste sentido, é preciso ressaltar que parece haver um excesso de gêmeos MZ em nossa amostra. As explicações para este fato não são conhecidas, até porque pouco se sabe sobre os mecanismos ou fatores de risco envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial que dão origem a gêmeos MZ. Agregação familiar de MZ é rara em seres humanos. Sua causa pode estar relacionada com um único gene, possivelmente associado a anomalias hereditárias da zona pelúcida ou de conexões célula-a-célula que iria permitir que as células se separassem antes da implantação e placentação (HALL, 1996). No geral, gestações gemelares MZ representam aproximadamente 30% de todas as gestações gemelares concebidas naturalmente (ASTON.,et al 2008). No presente estudo, os nascimentos gemelares corresponderam a quase 42% da amostra (119/283). Entre os fatores que podem contribuir para explicar este achado, está o fato de que poucos estudos fazem análise molecular de zigosidade, que é mais fidedigna do que outros tipos de inferência sobre a zigosidade, como tipo de placentação.

Por fim, não encontramos diferenças significativas no percentual de nascimentos gemelares entre as diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Mesmo a região noroeste, da qual faz parte o município de Candido Godói, não apresenta uma concentração maior de nascimentos gemelares. Sendo assim, não foi possível buscar uma relação da proporção de nascimentos gemelares com algum grupo étnico característico das diferentes regiões do estado do RS.

8. CONCLUSÕES

A presença do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene *TP53* foi determinada em 283 mães de gêmeos e 300 mães de não gêmeos que buscaram o serviço gratuito de determinação de paternidade no LIP/FEPPS entre os anos de 2007 e 2013. Não houveram diferenças significativas nas frequências alélicas ou genotípicas entre os dois grupos.

Os nascimentos gemelares constituíram 0,9% das investigações de paternidade analisadas no período. A sua procedência pode ser distribuída em cinco regiões do estado e não houve diferença na proporção de casos enviados por cada uma das regiões nem quando gêmeos monozigóticos e dizigóticos foram comparados.

O percentual de gêmeos monozigóticos foi de 42%, mais alto do que os 30% estimados na literatura.

A frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs1042522 (P72R) do gene *TP53* apresentou diferenças entre mães de gêmeos monozigóticos e dizigóticos. As mães de gêmeos monozigóticos possuem uma proporção menor do alelo C do que o esperado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HENDY, A *et al.* Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. **Lancet**, v. 356, n. 9233, p. 914, 2000.

ASTON, K. I.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D. T. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 136, n. 4, p. 377–86, 2008.

BAOR, L.; BLICKSTEIN, I. En Route to an “ Instant Family”: Psychosocial Considerations. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 32, p. 127–139, 2005.

BENIRSCHKE, K.; KIM, C. K. Multiple pregnancy. 2. **The New England journal of medicine**, v. 288, n. 25, p. 1329–36, 21 jun. 1973.

BENUTE, G. R. G. *et al.* Twin Pregnancies : Evaluation of Major Depression , Stress , and Social Support. **Twin research and human genetics**, p. 1–5, 2013.

BORTOLUS, R. *et al.* The epidemiology of multiple births. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 5, n. 2, p. 179–187, 1999.

CHAUHAN, S. P. *et al.* Twins : prevalence , problems , and preterm births. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 203, n. 4, p. 305–315, 2010.

CHEN, J. R. *et al.* Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus Subsequent Embryogenesis *. v. 141, n. 12, p. 4365–4372, 2000.

COLLETO, G. M. D. D.; SEGRE C.A.M.; BEIGUELMAN, B. *et al.* Original Article Twinning rate in a sample from a Brazilian hospital with a high standard of reproductive care. **São Paulo Medical Journal**, v. 119, n. 6, p. 216–219, 2001.

COLLETO, G. M. D. D.; PAULO, S. Twinning rate trend in a population sample from the city of São Paulo , Brazil. v. 248, p. 245–248, 2003.

DUMONT, P. *et al.* The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 357–365, 2003.

FIENI S, GRAMELLINI D, PIANTELLI G, VERROTTI C, C. D. Twin-twin transfusion syndrome: a review of treatment option. **Acta Biomed**, v. 75, 2004.

GALTON, F. The History of Twins , As A Criterion Of The Relative Powers of Nature And Nurture 1 , 2. **International Journal of Epidemiology**, p. 905–911, 2012.

GLEICHER, N.; BARAD, D.; S, M. Twin pregnancy , contrary to consensus , is a desirable outcome in infertility. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 6, p. 2426–2431, 2009.

HALL, J. G. Twins and Twinning. **American Journal of Medical Genetics**, v. 204, p. 202–204, 1996.

- HALL, J. G. Twinning. **The Lancet**, v. 362, p. 735–743, 2003.
- HANKINS, G. V. D.; SAADE, G. R. Factors influencing twins and zygosity. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 19, p. 8–9, 2005.
- HASBARGEN, U.; LOHSE, P.; THALER, C. J. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C → T mutation. **Human Reproduction**, v. 15, n. 12, p. 2659–2662, 2000.
- HOEKSTRA, C. *et al.* Dizygotic twinning. v. 14, n. 1, p. 37–47, 2008.
- HU, W. *et al.* p53 regulates maternal reproduction through LIF. **Nature**, v. 450, n. November, p. 2–6, 2007.
- HUNTER, M. G. *et al.* Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 461–77, jul. 2004.
- HUR, Y.; CRAIG, J. M. Guest Editorial Twin Registries Worldwide: An Important Resource for Scientific Research. **Twin research and human genetics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2013.
- KANG, H. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. **PNAS**, v. 106, n. 24, 2009.
- LAMBALK, C. B. *et al.* Increased Levels and Pulsatility of Follicle-Stimulating Hormone in Mothers of Hereditary Dizygotic Twins. **Journal of Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 83, n. 2, p. 481–486, 2015.
- LAMBALK, C. B.; DE KONING, C. H.; BRAAT, D. D. M. The endocrinology of dizygotic twinning in the human. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 97–102, 1998.
- LEVINE, A. *et al.* Coordination and communication between the p53 and IGF-I-AKT-TOR signal transduction pathways. **Genes & Development**, n. 609, p. 267–275, 2006.
- LEWIS, C. M.; HEALEY, S. C.; MARTIN, N. G. Genetic Contribution to DZ Twinning. **American Journal of Medical Genetics**, v. 246, 1996.
- LITTLE, C. M. Genetics and Twins. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 11, n. 4, p. 185–189, 2011.
- MOORE, R. K.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 8, 2004.
- NEWTON, C. R. *et al.* Factors affecting patients attitudes toward single- and multiple-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 2, p. 269–278, 2007.

OHM, K.; DEROM, C. Data collection on multiple births — establishing twin registers and determining zygosity. **Early Human Development**, 2006.

RAO, A.; DEROM, C. Obstetric complications of twin pregnancies. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, n. 4, p. 557–576, 2004.

ROCA DE BES M, MALDONADO JG, M. J. Psychosocial risks associated with multiple births resulting from assisted reproduction : a Spanish sample. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 1059–1066, 2009.

SMITS, J.; MONDEN, C. Twinning across the Developing World. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 8–10, 2011.

SOBEK A. JR, *et al.* High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information , but not to assisted reproduction technology itself. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 3, p. 1–5, 2015.

TAGLIANI RIBEIRO, A. *et al.* High twinning rate in Candido God??i: A new role for p53 in human fertility. **Human Reproduction**, v. 27, n. 9, p. 2866–2871, 2012.

TONG, S.; SHORT, R. V. Dizygotic twinning as a measure of human fertility. **Human Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 95–98, 1998.

WEBER, M. A.; SEBIRE, N. J. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Genetics and developmental pathology of twinning. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 313–318, 2010.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D. P.; HOLLSTEIN, M. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 2, p. 95–107, 2009.

WHITE, C.; WYSHAK, G. Inheritance in Human Dizygotic Twinning. **New England Journal of Medicine**, v. 271, n. 19, p. 1003–1005, 5 nov. 1964.

ANEXO 1 – FIGURAS DA ANÁLISE MOLECULAR

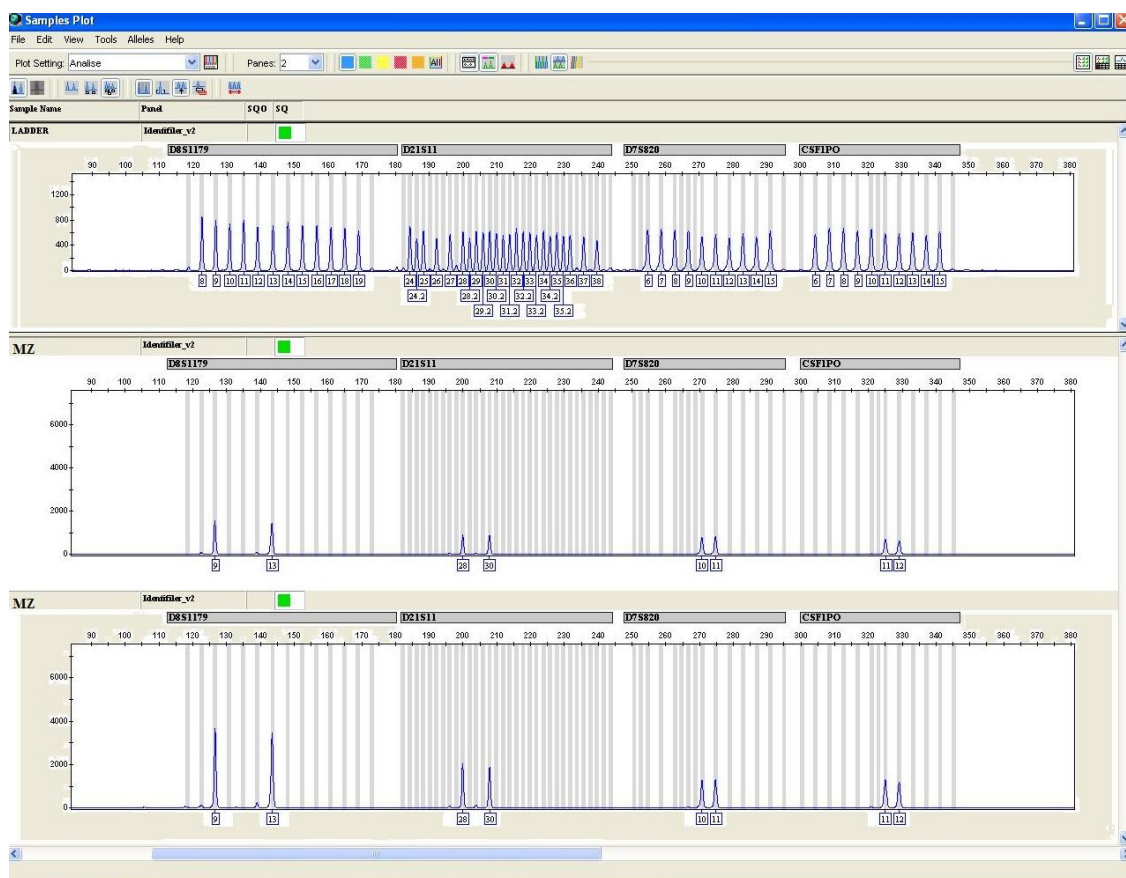


Figura Suplementar 1. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D811S79, D21S11, D7S820, CSF1PO. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a concordância dos alelos em todos os marcadores entre os indivíduos.

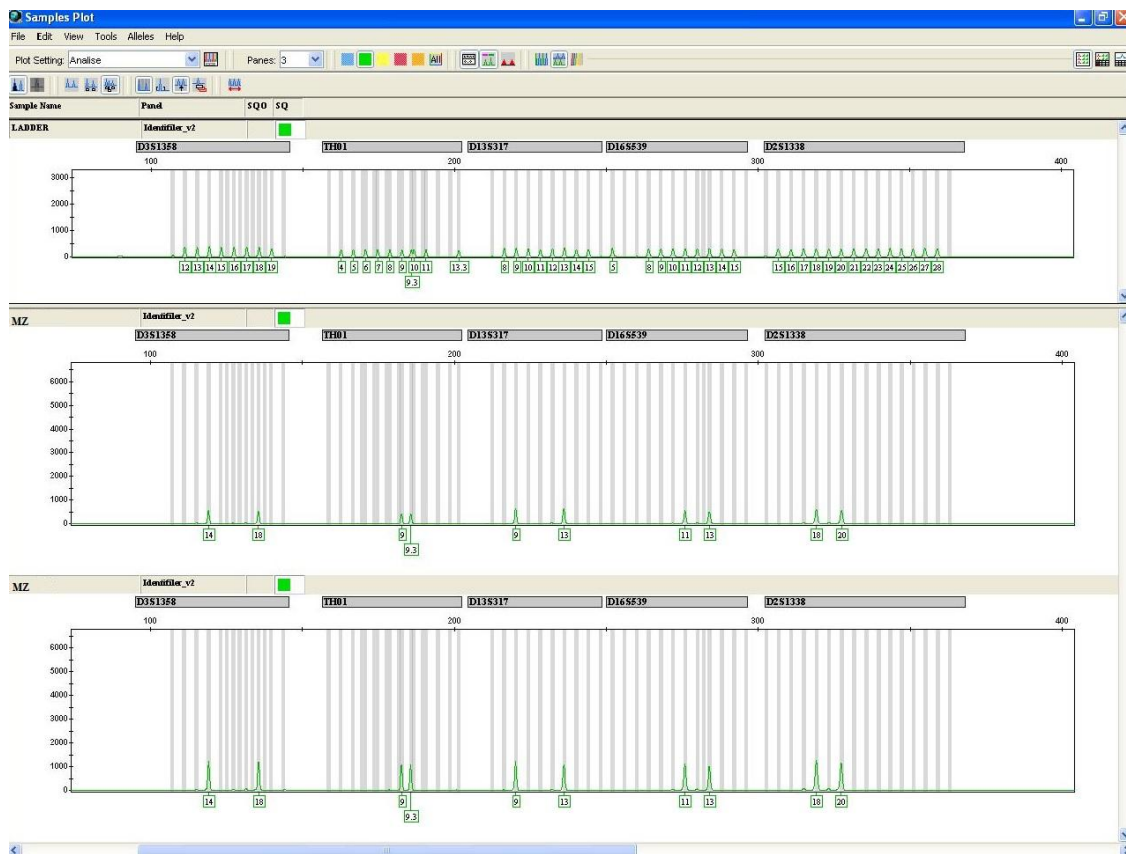


Figura Suplementar 2. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a concordância dos alelos em todos os marcadores entre os indivíduos.

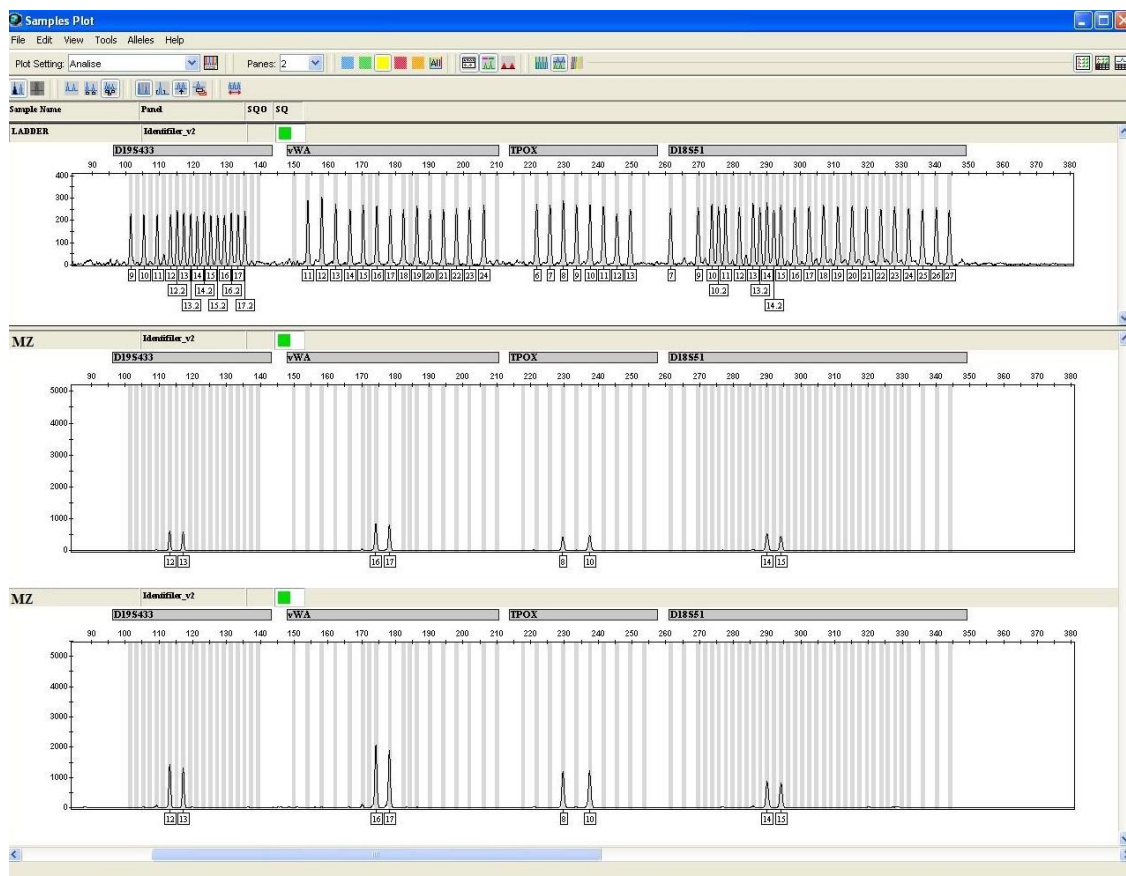


Figura Suplementar 3. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores D19S433, vWA, TPOX, D18S51. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a concordância dos alelos em todos os marcadores entre os indivíduos.

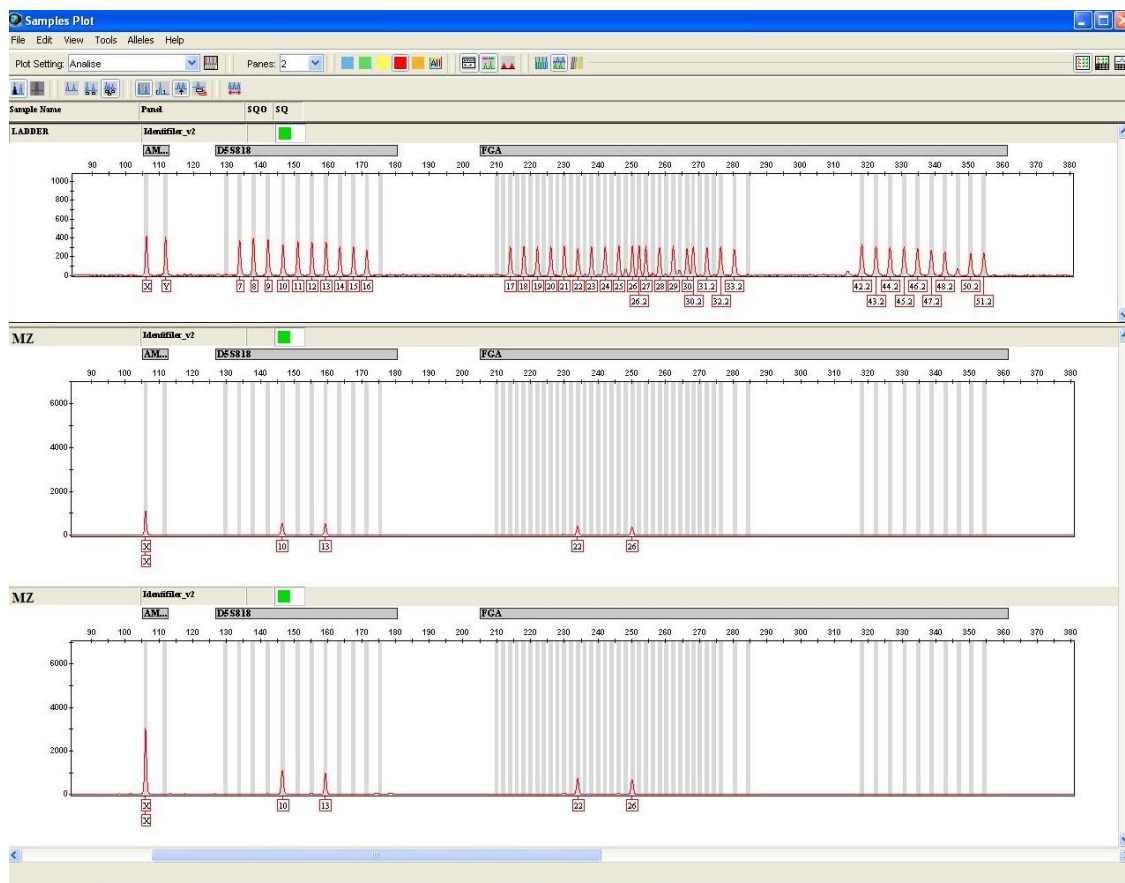


Figura Suplementar 4. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos monozigóticos para os marcadores Amelogenina, D5S818, FGA. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a concordância dos alelos em todos os marcadores entre os indivíduos.

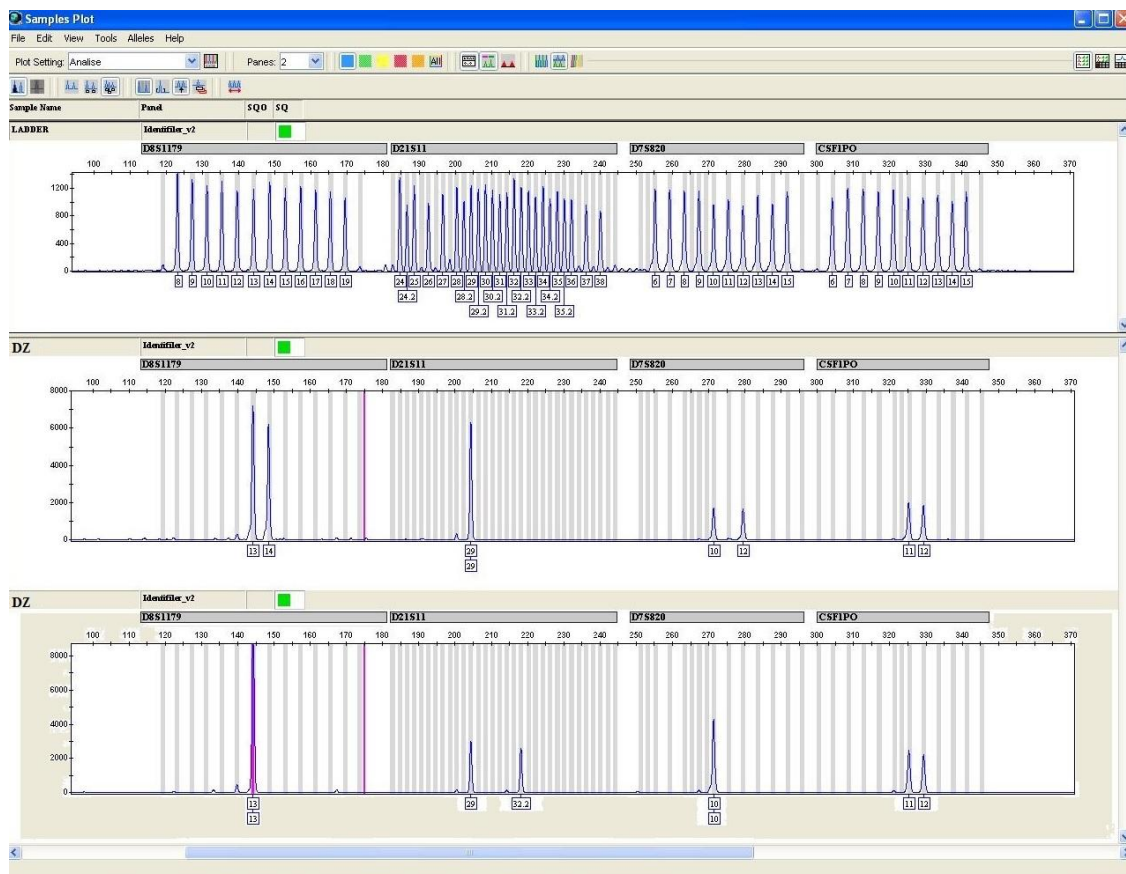


Figura Suplementar 5. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D811S79, D21S11, D7S820, CSF1PO. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a discordância dos alelos para os marcadores D811S79, D21S11, D7S820 entre os indivíduos.

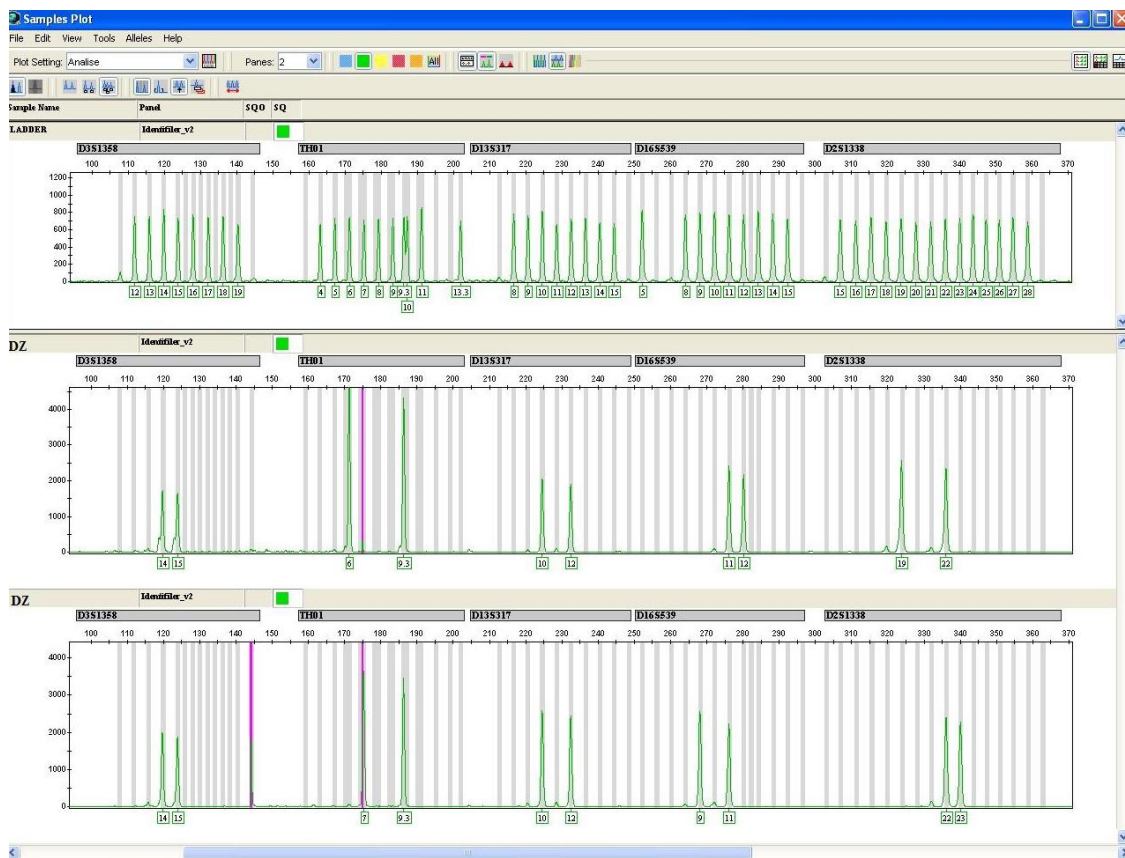


Figura Suplementar 6. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a discordância dos alelos para os marcadores TH01, D16S539, D2S1338 entre os indivíduos.

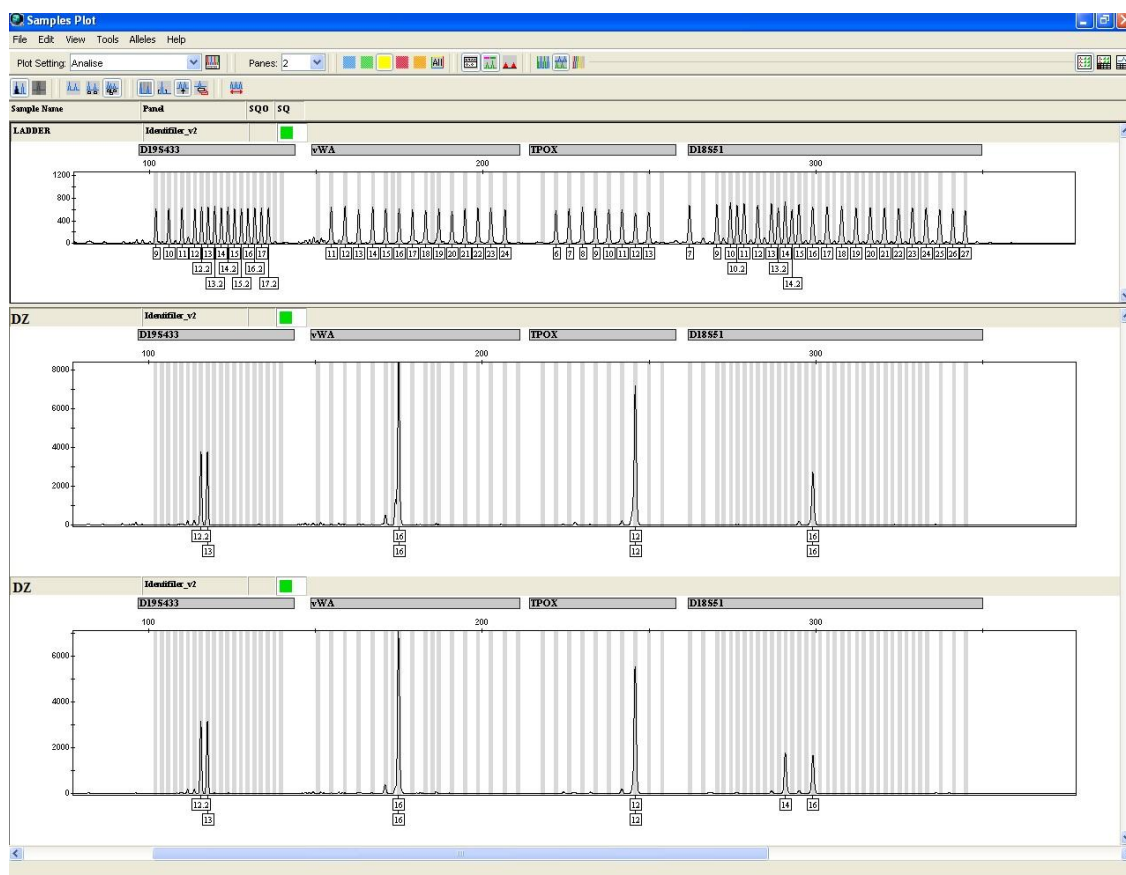


Figura Suplementar 7. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores D19S433, vWA, TPOX, D18S51. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Observa-se a discordância dos alelos para o marcador D18S51 entre os indivíduos.

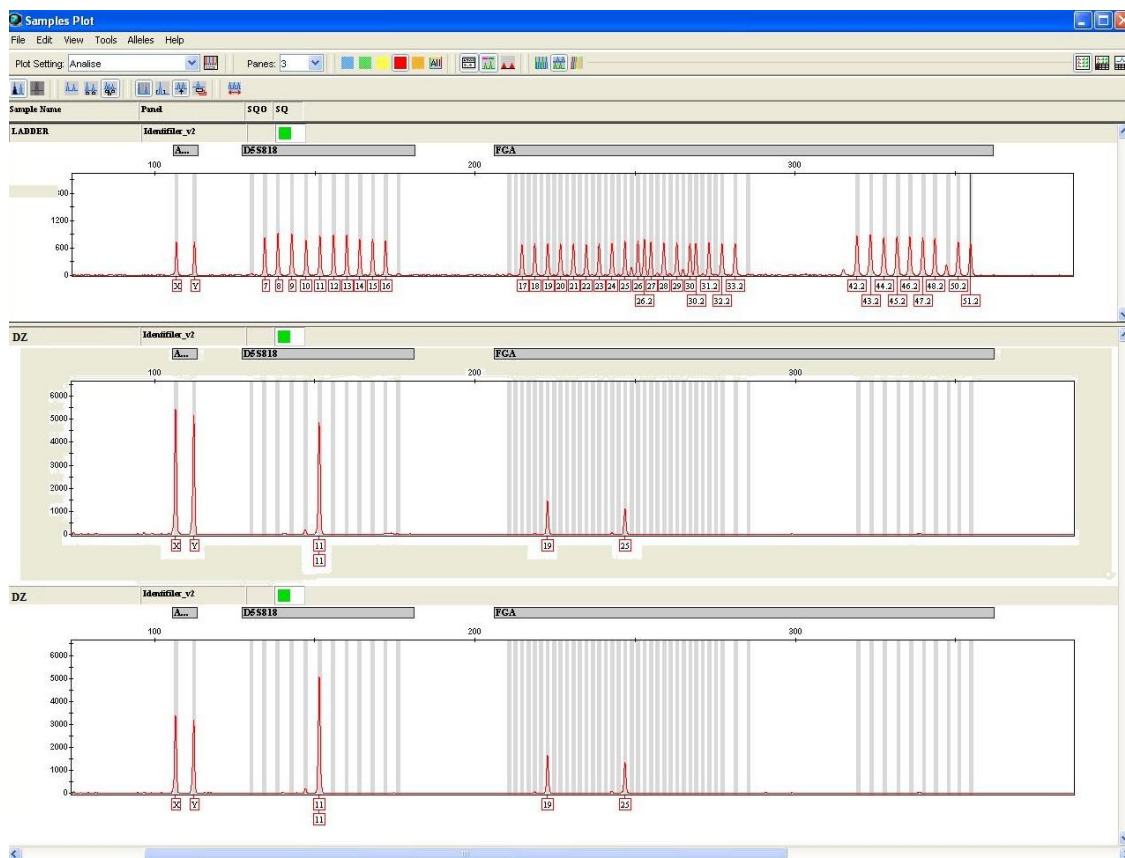
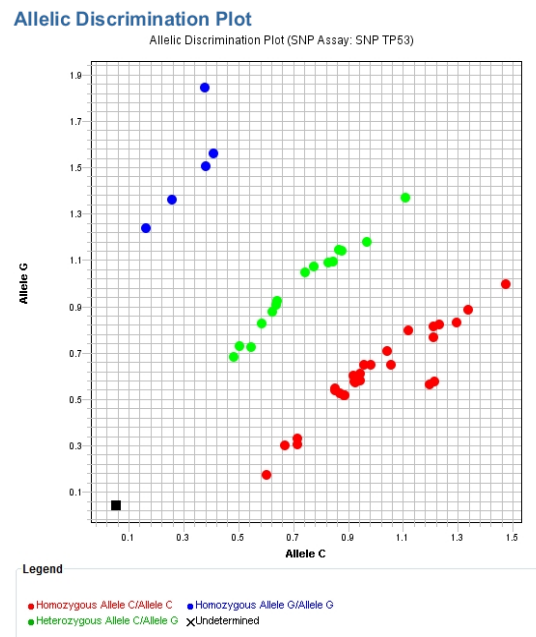


Figura Suplementar 8. Figura representativa da análise de dois indivíduos gêmeos dizigóticos para os marcadores Amelogenina, D5S818, FGA. A primeira linha mostra a escada alélica para todos os marcadores. A segunda e a terceira linha são os resultados individuais para cada marcador. Nestes marcadores não houve discordância dos alelos entre os indivíduos.

A)



B)

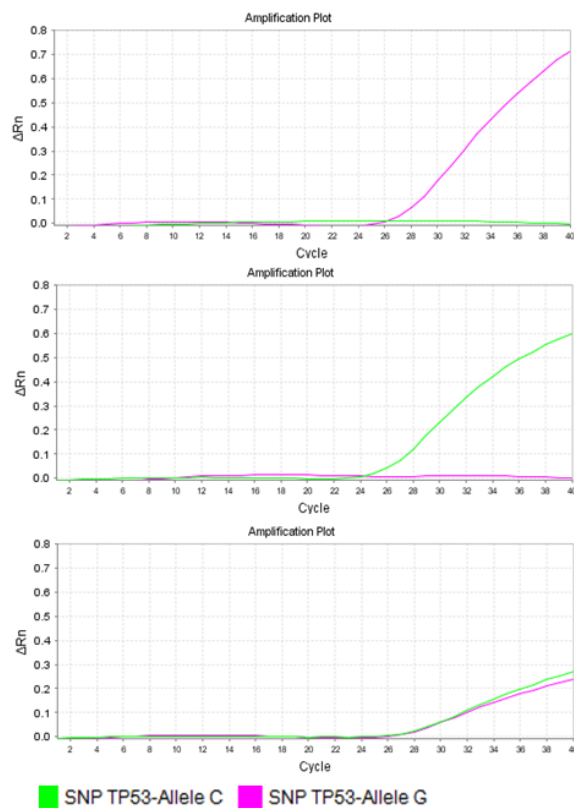


Figura Suplementar 9. Resultados da genotipagem por TaqMan. Em A observa-se a discriminação alélica dos grupos homozigotos CC (vermelho), homozigotos GG (azul) e heterozigotos CG (verde) para o polimorfismo rs1042522. Em B observa-se a curva de amplificação dos três grupos.

ANEXO 2 – TABELAS DE CÁLCULO

Tabelas suplementares aos resultados.

Tabela Suplementar 1. Número total de nascimentos gemelares (gestação dupla) no Rio Grande do Sul durante o período de 2007 a 2013.

Ano	Nascimento gêmeos (n)
2007	2684
2008	2931
2009	2696
2010	2775
2011	3227
2012	3076
2013	3254

Tabela Suplementar 2. Regiões do RS e associação entre mãe de gêmeos (casos) e mãe de não gêmeos (controle).

Regiões do RS	Caso	Controle
Central	33(36.89) [0.41]	43(39.11) [0.39]
Metropolitana	124(122.33) [0.02]	128(129.67) [0.02]
Noroeste	60(59.71) [0.00]	63(63.29) [0.00]
Serra	32(29.61) [0.19]	29(31.39) [0.18]
Sul	34(34.46) [0.01]	37(36.54) [0.01]

$p=0.0872$ () esperado [] qui-quadrado

Tabela Suplementar 3. Distribuição da procedência de gêmeos MZ e DZ nas diferentes regiões analisadas.

Regiões do RS	MZ	DZ
Central	18 (13.88) [1.23]	15 (19.12) [0.89]
Metropolitana	54 (52.14) [0.07]	70 (71.86) [0.05]
Noroeste	21 (25.23) [0.71]	39 (34.77) [0.51]
Serra	8 (13.46) [2.21]	24 (18.54) [1.61]
Sul	18 (14.30) [0.96]	16 (19.70) [0.70]

$p=0.063$ () esperado [] qui-quadrado

Tabela Suplementar 4. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene *TP53* entre casos e controles.

	Casos	Controles
Genótipo*		
GG	140(131.55) [0.54]	131(139.45) [0.51]
GC	116(122.33) [0.33]	136(129.67) [0.31]
CC	27(29.13) [0.16]	33(30.87) [0.15]
Alelo[#]		
G	396(385.42) [0.29]	398(408.58) [0.27]
C	170(180.58) [0.62]	202(191.42) (0.58)

$p^* = 0.371$; $p^\# = 0.183$ () esperado [] qui-quadrado

Tabela Suplementar 5. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene *TP53* entre casos (MZ e DZ).

Genótipo*	Casos (mães de gêmeos)	
	MZ	DZ
GG	70(58.87) [2.10]	70(81.13) [1.53]
GC	40(48.78) [1.58]	76(67.22) [1.15]
CC	9(11.35) [0.49]	18(15.65) [0.35]
Alelo[#]		
G	180(166.52) [1.09]	216(229.48) [0.79]
C	58(71.48) [2.54]	112(98.52) [1.85]

$p^* = 0.027$; $p^\# = 0.0122$ () esperado [] qui-quadrado


Tabela Suplementar 6. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo P72R do gene *TP53* entre casos (MZ e DZ) e controles.

	MZ	DZ	CONTROLE
Genótipo*			
GG	70(55.32) [3.90]	70(76.23) [0.51]	131(139.45) [0.51]
GC	40(51.44) [2.54]	76(70.89) [0.37]	136(129.67) [0.31]
CC	9(12.25) [0.86]	18(16.88) [0.07]	33(30.87) [0.15]
Alelo[#]			
G	180(162.07) [1.98]	216(223.36) [0.24]	398(408.58) [0.27]
C	58(75.93) [4.23]	112(104.64) [0.52]	202(191.42) [0.58]

$p^* = 0.056$; $p^\# = 0.0198$ () esperado [] qui-quadrado

ANEXO 3 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 130542
Data da Versão do Projeto:


Pesquisadores:
URSULA DA SILVEIRA MATTE
ANA CAROLINA MARDINI

Título: Influência de Fatores Genéticos em Nascimento Gemelares no Rio Grande do Sul: um estudo de base populacional.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 26 de dezembro de 2013.



Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA

ANEXO 4 - ARTIGO EM PORTUGUÊS

Análise do polimorfismo rs1042522 (p.P72R) do gene *TP53* com nascimentos gemelares em uma da população do Rio Grande do Sul

Mardini AC^{1,2}, Pereira FS³, Schuler-Faccini L^{1,4}, Matte U^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ² Laboratório de Investigação de Paternidade, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde; ³Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ⁴Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Resumo

Embora o nascimento de gêmeos tenha sempre chamado atenção, não há fatores genéticos ou ambientais conhecidos que podem determinar o nascimento de monozigóticos gêmeos (MZ). E mesmo para gêmeos dizigóticos (DZ), influências genéticas não são completamente compreendidas. Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que o alelo C do polimorfismo rs1042522 no gene *TP53* foi mais frequente nas mães de gêmeos do que nas mães de gestação única em uma pequena cidade no sul do Brasil. A fim de esclarecer se este foi um fator isolado, foi realizado um estudo observacional de caso-controle de base populacional. As amostras foram selecionadas a partir de um programa de investigação de paternidade financiado pelo estado do Rio grande do Sul. As amostras foram consideradas casos em que duas das crianças tinham a mesma data de nascimento e os controles eram de amostras em que pelo menos dois

filhos nasceram em datas diferentes. O método de escolha dos controles foi sequencial, sendo utilizados os primeiros que preenchessem esta condição a cada ano.

De 2007 a 2013, 32.661 registros foram pesquisados e 283 (0,9%) gêmeos foram encontrados (119 MZ e 164 DZ). Frequências alélicas e genótípicas e não foram diferentes entre as mães de gêmeos ou mães de não gêmeos. No entanto, as mães de gêmeos MZ apresentaram uma maior frequência do genótipo GG e menor frequência do alelo C quando comparado com as mães de gêmeos DZ. Além disso, a proporção de gêmeos monozigóticos (42%) é maior do que normalmente relatado (30%). Finalmente, a proporção de gêmeos encontrados neste estudo parece ser mais realista, já que esta amostra não é supostamente usuário de técnicas de reprodução assistida.

Introdução

Apesar de os gêmeos sempre terem despertado grande curiosidade, não se conhecem influências ambientais ou genéticas capazes de determinar o nascimento de gêmeos monozigóticos (MZ) e, mesmo para gêmeos dizigóticos (DZ), as influências genéticas não são totalmente conhecidas (Hall, 2003). Para gêmeos DZ, fatores hereditários são sugeridos pela maior prevalência em mulheres cuja mãe ou irmã tiveram gêmeos dizigóticos. Para uma mãe com um irmão gêmeo dizigótico, a probabilidade de ela gerar gêmeos dizigóticos é de 1 em 58. Em comparação, se o pai tiver um irmão gêmeo dizigóticos, essa frequência é de 1 em 116 (White & Wyshak, 1964). No entanto, a base genética para geminação de dizigóticos ainda está por ser mapeado em humanos, e não está claro se esta é uma herança dominante ou recessiva (Hoekstra et al.,2008). Já a incidência de MZ parece ser independente da raça, idade, paridade e estado nutricional (Tong & Short, 1998).

Em várias regiões do mundo tem sido observado um aumento na incidência de gêmeos DZ, relacionado principalmente ao uso de técnicas de fertilização assistida e ao efeito residual do uso prolongado de anticoncepcionais orais (HALL, 1996). Nos Estados Unidos a taxa de nascimentos gemelares aumentou 75% nas últimas 3 décadas, com nascimentos múltiplos chegando a 3% a 4% de todos os nascimentos. Na Europa, a taxa média de gemelaridade em 2003 foi de 16,4/1000 nascimentos, com ampla variação entre os países, (Hall, 1996; Chauhan et al., 2010). No Brasil dados de 1995 a 1998 mostraram taxa de 19,51/1000 nascimentos de DZ. Já a taxa de nascimento de gêmeos MZ foi de 4,5/1000, semelhante à encontrada anteriormente no Brasil onde a média era de 4,1/1000 (COLLETTO et al., 2001) e ao restante do mundo (MACFARLANE & BLONDEL., 2003).

No Rio Grande do Sul, na cidade de Candido Gódoi, foi descrita uma população com taxa de nascimentos gemelares muito acima das relatadas na literatura, chegando a 15/1000 nascimentos. Estudos epidemiológicos nesta população sugerem a existência de um efeito fundador (15). A análise genética dos genes *TP53* e seus reguladores (*MDM2*, *MDM4* e *HAUSP*), demonstraram uma associação entre o polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* e gemelaridade nesta população (Tagliani Ribeiro et al., 2012). Este fator potencialmente está associado ao nascimento de gêmeos MZ e DZ nesta população. Entretanto, não existem estudos sobre a associação deste polimorfismo com gemelaridade em outras cidades do Rio Grande do Sul, permanecendo a dúvida sobre ser este um fenômeno isolado ou generalizável.

O Laboratório de Investigação de Paternidade (LIP) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) recebe amostras de indivíduos de baixa renda para investigação de paternidade subsidiada. Em média são realizadas 400 investigações de paternidade por mês, de todas as regiões do Rio Grande do Sul. Esta amostra pode

ser considerada isenta de influências geradas por tratamentos para infertilidade devido ao seu status sócio-econômico. Portanto, estas amostras são úteis para um estudo de base populacional para avaliar se o polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* pode influenciar a frequência de nascimentos gemelares.

Materiais e Métodos

Estudo observacional de casos e controles em uma amostra de base populacional.

Foi utilizado o banco de dados do Laboratório de Investigação de paternidade (LIP) localizado na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) para seleção de casos e controles nos anos de 2007 à 2013. Os casos foram compostos por amostras submetidas a investigação de paternidade em que os filhos eram gemelares, isto é, apresentaram a mesma data de nascimento e em que não houve exclusão de maternidade. Os controles foram compostos por amostras submetidas a investigação de paternidade em que os filhos não eram gemelares, ou seja, não apresentaram a mesma data de nascimento, e em que não houve exclusão de maternidade. Os controles foram obtidos entre as amostras nas quais as mães investigaram a paternidade de mais de um filho na mesma ocasião, preferencialmente da mesma região de procedência que os casos.

Foram avaliadas todas as coletas existentes no LIP/FEPPS coletadas entre 2007 e 2013, totalizando 32661 registros. Desses, foram selecionadas 583 amostras que preenchiam os critérios de inclusão como casos ou controles. De cada caso ou controle foram coletados os seguintes dados: data de nascimento da mãe, cidade de procedência da mãe, data de nascimento dos filhos gêmeos e do primogênito para os controles.

Amostras de sangue das mães, coletadas em papel FTA Classic Card (Whatman) foram utilizadas para extração de DNA com kit comercial (Solução FTA, Whatman), segundo instruções do fabricante.

Foi realizada a determinação da presença do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* nas amostras de DNA de mães de gêmeos e de não gêmeos. A análise do polimorfismo foi feita com ensaio TaqMan C_2403545_10 por PCR em tempo real, conforme descrito por Tagliani-Ribeiro et al., 2012.

Os dados do painel de marcadores genéticos analisados para investigação de paternidade (CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX, VWA e amelogenina) foram utilizados para determinação da zigosidade dos gêmeos de mesmo sexo. Os dados foram por Qui-quadrado utilizando o programa SPSS versão 18.0.

Resultados

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2013, o LIP/FEPPS realizou 32.661 investigações de paternidade. As amostras foram provenientes de doze cidades do Rio Grande do Sul, as quais podem ser agrupadas em cinco regiões (figura 1). Deste total, 283 (0,9%) eram de mães de gêmeos. Outras 300 amostras foram incluídas neste estudo como mães de não gêmeos.

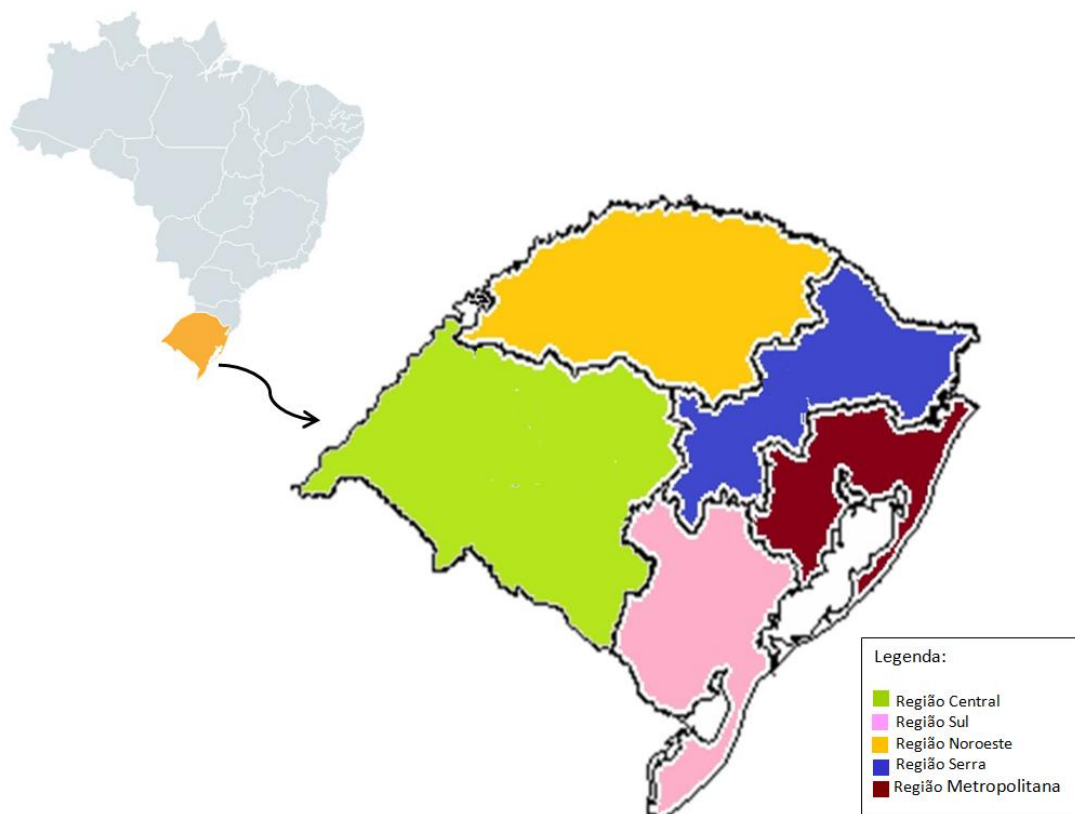


Figura 1. Distribuição das regiões de proveniência das amostras no estado do Rio Grande do Sul (RS). O inserto mostra a localização do RS no Brasil.

Entre os casos, o percentual de gêmeos MZ foi de 42%. Este percentual difere do descrito na literatura que estima que um terço dos casos de nascimentos gemelares sejam MZ ($p=0,04$). A distribuição do local de nascimento dos gêmeos, assim como o percentual de MZ, nas diferentes regiões pode ser observada na tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões em relação ao percentual de nascimentos gemelares ($p=0,744$). No entanto, as regiões Serra e Noroeste apresentaram menor percentual de gêmeos MZ do que as demais ($p=0,0004$), porém com valores mais próximos ao descrito na literatura (30%).

Tabela 1. Distribuição do percentual de gêmeos (MZ e DZ) e de gêmeos MZ nas diferentes regiões analisadas.

Região	Casos (gêmeos)	Gêmeos MZ
	N (%)	N (%)
Metropolitana	124 (43.8)	54 (45.4)
Central	33 (11.7)	18 (15.1)
Serra	32 (11,3)	8 (6.7)*
Noroeste	60 (21.2)	21 (17.6)*
Sul	34 (12,0)	18 (15.1)
Total	283 (48)	119 (42)

* $P=0.0004$

Os dados da análise do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* nas mães de gêmeos e de não gêmeos não demonstrou diferença estatisticamente significativa tanto em relação às frequências genotípicas (tabela 2, $p=0,371$) quanto alélicas ($p=0,187$).

Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* nas mães de gêmeos ($n=285$) e de não gêmeos ($n=300$).

Genótipo	Mãe de gêmeos	Mãe de não gêmeos
	N (%)	N (%)
GG	140 (49,5)	131 (44)
GC	116 (41)	136 (45)
CC	27 (9,5)	33 (11)
Alelo		
G	398 (69,80)	398 (66,3)
C	172 (30,20)	202 (33,7)

No entanto, quando os dados foram analisados em relação à zigosidade, houve uma diferença nas proporções genótípicas ($p=0,028$) e alélicas ($p=0,016$) entre mães de gêmeos MZ e DZ (tabela 3), com o genótipo GG sendo encontrado em proporção maior que a esperada nas mães de gêmeos MZ, bem como o alelo C em proporção menor que a esperada na mãe destes indivíduos.

Tabela 3. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* nas mães de gêmeos monozigóticos (MZ, n=119) e de gêmeos dizigóticos (DZ, n=166).

	Mãe de gêmeos MZ	Mãe de gêmeos DZ
	N (%)	N (%)
Genótipo		
GG	70 (59)	70 (43)
GC	40 (33,5)	76 (46)
CC	9 (7,5)	18 (11)
Alelo		
G	182 (75,2)	216 (65,8)
C	60 (24,8)	112 (34,2)

Discussão

Ainda que existam evidências de suscetibilidade familiar para gestações gemelares, os fatores genéticos envolvidos não são conhecidos. Entre os genes candidatos já estudados estão o fator de crescimento de diferenciação-9 (GDF9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP15), essenciais para a fertilidade humana normal e que desempenham um papel crucial no crescimento folicular e taxa de ovulação

(Moore et al., 2004). Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o alelo C do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* era mais frequente em mães de gêmeos do que em mães de não gêmeos (Tagliani-Ribeiro et al., 2012).

No entanto, o presente estudo, realizado em uma amostra de base populacional, não mostrou diferença nas frequências alélicas ou genotípicas entre mães de gêmeos e de não gêmeos. Porém observamos uma maior frequência do alelo C nas mães de gêmeos DZ quando comparado às mães de gêmeos MZ. É possível que a diferença encontrada no estudo anterior fosse devida a uma proporção maior de mães de gêmeos DZ daquela amostra, algo que não foi possível avaliar uma vez que não se coletou material dos gêmeos para determinação de zigosidade. Outra possibilidade é que os dados de Tagliani Ribeiro et al. (2011) reflitam um efeito fundador na cidade de Candido Godói, que não possa ser generalizável para outras regiões do RS.

Este é, até o momento, o segundo estudo a avaliar o papel de *TP53* na gestação gemelar. Apesar de ser reconhecido por sua atividade de supressão tumoral, o gene *TP53* também possui um papel na fertilidade. A proteína p53 é um fator de transcrição que se liga a sequências específicas de DNA, sendo mantida a um nível baixo nas células em circunstâncias normais. Vários sinais de estresse tais como danos ao DNA ativam p53, que então se liga à região reguladora de genes alvo e modula sua transcrição, iniciando programas celulares relacionados a manutenção da estabilidade genômica e supressão tumoral. (Levin et al., 2006). Além disso, as proteínas da família p53 desempenham um papel importante na regulação da reprodução, incluindo a manutenção do *pool* folicular, integridade genômica das células germinativas e desenvolvimento pré-implantação (Hu et al., 2007). Uma das variantes de *TP53* mais comumente estudadas é o polimorfismo rs1042522, que leva à substituição de uma Citosina por uma Guanina e à troca de uma Prolina por uma Arginina na posição 72

(P72R). Estudos em primatas não-humanos indicam que o alelo ancestral é a Prolina (alelo C), ainda que em algumas populações Arginina (alelo G) ocorra em frequências maiores que 50% em algumas populações (Whibley, 2009). Esta alteração está associada com diferenças funcionais da proteína, uma vez que a variante P72 é mais eficiente na iniciação de senescência e parada do ciclo celular, enquanto que a variante R72 é mais ativa na indução de apoptose e supressão de transformação celular (Dumont et al, 2003). Kang e colaboradores (2009), investigaram o impacto desta alteração na implantação e gravidez após fertilização *in vitro* em pacientes com infertilidade. Em pacientes jovens, P72 (alelo C) parece ser um fator de risco para falha de implantação. Estes achados corroboram com os resultados do nosso estudo, já que o alelo C não parece influenciar o nascimento de gêmeos MZ.

Ainda que o aumento de gêmeos MZ não esteja associado a aumento da idade materna (Aston, 2008), parece haver uma associação positiva para o nascimento de gêmeos DZ (Lambalk e colaboradores, 1998). Mesmo quando comparando mães de gêmeos MZ e DZ não houve diferença. Um dos fatores que pode influenciar este resultado é o tipo de amostra, composta por mulheres que buscam investigação de paternidade. Esta amostra é composta predominantemente por mulheres jovens, que engravidaram de forma não planejada, o que pode confundir os resultados referentes à idade materna e gemelaridade, especialmente em relação aos gêmeos DZ.

Ainda neste sentido, é preciso ressaltar que parece haver um excesso de gêmeos MZ em nossa amostra. As explicações para este fato não são conhecidas, até porque pouco se sabe sobre os mecanismos ou fatores de risco envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial que dão origem a gêmeos MZ. Agregação familiar de MZ é rara em seres humanos. Sua causa pode estar relacionada com um único gene, possivelmente associado a anomalias hereditárias da zona pelúcida ou de conexões célula-a-célula que

iria permitir que as células se separassem antes da implantação e placentação (Hall, 1996). No geral, gêmeos monozigóticos representam aproximadamente 30% de todas as gestações gemelares concebidas naturalmente (Aston, 2008). No presente estudo, os nascimentos gemelares corresponderam a quase 42% da amostra (119/283). Entre os fatores que podem contribuir para explicar este achado, está o fato de que poucos estudos fazem análise molecular de zigosidade, que é mais fidedigna do que outros tipos de inferência sobre a zigosidade, como tipo de placenta.

Cabe ressaltar que o número de nascimentos gemelares encontrados neste estudo (283) corresponde a apenas 0,9% de todos os casos de investigação de paternidade avaliados pelo LIP/FEPPS. Uma vez que a incidência de gemelaridade no estado do RS é estimada em 2% (DATASUS, 2015), seria de se esperar que entre as 32.661 amostras analisadas, cerca de 653 fossem de gemelares. No entanto, o número encontrado é quase a metade desse valor. Uma vez que não há porque imaginar que mães de gêmeos busquem os serviços de identificação de paternidade gratuitos em uma proporção diferente de mães de não gêmeos, podemos inferir que esse percentual de nascimentos gemelares é mais próximo do valor real, sem influência de técnicas de fertilização assistida. Uma maneira de comprovar essa hipótese seria avaliando o percentual de nascimentos gemelares antes da introdução das técnicas de fertilização *in vitro*. No entanto, o dado mais antigo disponível no DATASUS é de 1994 e indica uma proporção de 1,77% de nascimentos gemelares no RS.

Os dados obtidos neste estudo são importantes em primeiro lugar por se tratar de uma amostra de base populacional, obtida a partir de um serviço de investigação de paternidade financiado pelo Estado. Logo, espera-se que a população representada não seja influenciada pelo uso de técnicas de fertilização assistida que podem alterar a proporção de nascimentos gemelares, especialmente de DZ. Além disso, este estudo é

um dos poucos a incluir dados de zigosidade obtidos por marcadores moleculares. Infelizmente não foi possível a análise de ancestralidade da amostra, o que também poderia influenciar os resultados já que as frequências alélicas variam nos diferentes grupos étnicos.

Em resumo, o presente estudo investigou a frequência de rs1042522 polimorfismo no gene *TP53* em mães de gêmeos e não gêmeos usando uma amostra populacional de mulheres que procuram investigar a paternidade de seus filhos que é financiada pelo Estado. Frequências genótípicas e alélicas não foram diferentes entre os grupos, mas as mães de gêmeos MZ apresentaram uma maior frequência do genótipo GG e menor frequência do alelo C quando comparado com as mães de gêmeos DZ. Além disso, a proporção de gêmeos monozigóticos parece estar elevada nesta amostra e pode representar um número mais realista nas taxas de geminação.

Referências

- Aston, K. I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2008). Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction*, 136 (4), 377–86.
- Chauhan, S. P., Scardo J.A., Hayes, E., Abuhamad, A.Z., & Berghella, V.(2010). Twins : prevalence, problems, and preterm births. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(4), 305–315..
- Colletto, G. M. D. D., De Mattos Segre, C.A., & Beiguelman, B. (2001). Twinning rate in a sample from a Brazilian hospital with a high standard of reproductive care. *Sao Paulo Med J*, 119(6), 216-219.
- DATASUS (2010). Retrieved October 20, 2015, from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>
- Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra A. C.III., George, D.L., & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*, 33(3), 357–365.
- Hall, J. G. (1996). Twins and Twinning. *American Journal of Medical Genetics*, 204, 202–204.
- Hall, J. G. (2003). Twinning. *The Lancet*, 362,735–743.

- Hoekstra, C., Zhao, Z.Z., Lambalk, C.B., Willemsen, G, Martin, N.G., Boomsma, D.I., et al. (2008). Dizygotic Twinning. *Human Reproduction Update*, 14(1), 37–47.
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A.K., & Levine, A.J. (2007). P53 Regulates Maternal Reproduction Through LIF. *Nature*, 450, 2–6.
- Kang,H., Feng, Z., Sun, Y., Atwal, G., Murphy, M.E., Rebbeck, T.R.,et al. (2009). Single-Nucleotide Polymorphisms in the P53 Pathway Regulate Fertility in Humans. *Pnas*, 106 (24), 9761-9766.
- Lambalk, C. B.; De Koning, C. H.; & Braat, D. D. M.(1998). The Endocrinology of dizygotic twinning in the human. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 145, 97–102.
- Levine, A.J., Feng, Z., Mak, T.W., You, H., & Jin, S. (2006). Coordination and communication between the P53 and Igf-I-Akt-Tor signal transduction pathways. *Genes & Development*, 609, 267–275.
- Macfarlane, A., & Blondel B. (2003). Demographic Trends in Western European Countries. In: *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation, and Perinatal Outcome* (2th eds.).
- Moore, R. K.; Erickson, G. F.; & Shimasaki, S. (2004). Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends In Endocrinology And Metabolism*, 15(8), 356- 361.

Tagliani Ribeiro, A., Paskulin, D.D., Oliveira, M., Zagonel-Oliveira, M., Longo, D., Ramallo, V., et al. (2012). High Twinning Rate In Candido Godói: A New Role for P53 in human fertility. *Human Reproduction*, 27 (9), 2866–2871.

Tong, S.; Short, R. V. Dizygotic Twinning as a measure of human fertility.(1998). *Human Reproduction*, 13(1), 95–98.

Whibley, C.; Pharoah, P. D. P.; Hollstein, M. (2009). P53 Polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 95–107.

White, C.; Wyshak, G. (1964). Inheritance in human dizygotic twinning. *New England Journal Of Medicine*, 271(19), 1003–1005.

Analysis of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene in the mothers of twins and of singletons: a population-based study in Rio Grande do Sul, Brazil

Mardini AC^{1,2}, Pereira FS³, Schuler-Faccini L^{1,4,5}, Matte U^{1,3,5}

¹Postgraduation Program on Adolescent and Child Health and ⁵Postgraduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ² Paternity Investigation Laboratory, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde; ³Molecular Analysis and Protein Unit and ⁴Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abstract

Although the birth of twins has always attracted attention, there are no known genetic or environmental factors that can determine the birth of monozygotic (MZ) twins. And even for dizygotic (DZ) twins, genetic influences are not completely understood. A previous study from our group has shown that the C allele of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene was more frequent in the mothers of twins than in the mothers of singletons in a small village in South Brazil. In order to clarify if this was an isolated factor, we performed a population-based observational case-control study. Samples were selected from a state-funded program of paternity investigation. Samples were considered cases when two of the children had the same date of birth whereas controls were those samples in which at least two children were born in different dates. The first subsequent sample fulfilling control criteria was included after each case. From 2007 to 2013, 32,661 records were searched and 283 (0.9%) twins were found (119 MZ and 166 DZ). Genotypic and allele frequencies were not different

between mothers of twins or mothers of singletons. However, mothers of MZ twins showed a higher frequency of GG genotype and lower frequency of the C allele when compared to mothers of DZ twins. Also, the proportion of MZ twins (42%) is higher than usually reported (30%). Finally, the proportion of twins found in this study seems to be more realistic, as this sample is allegedly not user of assisted reproduction techniques.

Introduction

Although the birth of twins has always attracted attention, there are no known genetic or environmental factors that can determine the birth of monozygotic (MZ) twins. And even for dizygotic (DZ) twins, genetic influences are not completely understood (Hall, 2003). For twins the existence of hereditary factors is suggested by familial aggregation, with a mother that is a DZ twin having a chance of 1 in 58 to give birth to twins herself. If the father is member of a twin pair, then the chance of having twins is 1 in 116 (White & Wyshak, 1964). However, the gene for DZ twinning has yet to be mapped in humans and even the mode of inheritance is not known (Hoekstra et al., 2008). MZ twins, on the other hand, seem to happen by chance only, without influence of ethnicity, maternal age, parity or nutritional state (Tong & Short, 1998).

An increase in the incidence of DZ twins has been observed worldwide, especially due to the use of assisted reproduction and a residual effect of the prolonged use of contraceptives. In the USA the twinning rate has increased over 75% in the last decades, with multiple births reaching 3% to 4% of all births (HALL, 1996). In Europe, twinning rate in 2003 was 16.4 per 1,000 births, with wide variation across countries (Hall, 1996; Chauhan et al., 2010). In Brazil data from 1995 to 1998 show rates of 19.51 per 1,000 births for DZ twins, whereas MZ twinning rate was of 4.5 per 1,000. This

latter number is similar to the 4.1 per 1,000 previously described in the country (Colletto et al., 2001), and to figures reported elsewhere in the world (Macfarlane & Blondel).

In Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil, there is a city called Candido Godói whose population presents a high rate of twinning, estimated in 15 per 1000 births. Epidemiological data suggest a founder effect, dating from the late 19th century. Genetic analysis of *TP53* and its regulators (*MDM2*, *MDM4* and *HAUSP*) showed an association of polymorphism rs1042522 in *TP53* and twinning in this population (Tagliani Ribeiro et al., 2012). However, there is no data on the association of this polymorphism and twinning in other regions, and it is debatable if this is an isolated factor.

The Laboratory of Paternity Investigation (LPI) is a state-based laboratory in Rio Grande do Sul that receives samples from low income individuals for paternity investigation paid by the public defense system. On average, 400 cases from all over the state are analyzed per month. Considering that this population-based sample is presumably free of influences caused by fertility treatments, we decided to study the frequency of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene and its relation to the birth of twins.

Material and Methods

This is a population-based observational case-control study. Samples were selected from the LPI database in the period of 2007 to 2013 among those in which no doubt on maternity was investigated. Out of the 32,661 records, 583 were selected fulfilling criteria as cases or controls. Samples were considered cases when two of the children had the same date of birth whereas controls were those samples in which at

least two children were born in different dates. The first sample fulfilling control criteria was included after each case. For each sample the following data was collected: mother's birth date and city of origin, and children's birth date.

DNA was extracted from archived FTA Cards (Whatman) using a commercial solution, according to the manufacturer's instruction (FTA Solution, Whatman). The presence of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene was determined in DNA samples from the mothers using TaqMan Assay C_2403545_10, as described by Tagliani-Ribeiro et al., 2012. Zygosity of same sex twins was determined from data used in the panel of genetic markers for paternity investigation (CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX, VWA and amelogenin).

Statistical analysis using qui-square test was performed in SPSS version 18.0, considering significance for $p < 0.05$. Approval from local ethics committee was obtained without the need for informed consent as all data was treated anonymously.

Results

From January 2007 to December 2013, LPI performed 32,661 paternity investigations. Samples originated from 12 cities that were grouped into 5 regions (Figure 1). Out of these, 283 (0.9%) were from mothers of twins. Therefore, other 300 samples were included as controls (mothers of singletons). The mean age of mothers of twins at the time of twins' birth was 26.4 years (MZ = 25, 4 and DZ = 27, 07), whereas the mean age of mothers of singletons at the time of the first child's birth was 24.5 years.

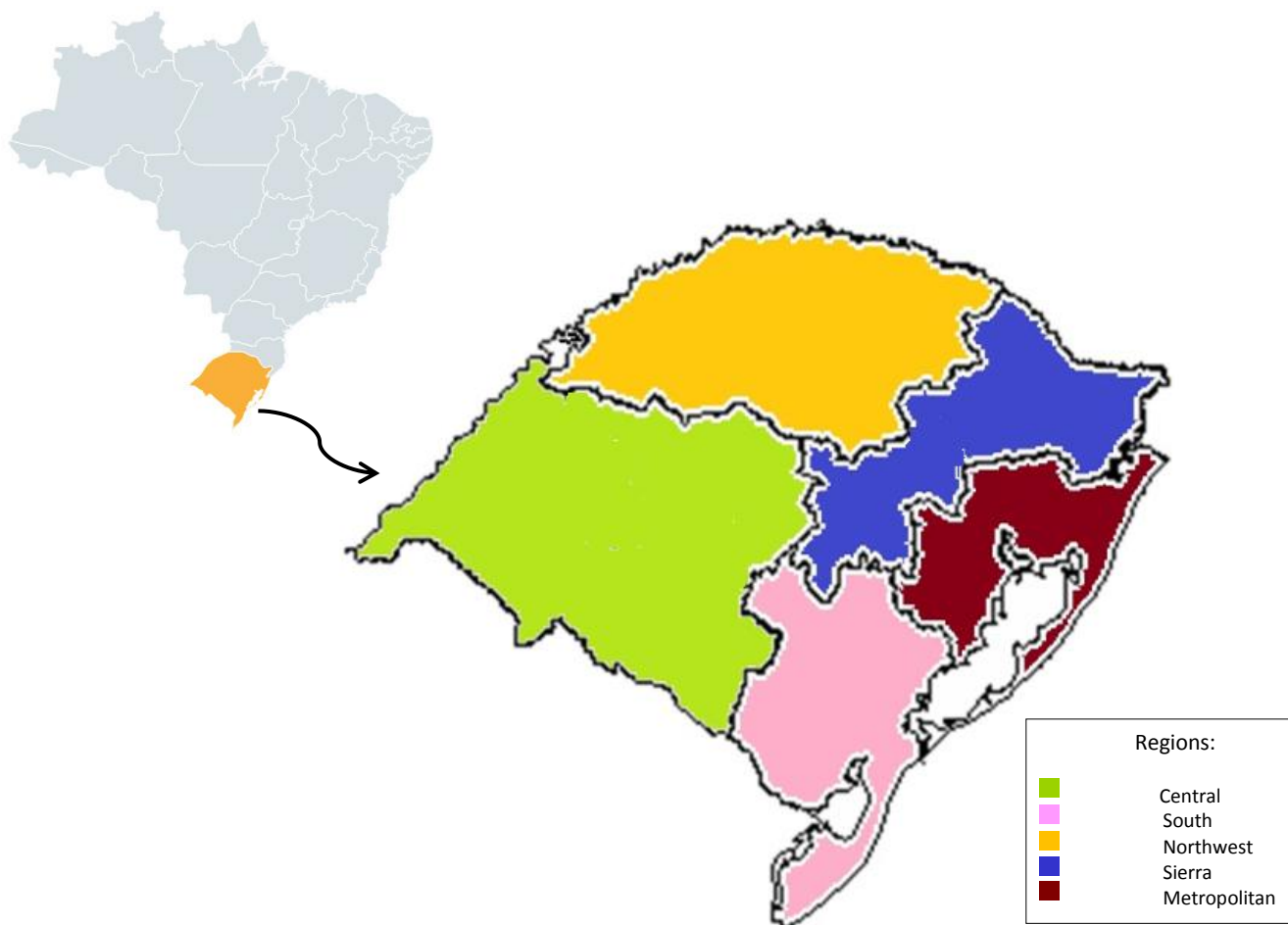


Figure 1. Regions of sample origin in Rio Grande do Sul (RS). The inset shows the location of RS in Brazil.

Among cases, the percent of MZ twins was 42%, differing from the estimated one third referred in the literature ($p=0.04$). The distribution of twin births, as the percentage of MZ twins per region can be observed in Table 1. There was no statistically significant difference across regions regarding the percentage of twins ($p=0.744$). However, the Sierra and Northwest regions showed a smaller percentage of MZ twins compared to the other regions ($p=0.0004$), although with values closer to the ones described in the literature (30%).

Table 1. Distribution of twins (both MZ and DZ) and of MZ twins in different analyzed regions.

Region	Cases (MZ + DZ twins)	MZ twins
	N (%)	N (%)
Metropolitan	124 (43.8)	54 (45.4)
Central	33 (11.7)	18 (15.1)
Sierra	32 (11,3)	8 (6.7)*
Northwest	60 (21.2)	21 (17.6)*
South	34 (12,0)	18 (15.1)
Total	283 (48)	119 (42)

* $p=0.0004$

Data analysis of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene in the mothers of twins and of singletons did not show statistically significant difference in genotypic (Table 2, $p=0.371$) or allelic (Table 2, $p=0,187$) frequencies.

Table 2. Distribution of genotypic and allelic frequencies of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene in the mothers of twins (n=285) and of singletons (n=300).

Genotype	Mothers of twins	Mothers of singletons
	N (%)	N (%)
GG	140 (49,5)	131 (44)
GC	116 (41)	136 (45)
CC	27 (9,5)	33 (11)
Allele		
G	398 (69,80)	398 (66,3)
C	172 (30,20)	202 (33,7)

However, when analyzed by zygosity, there was a difference in genotypic and allelic frequencies between mothers of DZ and MZ twins (Table 3). Genotype GG was

more frequent than expected in the mothers of MZ twins ($p=0.028$), whereas C allele was diminished ($p=0.016$) in this same group of individuals.

Table 3. Distribution of genotypic and allelic frequencies of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene in mothers of MZ (n=119) and DZ (n=166) twins.

Genotype	Mothers of MZ	Mothers of DZ
	twins	twins
	N (%)	N (%)
GG	70 (59)	70 (43)
GC	40 (33,5)	76 (46)
CC	9 (7,5)	18 (11)
Allele		
G	180 (75,2)	216 (65,8)
C	58 (24,8)	112 (34,2)

Discussion

Even though there is evidence of familial susceptibility for twinning, the genetic factors involved are unknown. Among studied candidate genes are Growth Differentiation Factor 9 (*GDF9*) and Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*), essential for normal human fertility and with a prominent role in follicle growth and ovulation (Moore et al., 2004). A previous study from our group has shown that the C allele of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene was more frequent in the mothers of twins than in the mothers of singletons in Candido Godoi, a small village in South Brazil (Tagliani Ribeiro et al., 2012).

However, the present study, analyzing a population-based sample, did not show a difference in allelic or genotypic frequencies between the mothers of twins and singletons. Nevertheless, a higher frequency of the C allele was found in the mothers of MZ twins as compared to the mothers of DZ twins. It is therefore possible that the previous difference was in fact due to an excess of MZ twins' mothers in that sample. Unfortunately, zygosity was not performed by molecular studies in the previous work. Yet, the possibility that the data found in Candido Godoi by Tagliani-Ribeiro et al. (2011) reflected a founder effect that cannot be extended to other populations. Unfortunately, no data on ethnicity of our sample is available to tease out if population stratification could be the basis of this difference.

To the best of our knowledge, this is the second study to investigate the role of *TP53* in twinning. Despite being extensively known for its role as tumor suppressor (Levin et al., 2006), the *TP53* gene also plays an important role in fertility. Forms of the p53 family (including p63 and p73) are involved in the maintenance of follicle pool, genomic integrity of germ cells and blastocyst implantation (Hu et al., 2007). One of *TP53*'s most studied variants is polymorphism rs1042522, which changes a cytosine into a guanine, thus replacing a proline with an arginine in residue 72 of the protein (p.P72R).

Studies in non-human primates suggest that the C allele (p.P72) is ancestral, although the G allele (p.R72) can reach frequencies over 0.5 % in certain populations (Whibley et al., 2009). This change results in mild functional differences in the protein, and variant p.P72 (C allele) is more efficient in initiating senescence and arresting the cell cycle whereas p.R72 (G allele) variant is more active in apoptosis induction and in suppressing cell transformation (Dumont et al., 2003). Kang et al. (2009) investigated the impact of such changes in the rates of embryo implant and successful pregnancy

after *in vitro* fertilization. In young patients, p.P72 seems to be a risk factor for implantation failure. These data corroborate our study, as the C allele was underrepresented in mothers of MZ twins.

Maternal age is a factor usually associated to twinning, even though not with MZ (Aston et al., 2008). A positive association was described for DZ twins and maternal age by several groups (Lambalk et al., 1998). In the present study, no influence of maternal age was observed, even when comparing MZ and DZ mothers. This may be due to the sample type used in this study, formed mainly by young women having unplanned pregnancies. Therefore, a bias may be introduced, especially regarding DZ twins.

Also in this aspect, it is worth noticing the apparent excess of MZ twins in our sample. The reasons for this are not completely understood, even because the risk factors for MZ twinning are not clear. Familial aggregation of MZ twins is rare and its cause may be due to a single gene related to the integrity of zona pellucida or the maintenance of cell-cell connection (Hall, 1996). It is assumed that MZ twins comprise 30% of all twin births (Aston, 2008) but in the present sample they account for almost 42% of cases (119/283). A possible explanation is the lack of studies employing molecular tools for determining zygosity.

Finally, the number of twin births found in this population-based sample (283) corresponds to only 0.9% of all paternity investigations analyzed at the LPI. Since the twinning rate for the state of RS is estimated to be 2% (DATASUS, 2015), one would expect that among the about 32,661 paternity investigations 653 were of twins. However, the number found was almost half this value. Since there is no reason to suppose that mothers of twins seek for state-paid paternity investigation in different proportion compared to mothers of singletons, it may be inferred that the rate found in

this study is more representative of the real twinning rate for RS, without the impact of assisted reproduction techniques. This hypothesis could be evaluated if data on the frequency of assisted reproduction among parents of twins was known or if historical records of twin births were available for the state. Unfortunately, none of these figures is publicly available. The oldest record of twin births available at DATASUS dates back to 1994 and indicates a proportion of 1.77% twin births in RS.

In brief, the present study investigated the frequency of polymorphism rs1042522 in *TP53* gene in mothers of twins and singletons using a population-based sample of women seeking for state-funded paternity investigation. Genotypic and allele frequencies were not different between groups but mothers of MZ twins showed a higher frequency of GG genotype and lower frequency of the C allele when compared to mothers of DZ twins. Also, the proportion of MZ twins seems to be elevated in this sample and may represent a more realistic figure on twinning rates.

References

- Aston, K. I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2008). Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction*, 136 (4), 377–86.
- Chauhan, S. P., Scardo J.A., Hayes, E., Abuhamad, A.Z., & Berghella, V.(2010). Twins: prevalence, problems, and preterm births. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(4), 305–315..
- Colletto, G. M. D. D., De Mattos Segre, C.A., & Beiguelman, B. (2001). Twinning rate in a sample from a Brazilian hospital with a high standard of reproductive care. *Sao Paulo Med J*, 119(6), 216-219.
- DATASUS (2010). Retrieved October 20, 2015, from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>
- Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra A. C.III., George, D.L., & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*, 33(3), 357–365.
- Hall, J. G. (1996). Twins and Twinning. *American Journal of Medical Genetics*, 204, 202–204.
- Hall, J. G. (2003). Twinning. *The Lancet*, 362,735–743.

- Hoekstra, C., Zhao, Z.Z., Lambalk, C.B., Willemsen, G, Martin, N.G., Boomsma, D.I., et al. (2008). Dizygotic Twinning. *Human Reproduction Update*, 14(1), 37–47.
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A.K., & Levine, A.J. (2007). P53 Regulates Maternal Reproduction Through LIF. *Nature*, 450, 2–6.
- Kang,H., Feng, Z., Sun, Y., Atwal, G., Murphy, M.E., Rebbeck, T.R., et al. (2009). Single-Nucleotide Polymorphisms in the P53 Pathway Regulate Fertility in Humans. *Pnas*, 106 (24), 9761-9766.
- Lambalk, C. B.; De Koning, C. H.; & Braat, D. D. M.(1998). The Endocrinology of dizygotic twinning in the human. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 145, 97–102.
- Levine, A.J., Feng, Z., Mak, T.W., You, H., & Jin, S. (2006). Coordination and communication between the P53 and Igf-I-Akt-Tor signal transduction pathways. *Genes & Development*, 609, 267–275.
- Macfarlane, A., & Blondel B. (2003). Demographic Trends in Western European Countries. In: *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation, And Perinatal Outcome* (2th eds).
- Moore, R. K.; Erickson, G. F.; & Shimasaki, S. (2004). Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends In Endocrinology And Metabolism*, 15(8), 356- 361.

Tagliani Ribeiro, A., Paskulin, D.D., Oliveira, M., Zagonel-Oliveira, M., Longo, D., Ramallo, V., et al. (2012). High Twinning Rate In Candido Godói: A New Role for P53 in human fertility. *Human Reproduction*, 27 (9), 2866–2871.

Tong, S.; Short, R. V. Dizygotic Twinning as a measure of human fertility.(1998). *Human Reproduction*, 13(1), 95–98.

Whibley, C.; Pharoah, P. D. P.; Hollstein, M. (2009). P53 Polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 95–107.

White, C.; Wyshak, G. (1964). Inheritance in human dizygotic twinning. *New England Journal Of Medicine*, 271(19), 1003–1005.