

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**ANÁLISE GENÉTICA E EPIDEMIOLÓGICA NA CIDADE DE CÂNDIDO GODÓI –  
RS, A “TERRA DOS GÊMEOS”**

**Alice Tagliani Ribeiro**

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

Orientadora: Prof.Dr<sup>a</sup>. Lavínia Schüler-Faccini

Co-orientadora: Prof.Dr<sup>a</sup>. Ursula Matte

Porto Alegre, julho de 2011

## **INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

---

Este trabalho está ligado ao INCT - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP) subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela CAPES - INCT.

“Sempre a explicação me diz o que sei  
Sempre que eu sei, alguém me ensinou

Tudo que eu sei me diz o que sou,  
Tudo que eu sou também será seu”

André Gonzáles

À comunidade de Cândido Godói.

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente à Lavínia, por aceitar me orientar mesmo sem me conhecer direito e por ter entrado de cabeça nesse projeto junto comigo. Obrigada por tudo!

À Úrsula por ter me confiado o projeto iniciado por ela e pelas idas à Cândido Godói para explicar para toda comunidade que iríamos retomar o estudo.

À CAPES e ao INAGEMP por terem financiado o projeto e me fornecido a bolsa de estudos.

Aos professores do PPGBM pelos ensinamentos. Ao Elmo pela disposição em ajudar e resolver problemas.

À toda comunidade de Cândido Godói, principalmente às famílias que entrevistamos, por terem nos acolhido tão bem, com direito a churrascadas.

Às gurias da prefeitura, Vanusa, Vanessa e Mercy, pela ajuda inestimável em nos por em contato com as famílias, pela disposição em nos acompanhar pelas estradas emocionantes do interior de Cândido Godói e pela tradução alemão-português necessária em várias entrevistas.

À Dona Clara e sua maravilhosa Pousada da Vó.

À Mari, Dana e Marcelo. Sem eles com certeza esse projeto não teria chegado aonde chegou. Obrigada pela companhia nas viagens à Cândido Godói, pela imensa ajuda nas entrevistas das famílias, nas coletas de sangue, na locomoção pela cidade e arredores e pelo geo-referenciamento.

Ao pessoal do laboratório (Bibi, Carol, Dana, Fer, Juliano, Lucas, Mari, Marcelo, Marlise, Nicolle e Virgínia) pela companhia de sempre, pelas risadas, pelos momentos de “o que será da minha vida?”, conversas científicas e às nem tão científicas assim. Obrigada por me manterem atualizada sobre todas as personalidades do youtube.

Aos meus amigos da época da faculdade e do Genoma-PUCRS. Pelas várias risadas, jantas, cervejas e pizzinhas.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã por sempre vibrarem com minhas conquistas e me apoiarem quando as coisas não saem bem como eu espero. Ao Ber, Filó e Elvis, por alegrarem meus dias.

Ao Nelson, não só pelos conselhos em relação ao projeto, mas também pelo apoio em todos os aspectos da minha vida. Por ser meu marido, melhor amigo, companheiro, psicólogo e orientador, tudo junto numa coisa só. Te amo!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. GEMELARIDADE: EPIDEMIOLOGIA.....	7
1.2. GEMELARIDADE: FATORES AMBIENTAIS.....	9
1.3. GEMELARIDADE: FATORES GENÉTICOS.....	10
1.3.1. VARIANTES GENÉTICAS E GEMELARIDADE DIZIGÓTICA.....	11
1.3.2. VARIANTES GENÉTICAS ABORDADAS NESSE ESTUDO.....	13
a) Rota da p53.....	13
i) P72R (rs1042522) gene <i>TP53</i> .....	14
ii) SNP309 (rs2279744) gene <i>MDM2</i> .....	15
iii) rs1563828 gene <i>MDM4</i> .....	16
iv) rs1529916 gene <i>USP7</i> .....	16
v) rs929271 gene <i>LIF</i> .....	17
b) Metabolismo do Folato ( <i>MTHFR</i> ) .....	18
c) <i>Receptor do Hormônio FSH (FSHR)</i> .....	19
1.4. EPIDEMIOLOGIA: FREQUÊNCIA DE GÊMEOS EM CÂNDIDO GODÓI....	20
1.5. EFEITO FUNDADOR.....	23
CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 3. Twin town in South Brazil: a Nazi's experiment or a genetic founder effect?.....	28
CAPÍTULO 4. High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility?.....	37
CAPÍTULO 5. ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS Asn680Ser <i>FSHR</i> e 677C→T <i>MTHFR</i> .....	54
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	63

ANEXOS.....	72
ANEXO 1– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	73
ANEXO 2 – Questionário Estruturado.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

A1AT: protease alfa-1-antitripsina  
CG: Cândido Godói  
DZ: dizigótico  
F: coeficiente de endocruzamento  
FSH: hormônio folículo estimulante  
FSHR: receptor trans-membrânico do hormônio folículo estimulante  
GDF9: fator de crescimento e diferenciação 9  
GWAS: *genome wide association study*  
HAUSP: *herpesvirus associated ubiquitin-specific protease*  
IGF1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
IMC: índice de massa corporal  
LH: hormônio luteinizante  
LIF: fator inibitório de leucemia  
MDM2: *Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)*  
MDM4: *Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)*  
MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase  
MZ: monozigótico  
p53: proteína supressora de tumor p53  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PPARG: gene do receptor ativado do proliferador de peroxisoma  
PPAR $\gamma$ : receptor ativado do proliferador de peroxisoma  
RS: Rio Grande do Sul  
SAM: S-adenosilmetionina  
SNP: polimorfismo de único nucleotídeo  
TP53: gene da proteína supressora de tumor p53 (*Homo sapiens*)  
USP7: *ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)*  
UTR: *untranslated region*

## RESUMO

---

A gemelaridade em humanos é um evento de etiologia complexa, cujas causas ainda não são totalmente conhecidas. Fatores ambientais como idade materna avançada, aumento da paridade, fatores hormonais e reprodução assistida, entre outros, estão associados a gestações de gêmeos dizigóticos (DZ). Ao contrário, há poucas evidências de fatores ambientais relacionados a gemelaridade monozigótica (MZ). Apesar dos avanços tecnológicos na área da genética, ainda é escasso o conhecimento sobre os fatores genéticos envolvidos na etiologia da gemelaridade. Não existem claras associações de fatores genéticos com gestações de gêmeos MZ. Por outro lado, estudos mostram a influência de vários genes na gemelaridade DZ e genes que possam influenciar a poli-ovulação, a implantação e o desenvolvimento dos embriões são bons candidatos para estudos genéticos. A cidade de Cândido Godói (CG), localizada no noroeste do Rio Grande do Sul, é conhecida como a “Terra dos Gêmeos” devido a sua alta incidência de nascimentos gemelares. Recentemente a teoria de que os gêmeos de CG são produto de experimentos do médico nazista Josef Mengele ganhou ampla divulgação pela imprensa. Porém, a história de CG sugere que fatores genéticos, potencializados por um efeito fundador ocorrido durante a colonização do município, sejam responsáveis pelos recorrentes nascimentos duplos na cidade.

Esse trabalho teve como objetivos testar a plausibilidade da “teoria do médico nazista” e investigar possíveis genes relacionados com a gemelaridade em CG. Para isso, foram analisados os livros de batismos das Igrejas católicas do município, os sobrenomes e as histórias familiares da amostra de mulheres coletadas para os testes genéticos. Foram investigados polimorfismos em genes envolvidos no mecanismo de ovulação (Ser680Arg do gene *FSHR*), no desenvolvimento do embrião (677 C→T do gene *MTHFR*) e na implantação do blastocisto (P72R do gene *TP53*, rs1563828 no gene *MDM4*, SNP309 do gene *MDM2*, rs1529916 no gene *USP7* e rs929271 do gene *LIF*, todos da rota da p53) em 42 mães de gêmeos e 101 mulheres que só tiveram gestações únicas, todas naturais de CG. Todos os polimorfismos foram identificados pelo sistema TaqMan de discriminação alélica através de PCR em tempo real. Foram realizados testes de zigosidade em 41 pares de gêmeos residentes de CG com o kit Identifilier da Applied Biosystems.



A partir das análises epidemiológicas, demonstrou-se que a ocorrência de nascimentos de gêmeos em CG é frequente desde o início do século XX, mais especificamente em uma comunidade deste município, chamada Linha São Pedro, o que reforça a idéia de um efeito fundador.

Não há associação entre gemelaridade em Cândido Godói e os polimorfismos estudados dos genes *FSHR* e *MTHFR*. Em compensação, foi observada associação dos alelos P72 do gene *TP53* e o alelo T do gene *MDM4* com gemelaridade. Estudos sugerem que esses alelos, além de estarem envolvidos nos mecanismos de supressão tumoral, estariam relacionados com infertilidade, sendo este, portanto, um resultado bastante interessante. Por serem alelos que resultam em apoptose menos eficiente, uma hipótese é que esses polimorfismos possuam um papel importante no período pós-implantação, “permitindo” o desenvolvimento de dois embriões quando o mais comum seria a eliminação de pelo menos um. Trabalhos demonstrando que camundongos com apoptose deficiente mantêm em maior porcentagem suas gestações e que, a combinação do alelo P72 com genótipos selvagens de *MDM2* e *LIF* altera a probabilidade de sobrevivência de bebês do sexo masculino, são evidências que contribuem para essa hipótese.

É importante salientar que esses resultados foram observados em uma população pequena, de origem étnica definida, contribuindo com apenas uma pequena fração do componente genético da herdabilidade da gemelaridade. Mais estudos devem ser realizados em coortes maiores e grupos com diferentes *backgrounds* genéticos. No entanto, eles sugerem uma explicação genética para o grande aumento na taxa de gemelaridade em CG e também apontam para uma possível nova função dos genes da rota da p53 na reprodução humana.

## ABSTRACT

---

Twinning in humans is a complex etiology event, whose causes are not completely understood. Environmental factors such as advanced maternal age, increased parity, assisted reproduction and hormonal factors, among others, are associated with dizygotic twin pregnancies. Instead, there is little evidence of environmental factors related to monozygotic twins. Despite technological advances in genetics, it is still little knowledge about the genetic factors involved in the etiology of twin pregnancy. There are no clear associations between genetic factors and MZ twin pregnancies. On the other hand, studies show the influence of several genes in DZ twinning and genes that may influence the poly-ovulation, implantation and embryo development are good candidates for genetic studies. Cândido Godói (CG), located in northwestern of Rio Grande do Sul, is known as the "Twins' Town" because of its high incidence of twin births. Recently the theory that the twins are product of experiments of Nazi doctor Josef Mengele gained wide dissemination by the press. However, the history of CG suggests that genetic factors, fueled by a founder effect occurred during the colonization of the municipality, are responsible for the recurrent double births in the city.

This study aimed to test the plausibility of the "theory of Nazi doctor" and investigate possible genes related to multiple births in CG. For this, we analyzed the baptisms' books of Catholic Churches of the city, the family histories and surnames of women in the sample collected for genetic testing. We investigated polymorphisms in genes involved in the mechanism of ovulation (Ser680Arg *FSHR* gene), in the embryo development (677 C → T *MTHFR* gene) and in blastocyst implantation (P72R *TP53* gene, rs1563828 in *MDM4* gene, SNP309 in *MDM2* gene, rs1529916 in *USP7* gene and rs929271 in *LIF* gene, all in p53 pathway) in 42 mothers of twins and 101 women who had only singleton pregnancies, all natural of CG. All polymorphisms were identified by the system TaqMan of allelic discrimination by real-time PCR. Zygosity tests were performed in 41 pairs of twins residing in CG by the Applied Identifier Bisystems.

Epidemiological studies show that twin births in CG are recurrent since the beginning of the twentieth century, specifically in a community of this municipality, called Linha São Pedro, which reinforces the idea of a founder effect.

There are no association between SNPs on *FSHR* and *MTHFR* genes and twinning. Nevertheless P72 allele of *TP53* gene and T allele of *MDM4* gene are associated with twinning in our study. Studies suggest that these alleles are not just involved with tumor suppression, but would be related to infertility, which is therefore a very interesting result. These alleles result in a less efficient apoptosis, therefore, a hypothesis is that these polymorphisms have an important role in post-implantation period, "allowing" the development of two embryos when the most common outcome would be the elimination of at least one. Studies demonstrating that mice with deficient apoptosis keep a greater percentage of their pregnancies, and that the combination of the P72 allele with wild genotypes of *MDM2* and *LIF* change the probability of survival of male babies are a contributing evidence for this hypothesis.

Importantly, these results were observed in a small population of defined ethnic origin, contributing only with a small fraction of the genetic component of heritability of multiple births. Further studies should be conducted in larger cohorts and groups with different genetic backgrounds. However, our results suggest a genetic explanation for the increased twinning rate in CG and also point to a possible new function of the route of the p53 gene in human reproduction.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. GEMELARIDADE: EPIDEMIOLOGIA

Classicamente, os gêmeos são classificados como monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Porém, esta divisão foi discutida recentemente baseada no aumento de registros de gêmeos MZ “não idênticos”, discordância essa devido a mutações pontuais mitocondriais, mosaicismo cromossomal e marcas epigenéticas (Shur, 2009).

Gêmeos MZ ocorrem quando um óvulo já fecundado se divide, originando dois indivíduos com a mesma constituição genética, havendo diferentes tipos de placentação dependendo do dia em que ocorre essa divisão (Hall, 2003) (Figura 1A). Gêmeos DZ ocorrem quando dois óvulos são liberados no mesmo ciclo menstrual e cada um é fecundado por um espermatozóide diferente (Figura 1B), sendo considerados “irmãos da mesma idade” e possuindo somente um tipo de placentação (Hall, 2003).

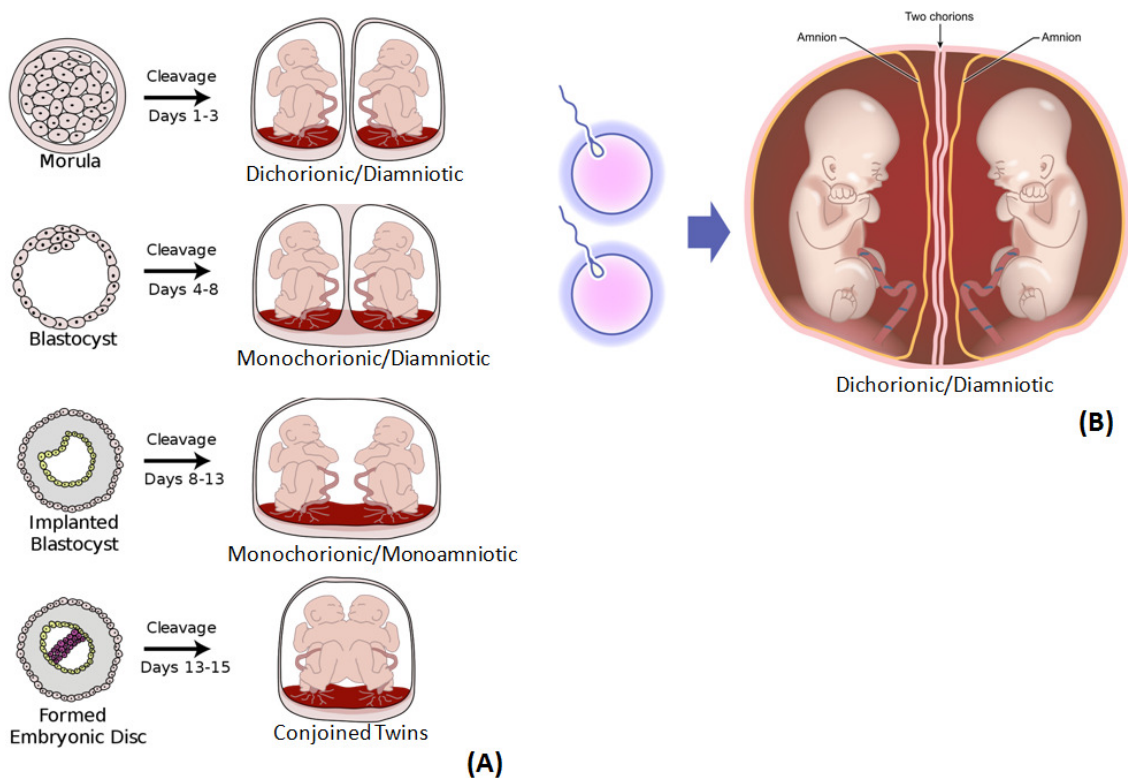


Figura 1. (A) Diferentes placentações em gêmeos monozigóticos (<http://www.thefullwiki.org/Monochorionic>). (B) Gêmeos dizigóticos (<http://www.texaschildrens.org>).

Até hoje, não existem explicações precisas para o fenômeno da gemelaridade. Porém, se observa que existe uma variação das taxas de nascimento de gêmeos ao redor

do mundo, sendo a menor na Ásia (6/1000 nascimentos) e a maior na Nigéria (40/1000) (Bulmer, 1970; Nylander, 1981; Derom et al., 1995; Hoekstra et al., 2008). Estas taxas variam também ao longo do tempo, nos últimos 30 anos o número de nascimentos gemelares na Holanda aumentou de 10/1000 para 18/1000 gestações. Na Europa as taxas de nascimentos de gêmeos decaíram por volta de 1900, porém a partir de 1970 elas vêm sofrendo um aumento contínuo na maioria dos países (Hoekstra et al., 2008).

As diferenças nas taxas regionais e tempo-dependentes de nascimentos múltiplos ocorrem devido, principalmente, a diferenças nas taxas de gemelaridade dizigótica (Tong et al., 1997). A gemelaridade monozigótica ocorre em todo o mundo a uma taxa constante de cerca de 3 a 4 por 1000 nascidos e representa um processo aleatório que pode acontecer a qualquer mulher que tenha filhos (Tong et al., 1997; Bortolus et al., 1999; Hall, 2003; Obi-Osius et al., 2004). Entretanto, os registros de “gestações gemelares” são subestimados. Há evidências que no mínimo 12% das concepções naturais são gestações de gêmeos. Porém, ambos os gêmeos irão nascer vivos em somente 2% destas gestações; um único bebê nascerá em 12% das vezes e, na grande maioria, ambos os embriões serão perdidos sem que a mulher tome conhecimento da gravidez (Boklage, 1990).

Nas últimas décadas, o principal fator implicado no aumento das taxas de nascimentos gemelares em países industrializados são os tratamentos para infertilidade. Uma vez que os mesmos se baseiam em indução da ovulação e implantação de múltiplos embriões, aumentando assim o número de nascimento de gêmeos DZ (Fauser et al., 2005). Apesar das causas de nascimentos de gêmeos MZ não estarem totalmente elucidadas (Steinman, 2000; Hall, 2003), danos na zona pelúcida durante os procedimentos de fertilização *in-vitro* parecem aumentar a probabilidade da ocorrência de gêmeos MZ (Hall et al., 2003).

Atualmente, clínicas de fertilização assistida têm tido uma maior precaução em relação ao número de embriões transferidos durante os procedimentos (<http://www.sindmedgabc.com.br/> - RESOLUÇÃO CFM nº 1.957/10). Gestações de múltiplos aumentam significativamente o risco de complicações pré e peri-natais, como restrição de crescimento intra-uterino e mesmo malformações congênitas (Glianaia et al, 2008).

## 1.2. GEMELARIDADE: FATORES AMBIENTAIS

Apesar de atualmente haver um aumento de nascimentos de gêmeos DZ devido a tratamentos de infertilidade, diversos estudos apontam para outros fatores ambientais que também estariam implicados na etiologia da gemelaridade.

Idade materna avançada e aumento da paridade, mesmo que fortemente correlacionados, são apontados como fatores independentes que influenciam a taxa de gestações dizigóticas. Bulmer e colaboradores (1970) mostraram que a taxa de gemelaridade dizigótica aumenta quatro vezes dos 15 até os 35 anos, devido provavelmente a mudanças da interação de sinais hormonais entre a glândula pituitária e o ovário (Lambalk et al., 1998).

A altura e o índice de massa corporal (IMC) materno apresentam correlação com gemelaridade dizigótica: mulheres acima de 164 cm possuem risco relativo 1,5 a 2,0 vezes maior de conceber gêmeos do que mulheres com 155 cm ou menos. IMC acima de 30 foi associado com maior risco de uma gravidez DZ quando comparado com IMC abaixo de 20 (Nylander, 1981; Basso et al., 2004).

O tipo de dieta é um fator que está sendo relacionado com as diferenças nas taxas de gestações múltiplas ao redor do mundo. Diferentes etnias também possuem diferenças marcantes nas taxas de nascimentos gemelares, por exemplo, no Japão ocorre 1 nascimento de gêmeos para cada 250, já na Nigéria a ocorrência é de 1 para cada 11 (Hall, 2003). Uma dieta rica em iname, que contém altos níveis de estrógenos, seria uma das explicações para a alta ocorrência de gêmeos na Nigéria (Creinin e Keith, 1989). Além disso, ter uma dieta rica em lácteos juntamente com níveis elevados do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) também parece favorecer a ocorrência de gestações DZ (Steinman, 2006).

Outros fatores como a utilização da pílula anti-concepcional, uso de ácido fólico (Ericson et al., 2001; Li et al., 2003), consumo de cigarro (Olsen et al., 1988; Parazzini et al., 1996) e nível sócio-econômico (MacGillivray e Campbell, 1978; MacGillivray et al., 1988) já foram relacionados com aumento de nascimentos DZ, porém outros estudos não conseguiram replicar estes resultados (Li et al., 2003; Berry e Kihlberg, 2005; Kallen, 1998; Campbell, 2005).

A qualidade do sêmen (concentração, contagem, mobilidade, e porcentagem de espermatozoides com morfologia normal) também parece ter algum papel na gemelaridade. Asklund e colaboradores (2007) demonstraram que pais de gêmeos, tanto MZ quanto DZ, apresentaram uma melhor qualidade do sêmen quando comparados com grupo controle. Nenhum outro estudo, porém, foi feito para confirmar estes resultados.

Ao contrário da gemelaridade DZ, há poucas evidências de fatores ambientais relacionados à gemelaridade espontânea MZ (Hall, 2003; Basso et al., 2004), parecendo ser um processo aleatório que pode acontecer a qualquer mulher que tenha filhos (Tong e Short, 1997; Bortolus et al., 1999; Hall, 2003; Obi-Osius et al., 2004).

### **1.3. GEMELARIDADE: FATORES GENÉTICOS**

Os trabalhos mais antigos sobre agregação familiar de gemelaridade foram publicados por Weinberg (1901) que também observou uma diferença na prevalência de gêmeos quando se considerava a linhagem materna e paterna. Weinberg é o responsável pela clássica fórmula de cálculo da frequência de MZ e DZ, sugerindo que a gemelaridade DZ seria pelo menos parcialmente condicionada por fatores genéticos maternos (Hoekstra et al., 2008). Estudos posteriores mostraram que uma irmã de mãe de gêmeos possui 2,5 vezes mais chance de ter uma gestação dupla do que a população em geral (Bulmer, 1970). Atualmente há um consenso de que gemelaridade dizigótica é um traço expresso na linhagem materna, mas que pode ser herdado tanto pelo lado materno como paterno (Parisi et al., 1983; Lewis et al., 1996; Asklund et al., 2007).

Apesar das características genéticas da gemelaridade dizigótica não estarem totalmente elucidadas, estudos apontam a influência de vários genes, não sendo, portanto, o fenótipo “ter gêmeos DZ” um traço simplesmente dominante ou recessivo (Hoekstra et al., 2008).

Recentemente foram descritas algumas síndromes genéticas que aumentam a probabilidade de ocorrência de nascimentos de gêmeos MZ, como as síndromes de Opitz/GBBB e Beckwith-Wiedemann (Shur, 2009). Apesar disso, ainda não existem claras associações de gestações de gêmeos MZ com fatores genéticos, mesmo havendo na literatura registros de famílias com histórico de gemelaridade monozigótica (Hamamy et al., 2004; Machin, 2009).



### **1.3.1. VARIANTES GENÉTICAS E GEMELARIDADE DIZIGÓTICA**

A gravidez de gêmeos dizigóticos é resultado da fecundação de dois óvulos por dois espermatozoides diferentes, assim, genes envolvidos em processos que possam influenciar a poli-ovulação parecem ser fortes candidatos (Hoekstra et al., 2008). Porém as explicações de como ocorre o controle genético da gemelaridade dizigótica devem ser procuradas não apenas nos processos que levam à poli-ovulação, mas também nos fatores relativos à manutenção bem sucedida de uma gestação gemelar, já que a gravidez de gêmeos é considerada uma gestação de risco. Gêmeos nascem, em média, com menos semanas de gestação, apresentando menor estatura e peso ao nascer. As taxas de natimortalidade e malformações congênitas são maiores em fetos gêmeos do que em fetos únicos (Keith et al., 1994; Beiguelman e Franchi-Pinto 2000).

Os estudos sobre variantes genéticas que possam explicar as causas da gemelaridade apresentam resultados contraditórios, não indicando forte associação dos genes candidatos estudados com o fenótipo “ter gêmeos DZ”. Dois grupos de pesquisadores analisaram o gene do receptor transmembrana do hormônio folículo estimulante (*FSHR*) devido ao seu efeito na ovulação. Um grupo de pesquisadores encontrou associação positiva entre duas variantes desse gene e a gestação de gêmeos DZ. Essas variantes tornariam o receptor do FSH mais sensível ao hormônio FSH causando a maturação e liberação de mais de um oócito (Al-Hendy et al., 2000). Porém outros pesquisadores não encontraram relação entre essas variantes e a gemelaridade DZ (Montgomery et al., 2001; Derom et al., 2001).

Outra variante, possivelmente envolvida no processo de ovulação e, por consequência, responsável por aumentar a taxa de nascimento de gêmeos DZ foi estudada por Boomsma e colaboradores (1992). Esses autores analisaram variantes do gene inibidor da protease alfa-1-antitripsina (*A1AT*) e observaram que mães de gêmeos dizigóticos apresentam uma frequência do alelo *Pi\*S* três vezes maior que o grupo controle, e que a frequência dessa variante também é um pouco maior do que em mães de gêmeos idênticos. Assim, há indícios que o alelo *Pi\*S* possa estar relacionado com aumento de fertilidade, manifestado com o maior número do nascimento de gêmeos, porém nenhum outro estudo foi feito para replicar esses resultados, devido, provavelmente, à baixa frequência desse polimorfismo na população em geral (de Serres et al., 2006; Baldo et al., 2008;).

Uma mutação no gene do fator de crescimento e diferenciação 9 (*GDF9*) foi relacionada com infertilidade e aumento de ovulação. O *GDF9* é expresso nos óocitos humanos e é um fator de crescimento essencial, desempenhando um papel muito importante na foliculogênese (Hoekstra et al., 2008). Um estudo com ovelhas mostra que os indivíduos heterozigotos apresentam mais gestações gemelares, e os portadores homozigotos da mutação são inférteis (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004). Dois grupos de pesquisadores analisaram toda a sequência desse gene e identificaram algumas variantes significativamente mais comuns em mães de gêmeos DZ do que no grupo controle, porém são variantes raras e são necessários mais estudos para confirmar essa associação (Montgomery et al., 2004; Palmer et al., 2006).

Existem poucos trabalhos na literatura com genes envolvidos na manutenção de uma gestação gemelar. Uma substituição alélica no gene *PPARG* foi relacionada à gemelaridade DZ por Busjahn e colaboradores (2000). Esse gene codifica o receptor ativado do proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), o qual possui efeitos relacionados à insulina, ao metabolismo de lipídios e à massa corporal, importantes para o processo de crescimento. Assim, essa substituição, estudada em indivíduos gêmeos, contribuiria para a sobrevivência intra-uterina dos gêmeos DZ, entre os quais a perda fetal é sabidamente alta. Porém esse resultado não foi replicado por Duffy e colaboradores (2001).

Um estudo demonstrou que mulheres que possuem o alelo determinante da deficiência de redutase de metilenotetra-hidrofolato (MTHFR) têm menor probabilidade de gerar gêmeos DZ (Hasbargen et al., 2000). A deficiência de MTHFR é responsável pela pouca produção de 5-metiltetra-hidrofolato e elevação da concentração plasmática de homocisteína. De acordo com Hasbargen e colaboradores, o alelo que causa essa deficiência diminui a probabilidade de gestação gemelar por influenciar diretamente o metabolismo do folato, essencial para o desenvolvimento embrionário. Indivíduos heterozigotos e homozigotos para a mutação estariam, de certa maneira, “protegidos” contra gestações gemelares. Porém, um trabalho posterior não achou associação dessa mutação com gestações dizigóticas (Montgomery et al., 2003).

Utilizando uma metodologia mais moderna, Derom e colaboradores (2006) e Painter e colaboradores (2010) realizaram um *genome-wide association scan* em mães de gêmeos DZ. Ambos os estudos encontraram regiões nos cromossomos 2 e 7 que podem

apresentar possíveis genes candidatos para futuros estudos da gemelaridade DZ, porém análises mais específicas ainda não foram realizadas.

Portanto, ainda não há um consenso sobre quais fatores genéticos influenciam a etiologia de uma gestação de gêmeos DZ. A replicação desses estudos em diferentes populações, e a busca por novos genes candidatos, são necessárias para se obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos em uma gestação gemelar dizigótica.

### **1.3.2. GEMELARIDADE: VARIANTES GENÉTICAS ABORDADAS NESSE ESTUDO**

#### **a) Rota da p53**

Estudos com camundongos demonstraram que a proteína supressora de tumor p53 está relacionada com a reprodução materna através da regulação transcricional do Fator Inibitório da Leucemia (LIF), um fator crucial para a implantação do blastocisto (Stewart et al., 1992; Chen et al., 2000). Camundongos fêmeas *knock-out* para a proteína p53 expressam menos LIF durante o período de implantação e, conseqüentemente, possuem mais falhas de implantação do blastocisto (Hu et al., 2007; Feng et al, 2011).

Como os níveis de LIF na maioria das mulheres com infertilidade “inexplicável” são significativamente mais baixos (Hambartsoumian, 1998; Mikolajczyk et al., 2007), os estudos com camundongos sugeriram um potencial papel da p53 na fertilidade humana. Um estudo recente mostrou que polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes da rota da p53 (Figura 2) são encontrados em maior freqüência em mulheres que recorreram a clínicas de tratamento da fertilidade (Kang et al., 2009).

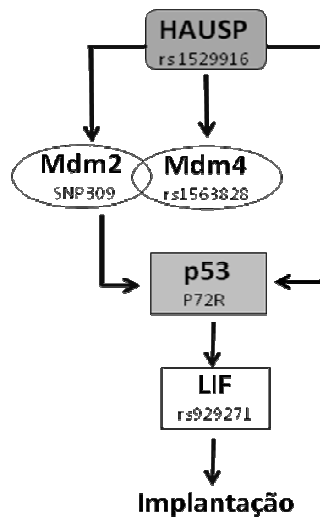


Figura 2. SNPs na rota da p53 (adaptado de Kang et al., 2009)

i) P72R (rs1042522) gene TP53

Nos humanos, o gene *TP53* está localizado na região p13.1 do braço curto do cromossomo 17, tendo cerca de 20 Kb de tamanho. É constituído por 11 éxons, sendo que o primeiro não é codificante (McBride et al., 1986). Por possuir dois promotores diferentes e sofrer *splicing* alternativo, o gene *TP53* produz diferentes isoformas de proteínas (Levine et al., 2011).

O códon 72 localizado no éxon 4 do gene *TP53* pode codificar uma prolina (P) (CCC) ou uma arginina (R) (CGC). O alelo P72 é menos eficiente do que o alelo R72 em induzir a apoptose e a supressão da transformação celular, mas é um melhor iniciador da senescência e parada do ciclo celular (Pim e Banks, 2004; Bergamaschi et al., 2006).

Diferentes autores encontraram associação do alelo P72 com infertilidade em mulheres com menos de 35 anos de idade (Kay et al., 2006; Kang et al., 2009). Foi demonstrado que o alelo que codifica uma prolina (P72) funciona como um fator de risco para a falha de implantação. Os níveis de LIF são significativamente mais baixos em células e camundongos com o alelo P72 do que aquelas (es) que possuíam o alelo que codifica uma arginina (R72) (Kay et al., 2006; Kang et al., 2009; Feng et al., 2011).

As freqüências alélicas desse polimorfismo diferem fortemente quanto à etnia, sendo o alelo P72 mais comum em afro-americanos (60%) e menos frequente em

descendentes de europeus (30-35%), sugerindo que o alelo P72 é o ancestral (Tornesello et al., 2005).

ii) *SNP309 (rs2279744) gene MDM2*

A proteína Mdm2 (Murine Double Minute2) tem a função de degradação proteolítica da p53 e a capacidade de se ligar a p53, bloqueando sua função transcricional (Roth et al., 1998; Tao e Levine, 1999; Geyer et al., 2000), ajudando a manter o nível basal de p53 em células sem estresse (Marine et al., 2006).

Localizado no braço longo do cromossomo 12, o SNP na posição 309 (T→G) localizado no promotor intrônico do gene *MDM2* cria um sítio para o fator de transcrição SP1, aumentando a sua afinidade pelo mesmo, elevando os níveis da proteína Mdm2 na célula. Com mais Mdm2 sendo expresso há uma atenuação da resposta de p53 ao estresse, resultando em uma maior taxa de mutação, falhas no reparo ao DNA, redução da apoptose e senescência celular, aumentando assim o risco da tumorigênese (Atwal et al., 2009).

Há uma associação significativa do alelo G do SNP309 com mulheres inférteis com menos de 35 anos, mesma associação observada no códon 72 do *TP53*. O alelo G degrada mais p53, que por consequência transcreve menos LIF, aumentando as chances de ocorrer uma falha de implantação. Esse SNP também possui frequências bastante distintas entre euro-descendentes (43%) e afro-americanos (10%) (Kang et al., 2009).

*iii) rs1563828 gene MDM4*

A proteína Mdm4 é homóloga estrutural da Mdm2, sendo também um inibidor da p53, provavelmente através da interação com Mdm2 (Xiong et al., 2006; Wade e Wahl, 2009; Atwal et al., 2009, Huang et al., 2011). A haploinsuficiência de Mdm4 leva a um aumento da atividade de p53, resultando em um reparo do DNA pouco eficiente e susceptibilidade a tumores (Terzian et al. 2007; Atwal et al 2009).

O gene *MDM4* está localizado no braço longo do cromossomo 1, na região 1q32.1. Kang e colaboradores (2009) relacionaram o alelo T do SNP rs1563828 com mulheres inférteis de todas as idades. Sendo esse o alelo ancestral, com cerca de 60% de prevalência em afro-americanos e somente 30% em euro-descendentes (Kang et al., 2009).

*iv) rs1529916 gene USP7*

A proteína HAUSP antagoniza a degradação de p53 mediada por Mdm2 e Mdm4 (Brooks et al., 2007). Além da p53, HAUSP também regula Mdm2 e Mdm4 através de sua função de desubiquitinase (Meulmeester et al., 2005a; Becker et al., 2008). Tanto Mdm2 quanto p53 se ligam ao sítio de ligação de HAUSP, porém em células sem nenhum tipo de estresse Mdm2 se liga com mais facilidade, mantendo os níveis basais de p53 (Hu et al., 2006; Sheng et al., 2006). Em condições de estresse, p53 se torna o substrato principal de HAUSP. Mdm2 é então liberado para ser ubiquitinado e degradado, os níveis de p53 aumentam e ocorrem as respostas de apoptose, senescência, etc (Meulmeester et al., 2005a; Meulmeester et al., 2005b).

O gene codificante da HAUSP (*USP7*) está localizado no braço curto do cromossomo 16. O alelo A do SNP rs1529916 é mais comumente encontrado em descendentes de europeus (33%) do que afro-americanos (16%) (Kang et al., 2009) e está associado com mulheres inférteis com menos de 35 anos, igualmente aos polimorfismos SNP309 *MDM2* e P72R *TP53*.

v) *rs929271 gene LIF*

O fator inibitório de leucemia (LIF) é uma citocina essencial para a implantação do blastocisto em camundongos e humanos (Stewart et al., 1992; Chen et al., 2000; Lass et al., 2001). Camundongos fêmeas LIF<sup>-/-</sup> possuem mais casos de falha da implantação do que camundongos LIF<sup>+/+</sup> (Chen et al., 2000; Hu et al., 2007)

No endométrio de mulheres saudáveis, LIF é expresso por todo o ciclo menstrual com um notável aumento na fase que coincide com a janela de implantação (Aghajanova, 2004). Por outro lado, os níveis de LIF na maioria das mulheres com infertilidade inexplicada, e em pacientes com endometriose, são significativamente menores quando comparados com grupos controles (Mikolajczyk et al., 2003; Dimitriadis et al., 2006; Mikolajczyk et al., 2007).

O gene *LIF* fica localizado no braço longo do cromossomo 22 e é um gene alvo da p53 (Hu et al., 2007). Camundongos p53<sup>-/-</sup> têm a implantação comprometida devido aos níveis diminuídos de LIF uterino, porém a administração de LIF exógeno pode reverter a reprodução comprometida (Hu et al., 2007).

O SNP rs929271 está na região 3' UTR do gene. O alelo G desse polimorfismo possui associação com mulheres com menos de 35 anos que recorreram a clínicas de tratamento de infertilidade (Kang et al., 2009). Esse alelo é encontrado com uma frequência de 30% em caucasianos e não existe em afro-americanos, o que levou os autores a sugerir que esse alelo surgiu mais tarde na evolução, depois da migração para fora da África (Kang et al., 2009).

### **b) Metabolismo do Folato (MTHFR)**

O suplemento de folato na dieta da gestante é um fator importante para o desenvolvimento do embrião. Em gestações múltiplas, a demanda de ácido fólico está aumentada, em consequência do rápido crescimento dos embriões nas primeiras semanas de gestação (Tremblay et al,1989). Uma dieta deficiente em folato pode causar malformações congênitas, desenvolvimento anormal e defeitos no tubo neural (Hasbargen et al. 2000; Wolff, 2009).

A mutação 677 C→T (rs1801133) no gene codificante da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), resulta na síntese de uma enzima termolábil, com atividade catalítica reduzida (Weisberg et al., 1998; Blanton et al., 2011). Esse polimorfismo promove o aumento da dependência de ácido fólico para a enzima funcionar adequadamente. Em indivíduos afetados (tanto homozigotos T/T quanto heterozigotos T/C) a síntese de metionina e, por consequência, SAM (S-adenosilmetionina, doador universal do grupamento metil para reações de metilação) está diminuída. Isto resulta na hipometilação do DNA, em fragilidade cromossômica e regulação da expressão gênica alterada, fatores importantes no período de rápido crescimento embrionário (Hasbargen et al., 2000). A ingestão inadequada de ácido fólico pode afetar as gestações de mães T/T e T/C, podendo resultar em perdas indetectáveis de gestações dizigóticas. Hasbargen e colaboradores verificaram que a frequência do alelo T em mães de gêmeos é menor que em mães de filhos únicos, e mães C→T têm 2,28 menos chances de ter gravidez múltipla. Assim, o alelo normal parece permitir que as gestações duplas sejam levadas a diante.



### ***c) Receptor do Hormônio FSH (FSHR)***

A foliculogênese é controlada por uma complexa rede regulatória do eixo hipotálamo-pituitária-ovário. Dois hormônios essenciais são produzidos pela glândula pituitária, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (Hoekstra et al., 2008). A concentração de FSH é responsável pela seleção do “folículo dominante”, ou seja, do maior folículo (Messinis et al., 2010). O crescimento de múltiplos folículos ocorre quando, na época da seleção folicular, a concentração de FSH está muito alta ou quando as concentrações de FSH excedem o limiar por muito tempo (Baird, 1987; Schoemaker et al., 1993).

O nível de FSH depende de fatores genéticos, sendo mais alto em mulheres afro-descendentes do que em mulheres brancas (Randolph et al., 2003). Mães de gêmeos também possuem, em média, nível mais elevado de FSH do que as de parto único (Nylander, 1981). Genes desta rota controladora da síntese, liberação e de atividade do FSH são, portanto, bons candidatos para o aumento da frequência de gêmeos dizigóticos. A adição de uma serina pela mutação Asn680Ser (rs6166) contribuiria para formar um sítio com potencial para ser fosforilado, o que produziria um receptor do hormônio folículo-estimulante (FSHR) mais sensível ao FSH, aumentando então a incidência de gêmeos dizigóticos (Al-Hendy et al., 2000).

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA: FREQUÊNCIA DE GÊMEOS NAS FAMÍLIAS DE CÂNDIDO GODÓI

A cidade de Cândido Godói está localizada no Noroeste do Rio Grande do Sul (RS) (Figura 3, lat 27°57'07" long 54°45'07") e possui 6.535 habitantes (Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE). A cidade foi povoada basicamente por descendentes de alemães que ali se estabeleceram no início do século XX e é conhecida como a “Cidade dos Gêmeos” devido à alta frequência de nascimentos duplos (Figura 4 e Figura 5). Segundo informações da prefeitura, em um raio de 4 Km<sup>2</sup> nasceram 36 pares de gêmeos. Em um levantamento a partir do Datasus do Ministério da Saúde do Brasil ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)) entre os anos de 1994 e 2006, foi observado que Cândido Godói apresenta taxa média de nascimentos gemelares maior que a média nacional de 1%, ficando acima de 2%. Particularmente um distrito de Cândido Godói conhecido como Linha São Pedro, apresenta prevalências de nascimentos múltiplos entre 7% e 10% (Tagliani-Ribeiro et al., 2011; Matte et al., 1996).

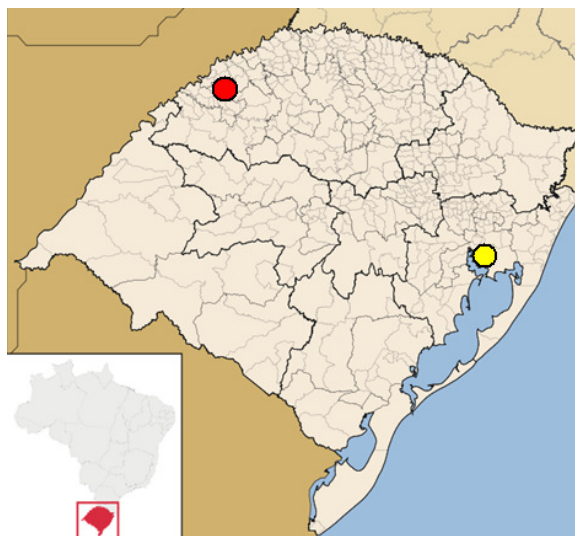


Figura 3. Mapa do Rio Grande do Sul apresentando a localização de Cândido Godói, em vermelho, e da capital Porto Alegre, em amarelo.

Recentemente a imprensa leiga deu ampla divulgação à publicação de um livro no qual um historiador argentino implicava a alta natalidade de gêmeos a experiências do médico nazista Josef Mengele, que supostamente teria morado neste município no início

da década de 1960 (Camarasa, 2008). Este fato, apesar de completamente sem fundamentação científica, trouxe mais notoriedade ao município (Figura 6).

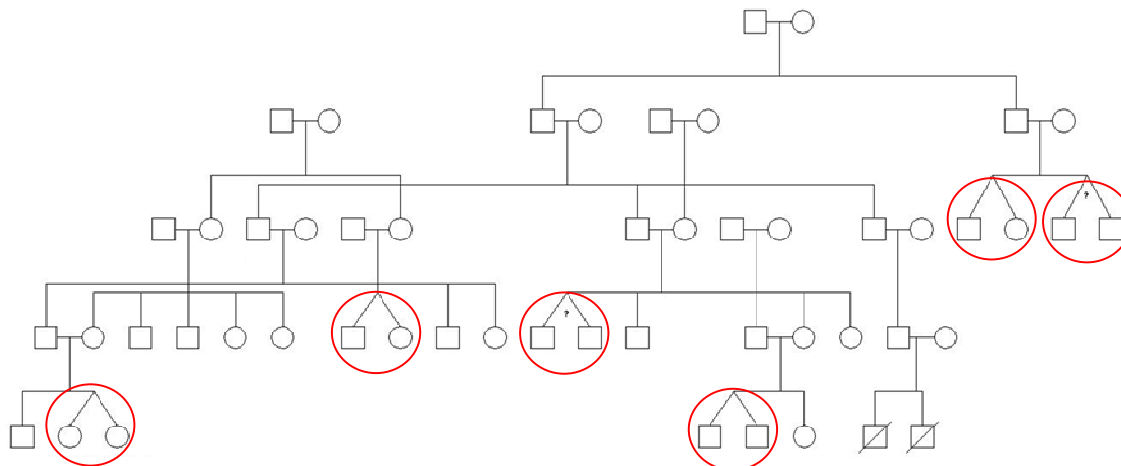


Figura 4. Heredograma de uma família residente de Cândido Godói, em destaque os nascimentos de gêmeos.



Figura 5. Gêmeos de Cândido Godói e a Festa Bianual que reúne os gêmeos nascidos no município. (Fontes: arquivo pessoal Adriana Sassi, National Geographic e arquivo BBC)



Figura 6. Matéria em jornal inglês sobre o médico nazista e a cidade de Cândido Godói

Na literatura existem poucos relatos de uma alta prevalência de gêmeos restrita a uma região geográfica pequena e etnicamente homogênea como ocorre em Cândido Godói. Uma comunidade rural da Nigéria se assemelha com o município gaúcho por ser composta quase inteiramente pelo grupo étnico Yoruba e possuir uma taxa de nascimentos de gêmeos aproximadamente duas vezes maior do que a taxa dos Estados Unidos (45/1000 e 22/1000 respectivamente) (Nylander, 1969; Schur, 2009). Já no vilarejo de 2000 habitantes de Mohammad Pur Umri, Índia, parece existir um excesso de nascimentos de gêmeos MZ, em 30 anos nasceram 55 pares de gêmeos idênticos (Cyranski, 2009).

Até agora, não há explicações científicas para a alta ocorrência de nascimentos gemelares no município de Cândido Godói. A lenda sobre a “água da fertilidade”, proveniente de uma fonte localizada no distrito de Linha São Pedro, apesar de ser bastante popular até em cidades próximas a Cândido Godói, não possui nenhuma fundamentação científica.

A cidade foi colonizada por poucas famílias, descendentes de alemães que chegaram ao município por volta de 1910 provenientes de outras cidades do RS, como Montenegro, Estância Velha e Santa Cruz. A maior parte da população (72%) vive na

área rural da cidade (Censo 2010-IBGE) e as famílias possuem uma cultura de permanecer a vida inteira na mesma localidade, diminuindo assim a possibilidade de casamentos com pessoas de fora da comunidade em que moram. Corroborando esse fato, os nascimentos de gêmeos tendem a pertencer sempre às mesmas famílias, por exemplo, sobrenomes como Grimm, Sauthier, Spies, Speth e Angst possuem muitos casos de gêmeos em suas histórias familiares.

Assim, a história de Cândido Godói sugere que fatores genéticos, potencializados por um efeito fundador ocorrido durante o processo de colonização do município, sejam responsáveis pela alta frequência de nascimentos duplos. Apesar de evidências como o alto grau de parentesco entre os moradores e a alta recorrência de nascimentos gemelares sugerirem a presença de fatores genéticos (Matte et al., 1996), nenhuma análise genética mais detalhada foi feita na região desde a publicação do trabalho de Matte e colaboradores (1996).

### **1.5. EFEITO FUNDADOR**

O efeito fundador é definido como:

o estabelecimento de uma nova população por uns poucos fundadores originais (em um caso extremo, por apenas uma fêmea fertilizada), que contém somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (Mayr, 1963).

O efeito fundador pode ocorrer quando uma área é colonizada por poucos indivíduos ou quando uma população passa por um “gargalo de garrafa”, ou seja, alguns poucos indivíduos sobrevivem e, mais tarde, a população se expande de novo. (Ridley, 2006)

Uma consequência do efeito fundador é a mudança das frequências alélicas da população filha em comparação com a população parental, por exemplo, populações isoladas costumam possuir frequências elevadas de alelos considerados raros na população de origem. (Ridley, 2006).

Por ser um processo aleatório, efeitos fundadores possuem consequências fenotípicas imprevisíveis nas populações. Na literatura existem vários exemplos da

importância do efeito fundador para alguns fenótipos específicos que ocorrem em algumas populações humanas.

Como regra geral, uma frequência relativamente alta de uma doença genética rara em uma população isolada sugere um efeito fundador (Zlotogora, 2007). Por exemplo, a alta frequência da doença de Huntington na população africânder (sul-africano branco) na África do Sul é consequência da sua história de colonização. Essa população é descendente de um navio de carga holandês que chegou na região por volta de 1652, trazendo na tripulação um homem portador da doença de Huntington. A população africânder moderna possui cerca de 30 mil portadores da doença, uma frequência bastante alta quando comparada com outras populações (Hayden et al., 1980). Outro exemplo é o da população de Quebec, Canadá. Essa população foi fundada por 8500 franceses e apresenta, para algumas doenças genéticas, uma distribuição geográfica consistente com a história de efeitos fundadores em série ocorridos durante a migração desses fundadores e seus descendentes pelo território (Laberge et al., 2005).

O cálculo do coeficiente de endocruzamento ( $F$ ) (Wright, 1951) é uma das maneiras de avaliar se uma população teve um efeito fundador durante sua história. Quando diferentes populações são comparadas, um  $F$  excepcionalmente alto para uma delas indica um efeito fundador independentemente da estrutura de cruzamento que elas possuam (Rydley, 2006).

Além de dados genéticos é possível utilizar dados de sobrenome para calcular o  $F$  de uma população. O método da isonimia utiliza a frequência de sobrenomes de uma população para medir se há desvios da panmixia, assim assume-se que todos os indivíduos com o mesmo sobrenome o herdaram de um ancestral comum (Crow e Mange, 1965). Análises da estrutura de uma população através do método da isonimia têm sido feitas em muitas populações (Barral et al., 2000; Loyo et al., 2004; Scapoli et al., 2007; Bronberg et al., 2009; Tarskaia et al., 2009) e parecem aprimorar estudos baseados em dados genéticos (Degioanni et al., 2003; King e Jobling, 2009).

## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

Nascimento de gêmeos é um fenômeno que intriga a ciência há muito tempo. E, apesar dos esforços dos cientistas para desvendar a “genética da gemelaridade”, os mecanismos que fazem uma mulher gerar dois indivíduos ainda são bastante obscuros.

Assim, devido à sabida alta recorrência de nascimentos gemelares nos núcleos familiares do município de Cândido Godói, a análise genética de algumas famílias pode permitir a elucidação de mecanismos genéticos ainda pouco conhecidos na etiologia da gemelaridade em humanos.

Sendo assim esse trabalho tem como **objetivos gerais**:

1. Descrever as características da gemelaridade no município de Cândido Godói, através de análise geográfica, epidemiológica e de testes de diagnóstico de zigosidade.
2. Investigar possíveis genes relacionados à gemelaridade nesta localidade.

### **Objetivos específicos**

1- Avaliar tendências temporais e clusters geográficos da ocorrência de gemelaridade no município a partir do início do século XX, utilizando registros de batizado disponíveis na cidade. E assim testar se “teoria do médico nazista” é plausível.

2 – Determinar o coeficiente de endocruzamento (F) através da análise de sobrenomes de uma amostra de moradores da cidade.

3 - Determinar a zigosidade dos pares de gêmeos coletados, comparando com dados da literatura.

4 - Estudar os seguintes polimorfismos comparando se há diferença nas frequências alélicas e genotípicas em mulheres com e sem nascimentos gemelares:

- Genes da rota da p53:
  - códon 72 do gene *TP53*
  - rs1563828 no gene *MDM4*
  - SNP309 do gene *MDM2*
  - rs1529916 no gene *USP7*



- rs929271 do gene *LIF*
- 677 C→T do gene *MTHFR*
- Posição 680 do éxon 10 do gene do receptor do FSH (*FSHR*)

Considerando o exposto acima, nossa hipótese de trabalho inicial foi de que a alta prevalência de gemelaridade neste local seja devida a fatores genéticos que tenham atingido uma frequência aumentada no município em decorrência de um efeito fundador amplificado pelo alto grau de endocruzamento.

## **CAPÍTULO 3**

**Twin town in South Brazil: a Nazi's experiment or a genetic founder effect?**

Publicação no periódico PLoS One.

# Twin Town in South Brazil: A Nazi's Experiment or a Genetic Founder Effect?

Alice Tagliani-Ribeiro<sup>1,2</sup>, Mariana Oliveira<sup>2,3</sup>, Adriana K. Sassi<sup>2,3</sup>, Maira R. Rodrigues<sup>4</sup>, Marcelo Zagonel-Oliveira<sup>1,2</sup>, Gary Steinman<sup>6</sup>, Ursula Matte<sup>2,5</sup>, Nelson J. R. Fagundes<sup>2,4</sup>, Lavinia Schuler-Faccini<sup>1,2,5\*</sup>

**1** Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** National Institute of Science and Technology in Populational Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil, **3** Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **6** Department of Biochemistry, Touro College of Osteopathic Medicine, New York, New York, United States of America

## Abstract

Cândido Godói (CG) is a small municipality in South Brazil with approximately 6,000 inhabitants. It is known as the “Twins’ Town” due to its high rate of twin births. Recently it was claimed that such high frequency of twinning would be connected to experiments performed by the German Nazi doctor Joseph Mengele. It is known, however, that this town was founded by a small number of families and therefore a genetic founder effect may represent an alternative explanation for the high twinning prevalence in CG. In this study, we tested specific predictions of the “Nazi’s experiment” and of the “founder effect” hypotheses. We surveyed a total of 6,262 baptism records from 1959–2008 in CG catholic churches, and identified 91 twin pairs and one triplet. Contrary to the “Nazi’s experiment hypothesis”, there is no spurt in twinning between the years (1964–1968) when Mengele allegedly was in CG ( $P=0.482$ ). Moreover, there is no temporal trend for a declining rate of twinning since the 1960s ( $P=0.351$ ), and no difference in twinning among CG districts considering two different periods: 1927–1958 and 1959–2008 ( $P=0.638$ ). On the other hand, the “founder effect hypothesis” is supported by an isonymy analysis that shows that women who gave birth to twins have a higher inbreeding coefficient when compared to women who never had twins (0.0148, 0.0081, respectively,  $P=0.019$ ). In summary, our results show no evidence for the “Nazi’s experiment hypothesis” and strongly suggest that the “founder effect hypothesis” is a much more likely alternative for explaining the high prevalence of twinning in CG. If this hypothesis is correct, then this community represents a valuable population where genetic factors linked to twinning may be identified.

**Citation:** Tagliani-Ribeiro A, Oliveira M, Sassi AK, Rodrigues MR, Zagonel-Oliveira M, et al. (2011) Twin Town in South Brazil: A Nazi’s Experiment or a Genetic Founder Effect? PLoS ONE 6(6): e20328. doi:10.1371/journal.pone.0020328

**Editor:** Henry Harpending, University of Utah, United States of America

**Received:** January 22, 2011; **Accepted:** April 25, 2011; **Published:** June 8, 2011

**Copyright:** © 2011 Tagliani-Ribeiro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This project was funded by the National Research Council (Brazil), grant number 573993/2008-4. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

## Introduction

The etiology of twin births in humans is still largely unclear and is the subject of a number of investigations [1–4]. Traditionally, twins are classified as monozygotic (MZ) and dizygotic (DZ). MZ twins are developed when an embryo splits soon after fertilization. DZ twins occur when two separate oocytes, released during the same menstrual period, are fertilized by separate sperm cells [1]. MZ is rarer than DZ twinning except in Japan [5] and no maternal, genetic, or environmental factors have been associated to it so far [6]. On the other hand, DZ twinning is a phenomenon of complex etiology, in which both genetic predisposition and environmental factors play a role [7]. Although familial aggregation of DZ twins has been known for a long time, few genes have been associated with DZ twinning, including the receptor of FSH hormone (*FSHR*), growth differentiation factor 9 (*GDF9*), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), etc. [8–10]. Non-genetic factors such as advanced maternal age, increased parity, lactation, diet, higher maternal height body mass index and race are observed also as risk factors for DZ twinning too [11].

Twinning rates shows a wide geographical and temporal variation, being extremely rare in Asian populations (5–6 in

1,000 maternities) and more frequent in Sub-Saharan populations (23 in 1,000 maternities) [11]. Previous studies show that twinning rates in European countries started to decline around 1900, but have increased steadily from the 1970s onwards [12], possibly as a result of both increased maternal age and a more widespread use of assisted reproductive technology (ART) procedures [11,13,14]. Even in a single continent such as Europe variations on twinning rates between different countries are observed [15]. The variability on twinning rates has been assigned to the variation in DZ twinning rates, as MZ twinning has a constant prevalence around the world and time (4 in 1,000 maternities) [16].

Cândido Godói (CG) is a small town in South Brazil (27°57′07″S; 54°45′07″W) with approximately 6,000 inhabitants. It is known as the “Twins’ Town” due to its high rate of twin births. According to the Brazilian Ministry of Health, between 1994 and 2006, around 2% of the live births in CG were twins, compared to an average of 1% for the whole country [17]. However, twinning may not be equally distributed throughout the municipality. In 1994, the twinning birth rate in Linha São Pedro (LSP), a small district of CG was estimated as 10% [18]. CG and LSP were both founded at the beginning of the Twentieth Century by a few families of German ancestry coming from other German-

founded towns in Rio Grande do Sul. Presently, the population of LSP is less than 600 inhabitants and most are catholic [19]. The reasons for the higher twinning rate in CG in general, and in LSP in particular, however, are still unclear.

Recently, a controversial theory was raised by an Argentinean journalist [20] who wrote a book alleging a possible link between the twinning phenomenon in CG and supposed experiments of the Nazi physician, Joseph Mengele. According to Camarasa, Mengele could have lived and worked as a physician in CG in the beginning of the 1960s, after living in Buenos Aires. Even though Camarasa's suppositions were not based on any actual historical records available [21], his story has caught attention of the international press, which created a worldwide "fuzz" around the "Brazilian Twin Town" in many countries such as the United Kingdom (<http://www.dailymail.co.uk/news/worldnews/article-1126504/The-Twins-Brazil-Did-Nazi-doctor-Mengele-Angel-Death-cause-twin-surge-South-American-town.html>), Brazil (<http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,EMI24803-15228,00-NAZISTA+JOSEF+MENGELE+CRIOU+CIDADE+DOS+GEMEOS+NO+RIO+GRANDE+DO+SUL+DIZ+LIVR.html>) and USA (<http://news.nationalgeographic.com/news/2009/11/091125-nazi-twins-brazil-mengele.html>).

In this study, we surveyed baptism records in CG and LSP to evaluate temporal trends to test the predictions of the "Nazi's experiment hypothesis". More specifically, we asked the following questions: 1. Is there any temporal and geographical variation in twinning in CG (and LSP)? 2. Is there any increase of the twinning rate around the 60 s or late 60 s, when Joseph Mengele was supposedly working as a physician there? We also searched for alternative explanations for the higher twinning rate in CG. Given the known history of CG, we suspected that a genetic founder effect may be involved in the increased twinning rate in CG (and LSP). To test this hypothesis, we asked, using isonymy methods, whether twin's mothers have a higher inbreeding coefficient as compared to women who never gave birth to twins. Our results clearly show that contrary to the "Nazi's experiment hypothesis" there is no peak on the twinning rate around the 60 s. On the other hand, the isonymy analysis supports the hypothesis that a founder effect is a much more likely explanation for the higher prevalence of twinning in LSP and in CG as a whole.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

This study used only secondary public data for analysis, which was treated anonymously. This research project was approved by the Hospital de Clinicas de Porto Alegre Ethics Committee under the protocol number 09-359. Written informed consent was obtained for all participants before interviews were conducted.

### Twinning patterns within CG

Live births were surveyed from baptism records available in CG Catholic churches. These records include the child first name, family names of both parents, sex, and the locality (district) where the family lives. The earliest available baptism records date from 1927, but complete and reliable data were available only from 1959 onwards. Since there is a suggestion that LSP may have an especially high twinning frequency [18], we used a chi-square test to assess whether LSP has a higher twinning rate as compared to the remaining CG districts (CG-LSP) considering 1959 to 2008. Because maternal age (MA) is a known factor affecting twinning [11] we compared MA distribution in LSP and CG-LSP using data obtained from interviews to test if women living in LSP have children later in life, thus increasing the chance of twin births. Mean maternal age between these groups was compared using a Student *t*-test adjusted for unequal variances.

### Temporal tendencies in LSP and CG

According to Camarasa [20], Mengele would have arrived in CG around 1963 and visited the city until 1968, but the exact timing for his stay is uncertain. To evaluate the hypothesis that Mengele's stay in CG would have increased the twinning rate in the city, we used a chi-square test to compare the occurrence of twin births between the period of 1964–1968 and the remaining years.

To have a more detailed view on the temporal variations of twinning in CG, we used a G-test for trends to ask if there is any temporal trend over the frequency of twin births occurring after 1959, grouped by intervals of five years. We tested for temporal trends in twin births for CG as a whole, for LSP only, and for CG-LSP. The "Nazi's experiment hypothesis" predicts a peak of

**Table 1.** Distribution of twin baptism records in Cândido Godói from 1959 to 2008.

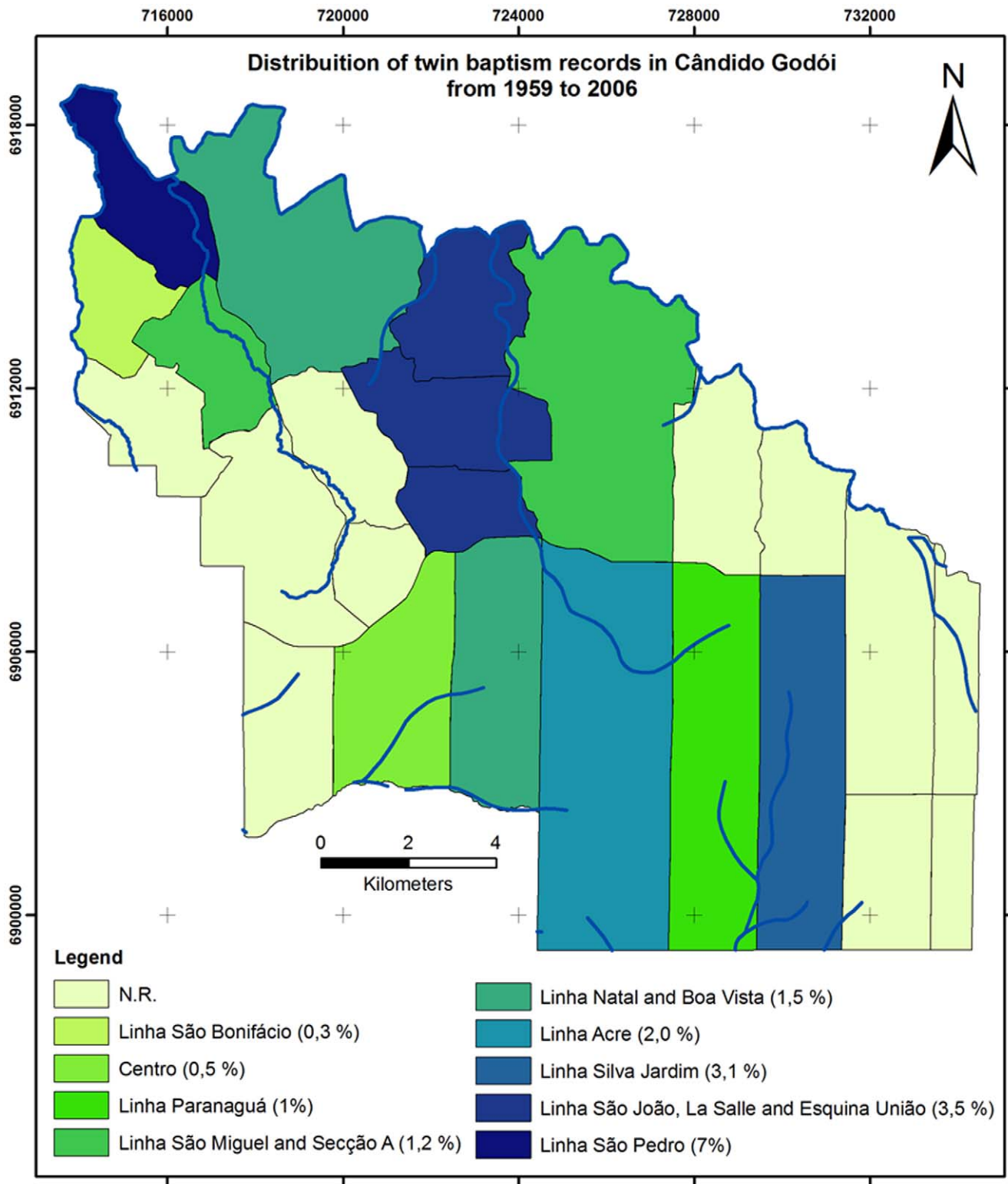
District	Total baptisms		Twin records		Prevalence of twinning*
	N	%	N	%	%
Centro	2,548	40.7	13	14.1	<b>0.5</b>
Linha São Miguel	512	8.2	6	6.5	<b>1.2</b>
Linha São Pedro	469	7.5	33	35.9	<b>7.0</b>
Sede Boa Vista	588	9.4	9	9.8	<b>1.5</b>
Linha São Bonifácio	398	6.4	1	1.1	<b>0.3</b>
Linha Secção A	406	6.5	5	5.4	<b>1.2</b>
Linha Acre	293	4.7	6	6.5	<b>2.0</b>
Linha Paranaguá	196	3.1	2	2.2	<b>1.0</b>
Linha Natal	338	5.4	5	5.4	<b>1.5</b>
Linha São João, La Salle and Esquina União	168	2.6	6	6.5	<b>3.5</b>
Linha Godói Centro	217	3.5	2	2.2	<b>0.9</b>
Linha Silva Jardim	129	2.1	4	4.3	<b>3.1</b>
<b>TOTAL</b>	<b>6,262</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>1.5</b>

\*Calculated as twin records/total baptism records.

doi:10.1371/journal.pone.0020328.t001

twinning around the late 1960s followed by either a constant or abrupt decline on the twinning rate towards the average level in the Brazilian population, since the increase in twinning obtained by Mengele would be effective only on the short-term.

Finally we used a chi-square test to evaluate if the relative frequency of twinning between LSP and CG-LSP was held constant when two periods are considered: 1927–1958 and 1959–2008. Because the earliest records (up to 1959) are only reliable for



**Figure 1. Districts of Cândido Godói with their twin births registration.**  
doi:10.1371/journal.pone.0020328.g001

live born twins – but not for overall births only the relative twinning frequency in different CG districts could be compared. All statistical tests, odds ratios, and their 95% confidence interval were computed using BioEstat 5.0 [22].

**MZ/DZ ratio**

The proportion of the MZ twinning rate ( $MZ_f$ ) over the DZ twinning rate ( $DZ_f$ ) was estimated using Weinberg’s differential method [23] in which  $DZ_f$  can be estimated by doubling the number of opposite sex twin pairs ( $OS$ ) and dividing by the total number of maternities ( $N$ ):  $DZ_f = 2OS/N$ , while  $MZ_f$  can be estimated by subtracting the number of  $OS$  twins from the number of same sex ( $SS$ ) twins and dividing by  $N$ :  $MZ_f = (SS - OS)/N$ . Because we only have the total number of maternities for the period 1959–2008, this was the period considered for  $MZ_f$  and  $DZ_f$  estimation. The corrected variances for  $MZ_f$  and  $DZ_f$  ( $Var(MZ_f)$  and  $Var(DZ_f)$ , respectively) was estimated as in [24]. We compared  $MZ_f$  and  $DZ_f$  between LSP and CG-LSP using a binomial test. Finally, we used the chi-square distribution to test if  $MZ_f$  and  $DZ_f$  are equally increased in LSP compared to CG-LSP using the absolute number of MZ and DZ twin pairs estimated by the numerator of Weinberg formula. As the total number of maternities is not necessary for this estimation we used the full birth records from 1927–2008 to increase statistical power.

**Pedigree and isonymy**

To have a more detailed picture of the pedigree structure for families where a high twinning rate is reported compared to families without familial history of twinning, we interviewed 42 women from independent households who gave birth to twins (cases) and 101 women from independent households who only had single births (controls). All 143 women were residents from CG. The aim of this questionnaire was to collect further data that would provide a better description of these women and to access other possible risk factors for twinning. More specifically, we asked familiar data, including surnames from both parents and history of twinning in their family, and questions about their lifestyle. For each household, we used the software Progeny 7.0® to draw pedigrees. We then used the surname data to calculate isonymy, a quantity that makes use of the frequency of surnames in a given population to measure deviations from panmixia [25]. In this sense, isonymy is related to the inbreeding coefficient  $F$  [26], which was estimated as in [27]. Analyses of population structure by isonymy methods have been carried out in many human populations [28–32]. The “founder effect hypothesis” predicts that the higher twinning rate in CG reflects, at least in part, a genetic founder effect which happened when CG was settled by few families of German descent in the beginning of the 20<sup>th</sup> century. Thus, if such founder effect affects the twinning rate in CG we

**Table 2.** Twin and single baptism records in Linha São Pedro (LSP) and in others Cândido Godói’s (CG-LSP) districts, from 1959–2008.

	Twin births	Single births
<b>LSP</b>	33 (35.9%)	436 (7.1%)
<b>CG – LSP</b>	59 (64.1%)	5,735 (92.9%)
<b>CG (total)</b>	92 (100.0%)	6,170(100.0%)

Relative Risk for twinning in LSP = 7.3 (CI 95%: 4.75–11.38).  
Chi-square test  $P < 0.0001$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0020328.t002

**Table 3.** Twin baptism records between 1964–1968 and in the remainder years in Linha São Pedro (LSP) and in others Cândido Godói’s (CG-LSP) districts.

CG	Twins	No-twins	P value
<b>1964–1968</b>	9	778	0.4815
<b>Others years</b>	80	5395	
<b>CG-LSP</b>	<b>Twins</b>	<b>No-twins</b>	
<b>1964–1968</b>	4	718	0.2940*
<b>Others years</b>	53	5018	
<b>LSP</b>	<b>Twins</b>	<b>No-twins</b>	
<b>1964–1968</b>	5	60	0.7724**
<b>Others years</b>	27	377	

\*Pyates.  
\*\*Pwilliams.  
doi:10.1371/journal.pone.0020328.t003

expect a higher inbreeding coefficient for cases. We calculated  $F$  for cases ( $F_{cases}$ ) and controls ( $F_{controls}$ ), and the statistical significance of this difference was assessed by 1,000 permutations. The reported  $P$ -value thus represents the proportion of permutations resulting in a ratio  $F_{cases}/F_{controls}$  equal or higher than the observed.

**Results**

From 1959 to 2008 there were a total of 6,262 baptisms in 14 CG districts, including 91 pairs of twins and one triplet. Table 1 presents the geographical distribution of baptism records in CG according to the district where the parents lived. Using total baptism records we estimated the frequency of twinning in these districts. LSP shows a frequency of live born twins of 7.0% compared to 1.5% in CG as a whole. No other district presented frequencies above 3.5% (Table 1, Figure 1). It is noteworthy that while LSP contributes only 7.5% to all baptism records, it contributes almost 1/3 (33/92) to all twin births registered in CG, representing an odds ratio of 7.3 (CI 95% 4.75–11.38) for LSP compared to the remaining districts in CG ( $P < 0.0001$ ) (Table 2). There was no difference in maternal age between LSP and CG-LSP ( $P = 0.3036$ ;  $MA_{LSP} = 26.10 \pm 4.71$  years;  $MA_{CG-LSP} = 26.87 \pm 5.88$  years (mean  $\pm$  SD), suggesting that differences in maternal age is unlikely to explain the higher twinning rate in LSP.

There is no increase on the twinning rate in CG between the period 1964–1968 and the remaining years (Table 3,  $P = 0.482$ ). These results are consistent when only LSP or CG-LSP are analyzed ( $P = 0.772$ ,  $P = 0.294$ , respectively). There is also no temporal variation on the relative frequency of twinning between LSP and CG-LSP, considering the periods of 1927–1958 and 1959–2008 (Table 4,  $P = 0.638$ ), suggesting that LSP has been

**Table 4.** Twin baptism records before and after 1958 in Linha São Pedro (LSP) and in others Cândido Godói’s (CG-LSP) districts.

	1927–1958	1959–2008
<b>LSP</b>	11 (31.4%)	33 (35.9%)
<b>CG – LSP</b>	24 (68.6%)	59 (64.1%)
<b>CG (total)</b>	92 (100.0%)	6,170(100.0%)

Qui-square test:  $P = 0.638$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0020328.t004

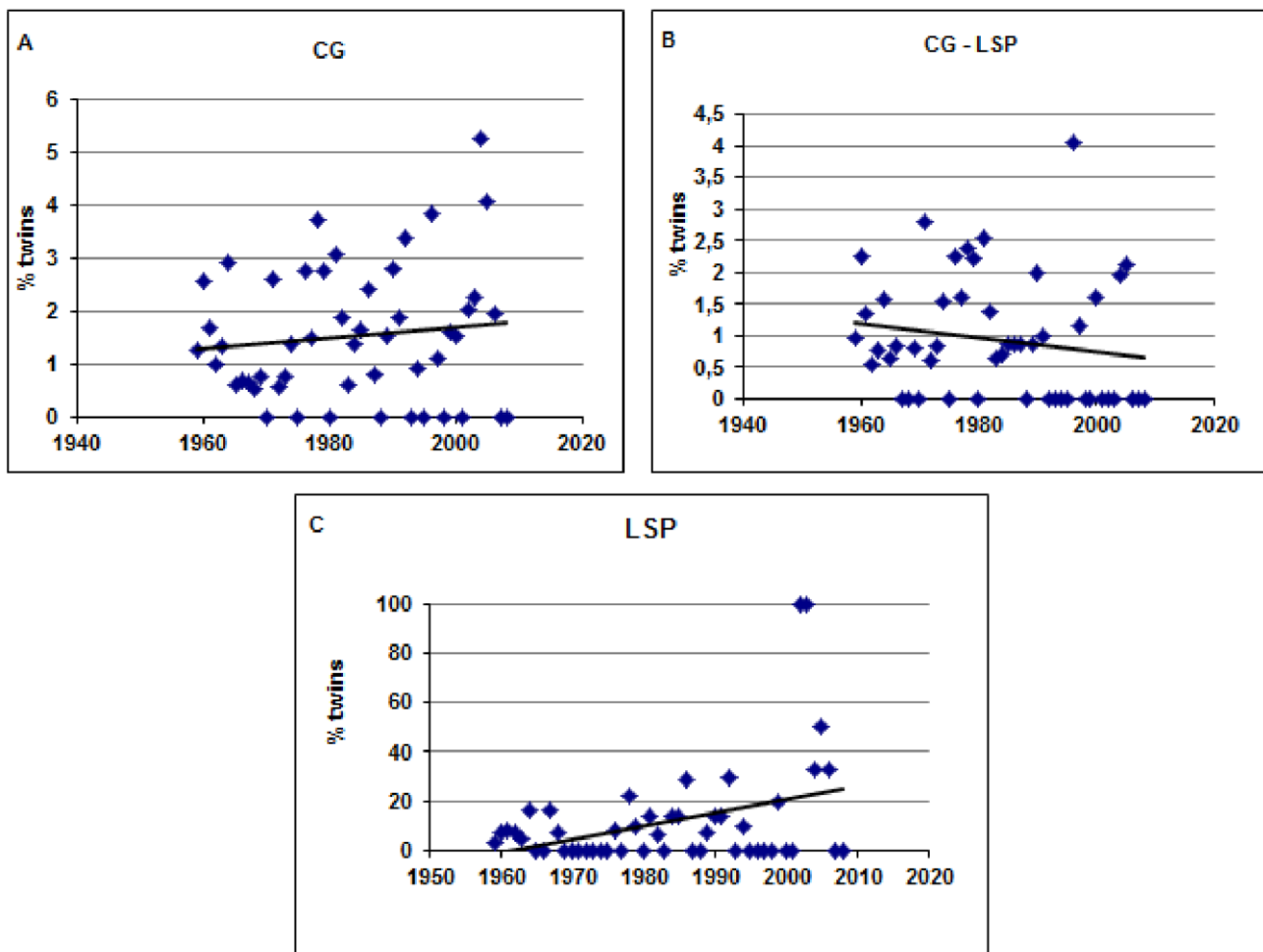
**Table 5.** Temporal distribution of twin baptism records from 1959 to 2008, in Linha São Pedro (LSP), in other districts of Cândido Godói (CG-LSP) and Cândido Godói as a whole (CG).

Period	LSP		CG-LSP		CG	
	Twins/single births	%	Twins/single births	%	Twins/single births	%
1959–1963	4/84	4.8	12/965	1.2	16/1049	1.5
1964–1968	5/60	8.3	4/718	0.6	9/778	1.2
1969–1973	0/67	0.0	8/749	1.1	8/816	1.0
1974–1978	3/54	5.6	10/641	1.6	13/695	1.9
1979–1983	3/53	5.7	10/723	1.4	13/776	1.7
1984–1988	4/34	11.8	4/596	0.7	8/630	1.3
1989–1993	7/36	19.4	4/471	0.8	11/507	2.2
1994–1998	0/30	0	4/390	1.0	4/420	1.0
1999–2003	3/9	33.0	1/257	0.4	4/266	1.5
2004–2008	4/9	44.4	2/224	0.9	6/233	2.6

doi:10.1371/journal.pone.0020328.t005

historically the major contributor for the overall higher twinning rate in CG. The test for temporal trends in the frequency of twin births reveals an interesting pattern (Table 5). There is no evidence

for any temporal trend in either CG as a whole (Figure 2A;  $P=0.351$ ) or CG-LSP (Figure 2B;  $P=0.486$ ). In contrast, for LSP alone there is a tendency for an increase on the twinning rate



**Figure 2. Temporal twinning tendencies.** 2a: Temporal twinning tendencies in Cândido Godói; 2b: Temporal twinning tendencies in Cândido Godói, excluded Linha Sao Pedro; 2c: Temporal twinning tendencies in Linha Sao Pedro only.  
doi:10.1371/journal.pone.0020328.g002

**Table 6.** Estimation of DZ twinning rate ( $DZr$ ), MZ twinning rate ( $MZr$ ) and the absolute number of DZ and MZ twin pairs in LSP and CG-LSP.

	LSP				CG-LSP			
	1927–1958		1959–2008		1927–1958		1959–2008	
	SS	OS	SS	OS	SS	OS	SS	OS
	4	7	9	23	16	7	14	51
<b>Total births</b>	Unknown		469		Unknown		5793	
<b><math>DZr^*</math></b>			3.8380%				0.4833%	
<b>Var(<math>DZr</math>)*</b>			0.0161%				0.0002%	
<b><math>MZr^*</math></b>			2.9851%				0.6387%	
<b>Var(<math>MZr</math>)*</b>			0.0144%				0.0002%	

SS, same sex twin pairs; OS, opposite sex twin pairs.  
 \*estimated using data from 1959–2008 only.  
 doi:10.1371/journal.pone.0020328.t006

across time (Figure 2C;  $P=0.001$ ). Importantly, this trend goes in the opposite direction of that expected according to the “Nazi’s experiment hypothesis”, whose predictions are also rejected in all other tests we performed.

Table 6 shows for both LSP and CG-LSP the numbers of SS and OS for the period between 1927–1958, and SS, OS and total births for the period between 1959–2008. For this last period,  $DZr$  equals 3,84% for LSP but only 0,48% in CG-LSP, while  $MZr$  equals 2,98% in LSP and only 0,64% in CG-LSP. This difference is highly significant for both  $DZr$  and  $MZr$  ( $P<0,0001$  for both comparisons). To test if  $MZr$  and  $DZr$  are increased by the same amount in LSP we used the numerator of Weinberg formula to estimate that 32 DZ twin pairs and 11 MZ twin pairs were born in LSP between 1927–2008, while during the same period 42 DZ twin pairs and 46 MZ twin pairs were born in CG-LSP. This difference is significant ( $P=0.004$ ). Thus, even though both  $DZr$  and  $MZr$  are increased in LSP, such increase seems to affect DZ twin births more strongly than MZ twin births. Since genetic factors have been only associated with DZ twinning, this result may be taken as a suggestion that genetic factors are responsible for the increased twinning rate seen in CG (for which LSP is the major contributor). Such notion is reinforced from the pedigrees resulting from the reported familiar history, which allows us to observe that twin birth is recurrent for several families living in CG

**Table 7.** Inbreeding coefficient by Isonomy (F) from cases and controls.

Sample	Number of Individuals	Number of Surnames	F
<b>Cases</b>	42	85	0.0148
<b>Controls</b>	101	196	0.0081

$P=0.019$ .  
 doi:10.1371/journal.pone.0020328.t007

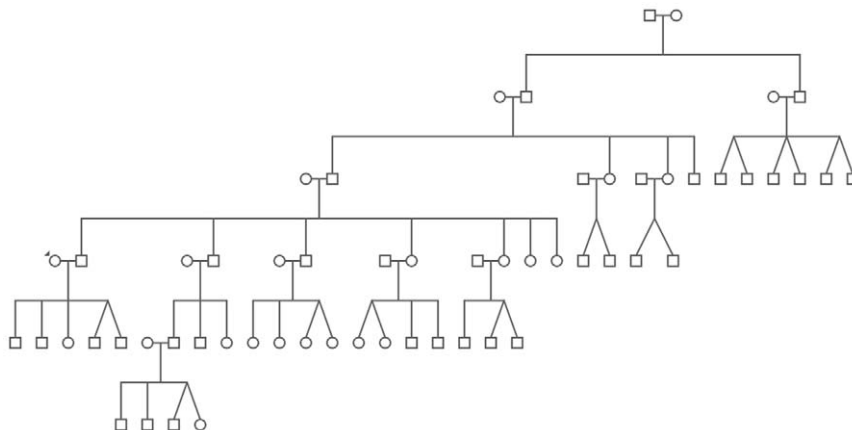
(Figure 3). Twenty-eight out of 42 mothers of twins had female sisters, and in five out of these 28 kindreds (17.8%), recurrence of twin births was observed. The total number of sisters of index mothers was 85, five of them having twins, which means an overall recurrence chance of having twins in females by 5.9%.

Finally, by analyzing the distribution of surnames between cases and controls, we found that the estimated  $F$  for cases is statistically higher than the estimated  $F$  for controls ( $P=0.019$ ; Table 7), suggesting that, as predicted by the founder effect hypothesis, women having twins in CG are more genetically related than women having single births.

**Discussion**

Our results provide a robust refutation to the hypothesis that the high twinning rate in CG is due to Nazi’s experiments in the 1960s, and strongly suggest that a genetic founder effect occurred during the settlement of CG is a much better alternative to explain this phenomenon. On other hand, we confirmed that the high prevalence of twins in CG is particularly concentrated in LSP and that this is a historical trend. Importantly, this increase on the twinning rate at LSP is not due to fertility treatments, because these techniques have been extremely rare in Brazil due to its high costs, especially in rural areas like CG.

One of the limitations of this study is that it is based on baptism registries and not on official birth certificates or hospital births records. However, birth certificates in Brazil provide reliable information for twinning only after 1990, and old hospital records were not available in CG. Moreover, in small communities such as CG was quite common in the first decades of the 20<sup>th</sup> century for women to have babies at home or to attend to hospitals in the neighbor cities. Baptism records, on the other hand, are carefully kept in the different churches located in the municipality, and these



**Figure 3.** Illustrative pedigree of one family living in Linha São Pedro.  
 doi:10.1371/journal.pone.0020328.g003



records include the name and sex of the children, date of birth, parent's name and locality where parents were living. The fact that only catholic churches were included may also be a limitation, but the last demographic census in Brazil in 2007 showed that 76.6% of CG population is Catholic. Baptism records may suffer from another bias, in that only live births are registered. However, this would underestimate the actual twinning prevalence in CG, and since the overall pattern of twinning is consistent between LSP and CG-LSP considering the periods of 1927–1958 and 1959–2008, it is unlikely that this would bring a significant bias to our data.

Although the importance of environmental factors cannot be formally ruled out, some factors which are important for twinning etiology such as the use of oral contraceptives, or acid folic supplementation [33–35] are unlikely to explain the high twinning rates already displayed by this population during the 1960s, when these substances were not available in the Brazilian market. On the other hand, high levels of IGF in milk have been implicated in elevated twinning rates [4]. Since all CG districts are based in rural economy and most of the families consume dairy products, dietary factors may represent a possible adjuvant for the high prevalence of twinning. However, because all CG districts have a similar lifestyle, milk consumption itself hardly explains the difference in twinning rates between LSP and CG-LSP. Similarly, differences in maternal age between LSP and CG-LSP are also unlikely to explain the observed pattern, since there is no statistical difference in maternal age between LSP and CG-LSP.

When one analyses extreme twinning rates in small isolates one has to keep in mind that the random fluctuations are also extreme. In Europe, a phenomenon similar to Cândido Godói has been registered in the Aland Islands, where higher twinning rates were historically recorded compared to mainland areas of Finland and Sweden [36]. The colonization history of CG is suggestive that a genetic founder effect may have played a role in this process, leading to high shifts in allele frequency between the ancestral and the derived population. Because it is a random process, founder effects have unpredictable phenotypic effects, which, in this specific case, may be a high frequency of twinning. Our results provide strong evidence that corroborates this idea. Firstly because of the familiar aggregation of twin births and the high prevalence of DZ twins in LSP which are both indicative that genetic factors are involved in twinning in the CG population (Figure 3). Although causes for MZ twinning are still obscure, DZ twinning has a clear familial aggregation, which is taken as evidence for genetic predisposition [11]. LSP, despite being a small district with few baptisms, concentrates roughly one third of all CG twins. The increased DZ twinning proportions in LSP thus indicates that such contribution for overall twinning occurs because there are genetic factors

enhancing twinning rate in CG as a whole and in LSP in particular. Secondly, strong evidence for the hypothesis of a genetic founder effect comes from the higher inbreeding coefficient found for women who gave birth to twins compared to other women.

Currently, there are several reported examples of the importance of genetic founder effects for some specific phenotypes which are more frequently in some human populations. As a general rule, a relatively high frequency of an autosomal recessive disease in an isolated population suggests a founder effect [37]. For example, it was suggested that a subgroup of Native American Athabascan populations living in Arizona and New Mexico have an unusually high incidence of severe combined immunodeficiency probably due to founder effect [38]. More recently, a case for the importance of genetic founder effects has been made for explaining the high frequency of genes responsible for 'single-gene' disorders and disease predispositions in Ashkenazi Jews compared to Sephardi Jews and non-Jews [39]. Another example is the Quebec population, in Canada. This population was founded by 8500 French settlers and shows, for some genetic disease, a geographical distribution consistent with a story of serial founder effects occurred during the migration of those settlers and their descendants [40]. It was also recently proposed that for the Sardinian population the relatively high frequency of glycogen storage disease type Ib in this population may be related to a founder effect [41].

Finally, our results also suggest that CG in general and LSP in special represent excellent population isolates where specific genetic variants influencing twin birth in humans may be identified. For the citizens of CG, our results may also be relieving, since we could formally reject the possibility that CG twins are a result of Nazi experiments and ideology. In this sense, our study illustrates how knowledge of population history and the genetic consequences may be of direct interest for the populations under study.

## Acknowledgments

We are indebted to the following people that helped us with this study: Selia Heck, Vanusa Dresch, and Vanessa Schardong (from the Municipality of Cândido Godói), for all their help in contacting families with twins and obtaining church records.

## Author Contributions

Performed the experiments: AT-R MZ-O AKS MO. Analyzed the data: AT-R MZ-O MRR GS UM NJRF LS-F. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRR NJRF UM LS-F. Wrote the paper: AT-R NJRF GS LS-F.

## References

- Hall JG (1996) Twinning: mechanisms and genetic implications. *Curr Opin Genet Dev* 6: 343–347.
- Lummaa V, Haukioja E, Lemmetyinen R, Pikkola M (1998) Natural selection on human twinning. *Nature* 394: 533–534.
- Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PG, et al. (2006) The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod* 21: 1531–1532.
- Steinman G (2006) Can the chance of having twins be modified by diet? *Lancet* 367: 1513–1519.
- Imaizumi Y, Nishida E (2007) The frequency of recurrent multiple maternities using two sets of census data in Japan: 1990 and 1995. *Twin Res Hum Genet* 10: 638–643.
- Steinman G (2000) The mechanism initiating and controlling monozygotic twinning in humans remains to be elucidated. *Twin Res* 3: 337.
- Steinman G, Verni C (2007) *Womb Mates: A modern guide to fertility and twinning*. New York: Baffin Books.
- Al-Hendy A, Moshynska O, Saxena A, Feyles V (2000) Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 356: 914.
- Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ (2000) The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C→T mutation. *Hum Reprod* 15: 2659–2662.
- Montgomery GW, Zhao ZZ, Marsh AJ, Mayne R, Treloar SA, et al. (2004) A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. *Twin Res* 7: 548–555.
- Hoekstra C, Zhao ZZ, Lambalk CB, Willemsen G, Martin NG, et al. (2008) Dizygotic twinning. *Hum Reprod Update* 14: 37–47.
- Imaizumi Y (1998) A comparative study of twinning and triplet rates in 17 countries, 1972–1996. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 47: 101–114.
- Fausser BC, Devroey P, Macklon NS (2005) Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 365: 1807–1816.
- Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, et al. (2005) Births: final data for 2003. *Natl Vital Stat Rep* 54: 1–116.
- Hall JG (2003) Twinning. *Lancet* 362: 735–743.
- Tong S, Caddy D, Short RV (1997) Use of dizygotic to monozygotic twinning ratio as a measure of fertility. *Lancet* 349: 843–845.
- Datusus (2010) Available: <http://tabnet.datusus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvrs.def>. Accessed 2010 Nov 28.

18. Matte U, Le Roux MG, Bénichou B, Moisan JP, Giugliani R (1996) Study on possible increase in twinning rate at a small village in south Brazil. *Acta Genet Med Gemellol* 45: 431–437.
19. IBGE (2010) Available: [http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/tabela\\_brasil.shtm](http://www.ibge.com.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/tabela_brasil.shtm). Accessed 2010 Nov 28.
20. Camarasa J (2008) Joseph Mengele: O Anjo da Morte da na América do Sul. Buenos Aires: Grupo Editorial NORMA. 188 p.
21. Ware J, Posner G (1986) Mengele: The Complete Story. New York: McGraw-Hill. 364 p.
22. Ayres M, Ayres M, Jr., Ayres D, Santos AA (2007) BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: Ong Mamiraua. 364 p.
23. Weinberg W (1934) Differenzmethode und Geburtenfolge bei Zwillingen. *Genetica* 16: 282–288.
24. Fellmann J, Eriksson AW (2006) Weinberg's differential rule reconsidered. *Hum Biol* 78: 253–275.
25. Crow JF, Mange AP (1965) Measurements of inbreeding from frequency of marriages between persons of the same surnames. *Eugen Q* 12: 199–203.
26. Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15: 323–354.
27. Rodríguez-Larralde A, Morales J, Barraí I (2000) Surname frequency and the isonymy structure of Venezuela. *Am J Hum Biol* 12: 352–362.
28. Bronberg RA, Dipierri JE, Alfaro EL, Barraí I, Rodríguez-Larralde A, et al. (2009) Isonymy structure of Buenos Aires city. *Hum Biol* 81: 447–461.
29. Barraí I, Rodríguez-Larralde A, Mamolini E, et al. (2000) Elements of the surname structure of Austria. *Ann Hum Biol* 27: 607–622.
30. Loyo MA, de Guerra DC, Izaguirre MH, Rodríguez-Larralde A (2004) Admixture estimates for Churuguara, a Venezuelan town in the State of Falcón. *Ann Hum Biol* 31: 669–680.
31. Scapoli C, Mamolini E, Carrieri A, et al. (2007) Surnames in Western Europe: A comparison of the subcontinental population through isonymy. *Theor Popul Biol* 71: 37–48.
32. Tarskaia L, El'chinova GI, Scapoli C, Mamolini E, Carrieri A, et al. (2009) Surnames in Siberia: a study of the population of Yakutia through isonymy. *Am J Phys Anthropol* 138: 190–198.
33. Ericson A, Kallen B, Aberg A (2001) Use of multivitamins and folic acid in early pregnancy and multiple births in Sweden. *Twin Res* 4: 63–66.
34. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C (2001) Modelling the potential impact of population-wide periconceptional folate/multivitamin supplementation on multiple births. *BJOG* 108: 937–942.
35. Li Z, Gindler J, Wang H, Berry RJ, Li S, et al. (2003) Folic acid supplements during early pregnancy an likelihood of multiple births: a population-based cohort study. *Lancet* 361: 380–384.
36. Eriksson AW (1973) Human twinning in and around Åland Islands. *Commentationes Biologicae*, 64: 1–159.
37. Zlotogora J (2007) Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations. *Eur J Hum Genet* 3: 272–278.
38. Murphy S, Hayward A, Troup G, Devor EJ, Coons T (1980) Gene enrichment in an American Indian population: an excess of severe combined immunodeficiency disease. *Lancet* 8193: 502–505.
39. Charrow J (2004) Ashkenazi Jewish genetic disorders. *Fam Cancer* 4: 201–6.
40. Laberge AM, Michaud J, Richter A, Lemyre E, Lambert M, et al. (2005) Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet* 4: 287–301.
41. Zappu A, Lilliu F, Podda RA, Loudianos G (2010) Molecular analysis of glycogen storage disease type Ib in Sardinian population: evidence for a founder effect. *Genet Test Mol Biomarkers* 3: 399–403.

## **CAPÍTULO 4**

**High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility?**

---

Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico The Lancet.

## High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility?

Alice Tagliani-Ribeiro, Diego D Paskulin, Mariana de Oliveira, Marcelo Zagonel-Oliveira, Dânae Longo, Virginia Ramallo, Maria Luiza Saraiva-Pereira, Patricia Ashton-Prolla, Nelson JR Fagundes, Lavínia Schuler-Faccini, Ursula Matte

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (A Tagliani-Ribeiro BSc, DD Paskulin MSc, M Oliveira BSc, M Zagonel-Oliveira MSc, D Longo PhD, V Ramallo PhD, Prof NJR Fagundes PhD, Prof L Schüler-Faccini MD, PhD)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Prof ML Saraiva-Pereira PhD, Prof P Ashton-Prolla MD PhD, Prof U Matte PhD)

### Summary

**Background** Cândido Godói (CG) is a small town in South Brazil which has the highest prevalence of twin births in Brazil. Recently, a number of studies have shown that p53 plays an important role on reproduction through blastocyst implantation and intra-uterine embryo survival. We decided to investigate gene polymorphisms in the p53 pathway to test if any of these gene polymorphisms affect twinning in this population.

**Methods** We analyzed single nucleotide polymorphisms (SNPs) from five genes in the p53 pathway and background characteristics of 42 mothers of twins (cases) and 101 mothers of singletons (controls), all residents from CG. Background characteristics were tested by Student's T Test or chi-square test. Association between SNPs and twin pregnancies were evaluated using  $\chi^2$  analysis. Genetic and Non-genetic factors possibly involved with twinning, including interaction among genes, were subjected to a logistic regression analysis.

**Findings** Mothers of twins have higher number of pregnancies compared to controls ( $p=0.007$ ). P72 allele at the *TP53* and T allele at the *MDM4* are enriched in mothers of twins ( $p=0.0006$  and  $p=0.025$  respectively). Logistic regression with these three variables shows that both *TP53* and number of pregnancies maintained their association with twinning ( $p=0.004$  and  $p=0.002$ , respectively), with *TP53* having a higher OR than number

of pregnancies (2.73 vs. 1.70, respectively). There is no interactive effect between *TP53* and *MDM4* ( $p=0.966$ ) and no difference between allelic frequencies of mothers of dizygotic and monozygotic twins ( $p=0.286$  and  $p=0.827$ , respectively). As expected, as mothers of twins have three times more cases of cancer in their first degree relatives than the control mothers ( $p=0.011$ ).

**Interpretation** Our results suggest that the P72 allele of *TP53* is a strong risk factor for twinning in CG, while number of pregnancies and the allele T at the *MDM4* may represent a weaker risk factor. The P72 allele is weaker in inducing apoptosis and suppressing cellular transformation, *MDM4* T allele alters Mdm4 levels, resulting in decreased p53 activity and a less effective apoptosis. These two alleles are associated with infertility, but the anti-apoptotic behavior of low levels of p53 in general and of the P72 allele in particular may indicate an important effect after implantation, enhancing the chance for a double pregnancy to succeed to term. Therefore, our results consistently suggest that twinning in Cândido Godói is somehow linked to reduced levels of p53-induced apoptosis.

**Funding** National Institute of Science and Technology in Populational Medical Genetics (INAGEMP).

## Introduction

Cândido Godói (CG) is a small town in South Brazil (27°57'07"S, 54°45'07"W) with approximately 6,700 inhabitants, which has the highest prevalence of twin births in Brazil (1.5% vs. 1.0% respectively).<sup>1</sup> Recently, Cândido Godói gained notoriety in the world media after a conspiracy theory attributed the increased number of twins to experiments of the Nazi physician Josef Mengele.<sup>2</sup> Our group has already shown that epidemiologically this theory has no scientific support and that a genetic founder effect should be the most probable explanation.<sup>1</sup> Cândido Godói was founded by a few families of German ancestry at the beginning of 20<sup>th</sup> century,<sup>3</sup> and the highest prevalence of twin births (7.0%) occurs in an isolated district called Linha São Pedro.<sup>1,4</sup> However, the genes or alleles which influence the high frequency of twin births in this population is still puzzling.

The p53 protein was first identified as a virus-associated tumor antigen.<sup>5,6</sup> Its function as tumor suppressor influencing cell cycle progression and apoptosis was only discovered one decade later.<sup>7,8</sup> In humans the p53 protein is coded by the *TP53* gene. Together with *TP63* and *TP73* these genes compose a gene family all encoding

transcription factors regulating a variety of biological functions, including development, stemness, natural immunity, oxidative stress, ageing and cancer.<sup>9</sup> p53 protein levels and activities are maintained by three regulators, HAUSP, Mdm2 and its homolog Mdm4.<sup>10</sup> Mdm4 forms heterodimers with Mdm2, which enhances the ability of Mdm2 to induce p53 degradation.<sup>11,12</sup> HAUSP can stabilize Mdm2, Mdm4, and p53 as a specific deubiquitinase and is an important regulator of the p53 pathway.<sup>13</sup>

More recently, a number of studies have shown that p53 plays an important and complex role on reproduction. It controls blastocyst implantation through regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) not only in mice<sup>14</sup> but also in humans.<sup>15-17</sup> Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of p53 pathway have been associated with “unexplained infertility” in women, being the *TP53* codon 72 SNP (P72R) a risk factor of implantation failure through its impact on LIF expression levels.<sup>16,17</sup> In addition, p53 may act after implantation increasing the intra-utero embryo survival probability. Abnormal embryos induced by ionizing radiation were maintained at higher percentage in p53-deficient mice, while p53-proficient embryos die, most likely through apoptosis.<sup>18</sup> Moreover, human embryo survival may be influenced by genotypes at TP53, LIF and MDM2 in a sex-dependent fashion.<sup>19</sup>

Considering that the births of both dizygotic (DZ) and monozygotic (MZ) twins have increased prevalences in Cândido Godói,<sup>1</sup> we decided to investigate gene polymorphisms in the p53 pathway related to blastocyst implantation and intra-utero embryo survival to test if any of these gene polymorphisms affect twinning in this population.

## **Methods**

### **Study population**

Forty-two women from independent households who gave birth to twins (cases) answered a structured questionnaire and donated a blood sample. A control group comprised 101 women from independent households who only gave birth to singletons. All 143 women are residents from Cândido Godói, which was founded by families of German ancestry who migrated to Brazil during the XIX century. The cases sampled represented 40% of all mothers of twins born in Cândido Godói after 1955. Both women in case and control groups signed a written consent form before collection of information and blood samples. This research project was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee under the protocol number 09-359.

## **Molecular analysis**

DNA was extracted according to Lahiri and Nurnberger Jr (1991)<sup>20</sup> and quantified in NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). SNPs from five genes in the p53 signaling pathway were genotyped including the *TP53* P72R, (rs1042522), *LIF* (rs929271), *MDM2* (SNP309, rs2279744), *MDM4* (rs1563828), and *HAUSP* (rs1529916), thus representing genes both downstream and upstream of the p53 regulatory cascade. Genotypes were determined by allelic discrimination using a Taqman SNP genotype analyzer (Applied Biosystems).

## **Statistical analysis**

We tested if background characteristics such as age, age at first pregnancy, number of pregnancies, occurrence of gestational losses, body mass index (BMI) as well as the incidence of cancer in their first degree relatives differed between cases and controls. For numerical variables we used a Student's T test, while for categorical variables we used the chi-squared test. For molecular data, Hardy-Weinberg equilibrium was tested for cases, controls, and for the total sample. Association between SNPs and twin pregnancies were evaluated using  $\chi^2$  analysis. Odds-ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) were calculated using the lower risk genotype as reference. Genetic and non-genetic factors possibly involved with twinning, including interaction among genes, were subjected to a logistic regression analysis to evaluate the robustness of these associations. For the logistic regression, genotypes were encoded assuming either a co-dominant or recessive model according to the value of OR estimated in the univariate analysis. All analyses were performed using the SPSS statistical package (version 19).

## **Role of the funding source**

The sponsors had no role in the conduct or interpretation of the study. The corresponding author had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

## **Results**

Women in the case and control groups were similar in mean age at first pregnancy, BMI and mean reproductive years at the moment of data collection. However, the number of pregnancies was significantly higher in cases compared to controls ( $p=0.007$ ) (table 1), with cases having a mean parity of 3.1 live births (95% confidence interval 2.52–3.63) compared to a mean of 2.1 live births (95%CI 1.89 – 2.21) in controls. The frequencies of

women with positive history for spontaneous abortions did not differ between cases and controls (table 1).

For the five genes studied here, univariate SNP analysis in the p53 pathway reveals statistically significant results for the *TP53* and *MDM4* genes (table 2). For the *TP53* gene there are both genotypic and allelic differences between cases and controls, with the P72 allele (cytosine) enriched in twin's mothers. The OR analyses suggest an almost co-dominant effect, with heterozygous individuals having intermediary risk compared to individuals homozygous for either allele. For the *MDM4* gene the thymine allele is more frequent in twin's mothers, and even though there is no statistical significance at the genotypic level the OR for the TT homozygous was marginally non-significant, which might suggest some recessive effect, as suggested by the 95% confidence interval in the OR for this genotype (table 2). We did not observe any difference in allelic or genotypic frequencies between cases and controls for the other polymorphisms tested in *HAUSP*, *LIF* and *MDM2* genes.

Based on the results presented above we performed a logistic regression analysis considering the number of pregnancies, genotypes at *TP53* (coded as co-dominant) and *MDM4* (coded as recessive) (table 3). When these three variables were analyzed together, both *TP53* and number of pregnancies maintained their association with twinning ( $p=0.004$  and  $p=0.002$ , respectively), with *TP53* having a higher OR than number of pregnancies (2.73 vs. 1.70, respectively), thus suggesting that in this population among the variables analyzed in this study the genotype at the *TP53* locus is the one with highest increase in risk. Also, the logistic regression analysis suggested that there is no association between genotypes at the *MDM4* locus and twinning when considering the other variables. However, this may be an effect of the limited sample size, given the relative risk induced by *MDM4* alone (see table 1). Because *MDM4* and *TP53* are in the same pathway and both exhibited different frequencies between cases and controls in the univariate analysis, an interactive effect of these two SNPs was investigated, but appeared to be non significant ( $p=0.966$ ), suggesting that these polymorphisms have independent effects on twinning in this community, even though the risk associated with the *TP53* gene seems to be much stronger than the risk associated with the *MDM4* gene as suggested by the logistic regression (table 3). We also compared allelic frequencies between mothers of dizygotic and monozygotic twins for SNPs at *TP53* and *MDM4*. However, no difference between these two groups was observed ( $p=0.286$  and  $p=0.827$ , respectively).



Because *TP53* mutations are largely known for their association with development or progression of tumors,<sup>21,22</sup> we compared the incidence of cancer in first degree relatives of cases and controls. If cases have a higher frequency of the P72 allele, which increases risk for cancer,<sup>23-25</sup> than we would expect more relatives affected by cancer in cases as compared to controls. As expected, the difference between cases and controls is statistically significant ( $p=0.011$ ) as mothers of twins have three times more cases of cancer in their first degree relatives than the control mothers (table 1).

## Discussion

Over recent decades there has been a significant increase in the world-wide prevalence of twin pregnancies, especially in industrialized countries, where the rate of multiple births almost doubled in 20 years.<sup>26</sup> This phenomenon has been attributed primarily to an increase in the number of assisted fertilizations. However, it is possible that other environmental and genetic factors might be acting too.<sup>27</sup> Several studies point to environmental factors implicated in the etiology of multiple births, like advanced maternal age, increased parity, higher maternal height and body mass index, and a diet rich in dairy and meat products, all of these indicated as independent factors influencing dizygotic pregnancies.<sup>27-29</sup> Family aggregation of dizygotic twin births strongly suggests that genetic factors may play an important role.<sup>27</sup> Efforts aiming to uncover the etiology of twinning began at the end of 19<sup>th</sup> century.<sup>30</sup> Presently, different studies have been done in different populations based either on a candidate gene approach, considering genes possibly involved in poly-ovulation or in the maintenance of a successful pregnancy, or on genome wide linkage scans without selecting candidate genomic regions *a priori*.<sup>31-40</sup> However, no common pattern has emerged from these studies, suggesting that twinning etiology is complex and influenced by several genetic factors.

In a previous study considering the Cândido Godói population we observed that the prevalence of both DZ and MZ twins are increased in the district of Linha São Pedro (3.84% and 2.98%, respectively), compared to an average of 1% for the whole country,<sup>1</sup> and we suggested that a founder effect is a likely explanation for such high prevalence in this population. Based on that, we decided to investigate candidate genes related to blastocyst implantation and/or intrauterine embryo survival. The tumor suppressor p53, besides playing a pivotal role in maintaining genomic stability, also plays an important role on reproduction by regulating blastocyst implantation and increasing intra-uterus embryo

survival probability.<sup>16-19</sup> Thus, our set of candidate genes include not only *TP53* itself but also their upstream regulators *MDM2*, *MDM4*, and *HAUSP*, and one of its targets, *LIF*.

Considering the univariate and the logistic regression analyses together, our results suggest that the P72 allele of *TP53* is a strong risk factor for twinning, while the allele T at the *MDM4* may represent a weaker risk factor. The P72 allele is weaker than the R72 allele in inducing apoptosis and suppressing cellular transformation but appears to be better at initiating senescence and cell cycle arrest.<sup>41-43</sup> Mdm4 is a negative regulator of p53 and cooperates with Mdm2 to inhibit p53 activity in cellular response to DNA damage.<sup>44,45</sup> *MDM4* T allele (*MDM4-T*) alters Mdm4 levels, resulting in decreased p53 activity and a less effective apoptosis.<sup>45</sup> Mdm4 also interacts with the other members of the p53 family, p63 and p73,<sup>46,47</sup> that may also regulate maternal reproduction. p63 is important for maturation of the egg and p73 ensures normal mitosis in the developing blastocyst.<sup>9,17</sup> Therefore, our results consistently suggest that twinning in Cândido Godói is somehow linked to reduced levels of p53-induced apoptosis. Nonetheless, recent data associated these two SNPs with infertility.<sup>16</sup> This could be expected from the fact that p53 directly regulates *LIF*, and therefore a less active form of p53 (P72) or reduced levels of p53 (induced by *MDM4-T*) negatively impact *LIF* expression levels leading to implantation failure. Actually, *TP53* P72 allele and *MDM4* T allele seems to be more frequent in women requesting IVF (in vitro fertilization) than in women with no reproduction difficulties.<sup>15-17</sup> How could these apparently contradictory findings be reconciled?

First, *LIF* is not induced by p53 alone. Prokineticin 1 (PROK1) also induces its expression,<sup>48</sup> and interleukin-1  $\beta$  (IL1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), and estrogen have also been shown to stimulate *LIF*.<sup>49-51</sup> Moreover, expression of *LIF* is critical for implantation,<sup>52,53</sup> but it is not the only factor involved. Different studies have shown that there is a wide range of genes necessary for blastocyst implantation, including cyclooxygenase-2 (COX-2), heparin-binding epidermal growth factor (EGF), Dickkopf-1 (DKK 1) and interleukin 11 (IL-11).<sup>54</sup> Thus, the impact of p53 over *LIF* levels may be variable across populations provided that other factors may maintain normal *LIF* expression in spite of low p53. Second, the anti-apoptotic behavior of low levels of p53 in general and of the P72 allele in particular may indicate an effect after implantation, enhancing the chance for a double pregnancy to succeed to term. Twin conceptions in humans are not rare. However, the frequency of multiple pregnancies that continue to birth is considerably rarer. Multiple pregnancies may constitute more than 12%

of all natural conceptions, of which number about 2% survive to term as twins and about 12% result in single births.<sup>55</sup> For example, Norimura et al (1996)<sup>18</sup> found that abnormal embryos induced by ionizing radiation were maintained at higher percentage in p53-deficient mice, while p53-proficient embryos die, most likely through apoptosis. In addition, Ucisik-Akkaya et al. (2010)<sup>19</sup> showed that wild-type genotypes of *TP53*, *LIF* and *MDM2* can alter male probability of survival, acting in a sex-specific manner after implantation, even though the physiological explanation for this disparity is still unclear. Thus it is reasonable to suppose that mechanisms which are less effective in inducing apoptosis could increase the probability of an embryo's survival. Such general mechanisms would be compatible with the increased prevalence of both dizygotic and monozygotic twin births, as observed in Cândido Godói.

Furthermore, it is interesting to observe that P72 and T allele are more prevalent in African populations (around 70%) than in European (around 25%) and Brazilian ones (around 30%).<sup>56-58</sup> Coincidentally African populations show the highest rate of twin births.<sup>59,60</sup> However, recent data about ethnic differences in infertility indicates that women with African ancestry have significant reductions (25%–38%) in live birth rates after IVF when compared with cohorts of women of European ancestry.<sup>61-64</sup> This apparent contradiction provides further possible evidence that the role of p53 on human fertility is not related only to implantation period, but that this protein may be crucial after implantation, increasing the chance of embryonic survival.

Previous studies suggest that increased parity and a higher body mass index are factors influencing multiple pregnancy.<sup>27,28</sup> However, in our study, only number of pregnancies shows association with twinning. In spite of this significant association, *TP53* seems to be the variable conferring the highest increase in relative risk for twinning in this population as suggested by the logistic regression analysis.

Although our sample size was limited by the total number of twins' mothers resident in such a small town as Cândido Godói, there is also the advantage of investigating a population with low levels of gene flow and with a known history of a founder effect.<sup>65,66</sup> The control group was composed of mothers of singletons from the same location to minimize the interference of environmental factors, as both groups were exposed to the same kind of hazards and experiences. Moreover, the founder effect which happened during the colonization of CG may act as a confounding variable since all polymorphisms whose frequency changed due to this founder effect would result in false-positive

association signals if a control group composed of women of other localities was used. It must be emphasized that our findings were observed in a small population with a very specific history and ethnic background. Twinning is a complex phenomenon and therefore we could expect a wide variation in the relative risks of different genetic polymorphisms across populations, as variants conferring high risk in one population may only confer a minor risk in another. A much larger sampling would be necessary to find a statistically significant result. Nevertheless, the results presented in this study suggest a genetic explanation for the high increase in twinning rate in Cândido Godói and also suggest a new, testable, role for p53 on reproduction.

**Table 1. Characteristics of the study population.**

<b>Characteristic</b>	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>	<b>P-value</b>
Number of pregnancies, mean	3.1 (n= 36)	2.1 (n= 101)	0.007*
Age at first pregnancy, mean	24.5 (n= 36)	24.2 (n= 96)	0.717*
Age at the moment of questionnaire, mean (only women younger than 50)	39.1 (n= 19)	38.8 (n= 22)	0.872*
Women with positive history for spontaneous abortions	9 (n= 36)	12 (n= 100)	0.113 <sup>#</sup>
Cancer incidence in first degree relatives	47% (17/36)	23% (23/100)	0.011 <sup>#</sup> ×
BMI, mean	21.4	22.3	0.336 <sup>¥</sup>

BMI (Body Mass Index)

\* Independent Samples T Test

<sup>#</sup> Chi-square

× OR (95% CI) = 3.00 (1.34-6.68)

<sup>¥</sup> Mann-Whitney

**Table 2. Frequency of SNPs on genes in the p53 pathway analyzed in mothers of twins (cases) and singletons (controls).**

SNP	Cases % (N)	Controls % (N)	OR (95% CI)	P-value
<b><i>TP53 (rs1042522)</i></b>				
	N= 42	N= 101		
GG	45.2 (19)	72.3 (73)	1.00	
CG	42.9 (18)	24.8 (25)	2.76 (1.2-6.08)	0.017
CC	11.9 (5)	3.0 (3)	6.40 (1.4-29.2)	0.026
G	66.7 (56)	84.7 (171)		0.0006 <sup>#</sup>
C	33.3 (28)	15.3 (31)		
<b><i>MDM4 (rs1563828)</i></b>				
	N= 42	N= 101		
CC	28.6 (12)	43.6 (44)	1.00	
TC	45.2 (19)	43.6 (44)	1.58 (0.68-3.64)	0.382
TT	26.2 (11)	12.9 (13)	3.10 (1.11-8.6)	0.052
C	51.2 (43)	65.3 (132)		0.025 <sup>#</sup>
T	48.8 (41)	34.7 (70)		
<b><i>MDM2 (rs2279744)</i></b>				
	N= 40	N= 95		
TT	35.0 (14)	44.2 (42)	1.00	
TG	45.0 (18)	42.1 (40)	1.35 (0.59-3.07)	0.611
GG	20.0 (8)	13.7 (13)	1.84 (0.63-5.37)	0.395
G	42.5 (34)	34.7 (66)		0.227 <sup>#</sup>
T	57.5 (46)	65.3 (124)		
<b><i>HAUSP (rs1529916)</i></b>				
	N= 42	N= 101		
CC	47.6 (20)	57.4 (58)	1.00	
CT	45.2 (19)	39.6 (40)	1.37 (0.65-2.9)	0.514
TT	7.1 (3)	3.0 (3)	2.90 (0.54-15.5)	0.415
C	70.2 (59)	77.2 (156)		0.212 <sup>#</sup>
T	29.8 (25)	22.8 (46)		
<b><i>LIF (rs929271)</i></b>				
	N= 42	N= 101		
TT	40.5 (17)	45.5 (46)	1.00	
TG	47.6(20)	48.5 (49)	1.10 (0.51-2.36)	0.951
GG	11.9 (5)	5.9 (6)	2.25 (0.60-8.36)	0.379
G	35.7 (30)	30.2 (61)		0.361 <sup>#</sup>
T	64.3 (54)	69.8 (141)		

<sup>#</sup> Chi-square

**Table 3. Logistic regression analyses considering the number of pregnancies, genotypes at *TP53* and *MDM4*.**

	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>Wald</b>	<b>OR (CI 95%)</b>	<b>P-value</b>
<b><i>TP53</i></b>	1.004	0.350	8.253	2.730 (1.37 – 5.41)	0.004
<b><i>MDM4</i></b>	- 0.589	0.556	1.124	0.555 (0.18 – 1.65)	0.289
<b>Npreg</b>	0.531	0.169	9.906	1.701 (1.22-2.37)	0.002
<b>Constant</b>	-2.721	1.263	4.647	0.066	0.031

Npreg: number of pregnancies

## References

- 1 Tagliani-Ribeiro A, Oliveira M, Sassi AK, et al. Twin Town in South Brazil: A Nazi's Experiment or a Genetic Founder Effect? *PLoS One* 2011 6(6): e20328.
- 2 Camarasa J. Josef Mengele: O Anjo da Morte na América do Sul. Buenos Aires, Argentina: Grupo Editorial NORMA, 2008.
- 3 Roche, Jean. A colonização alemã e o Rio Grande do Sul. Brasil, Porto Alegre: Globo, 1969.
- 4 Matte U, Le Roux MG, Bénichou B, Moisan JP, Giugliani R. Study on possible increase in twinning rate at a small village in south Brazil. *Acta Genet. Med Gemellol* 1996; 45: 431-37.
- 5 Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.
- 6 Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 1979; 31: 472-83.
- 7 Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984; 312: 646–9.
- 8 Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531–9.
- 9 Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 259-65.
- 10 Mandinova A, Lee SW. The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Sci Transl Med* 2011; 3:64rv1.
- 11 Manfredi JJ. The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev* 2010; 24: 1580–89.
- 12 Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 299–309.
- 13 Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W. The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 2007; 26:7262–66.
- 14 Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007; 450: 721–24
- 15 Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB. p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 492–96.
- 16 Kang HJ, Feng Z, Sun Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1-6.



- 17 Feng Z, Zhang C, Kang HJ, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 2011; [Epub ahead of print].
- 18 Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y, Kondo S. p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med* 1996; 2: 577-80.
- 19 Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Do TN, et al. Examination of genetic polymorphisms in newborns for signatures of sex-specific prenatal selection. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 770-7.
- 20 Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
- 21 Levine AJ, Hu W, Feng Z. (2006) The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13: 1027–36.
- 22 Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24: 2899–08.
- 23 Wu X, Zhao H, Amos CI, et al. p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:681–90
- 24 Chen Y-C, Xu L, Guo Y-LL, et al. Genetic polymorphism in p53 codon and skin cancer in southwestern Taiwan. *J Env Science Health* 2003; 38:201–11.
- 25 Fang S, Krahe R, Lozano G, et al. Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. *PLoS One* 2010 5: e10813.
- 26 Shur N. The genetics of twinning: From splitting eggs to breaking paradigms. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2009; 151C: 105–09.
- 27 Hoekstra C, Zhao ZZ, Lambalk CB, et al. Dizygotic twinning. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 37–47.
- 28 Bulmer MG. The Biology of Twinning in Man. Oxford, United Kingdom: Oxford Clarendon Press, 1970.
- 29 Steinman G. Mechanisms of twinning: VII. Effect of diet and heredity on the human twinning rate. *J Reprod Med* 2006; 51: 405-10.
- 30 Rende RD, Plomin R, Vandenberg SG. Who discovered the twin method? *Behav Genet* 1990; 20: 277-85.
- 31 Al-Hendy A, Moshynska O, Saxena A, Feyles V. Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 2000; 356: 914.
- 32 Busjahn A, Knoblauch H, Faulhaber HD, et al. A region on chromosome 3 is linked to dizygotic twinning. *Nat Genet* 2000; 26: 398–99.
- 33 Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C-->T mutation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2659-62.
- 34 Montgomery GW, Duffy DL, Hall J, Kudo M, Martin NG, Hsueh AJ. Mutations in the follicle-stimulating hormone receptor and familial dizygotic twinning. *Lancet* 2001a; 357: 773–74.
- 35 Derom C, Groenen P, Vlietinck R. Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet* 2001; 357: 230–31.

- 36 Montgomery GW, Zhao ZZ, Morley KI, Marsh A J, Boomsma DI, Martin NG, Duffy DL. Dizygotic twinning is not associated with methylenetetrahydrofolate reductase haplotypes. *Hum Reprod* 2003; 18: 2460–64.
- 37 Montgomery GW, Zhao ZZ, Marsh AJ, et al. A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. *Twin Res* 2004; 7: 548–55.
- 38 Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, et al. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4713–16.
- 39 Derom C, Jawaheer D, Chen WV, et al. Genome-wide linkage scan for spontaneous DZ twinning. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:117–22.
- 40 Painter JN, Willemsen G, Nyholt D, et al. A genome wide linkage scan for dizygotic twinning in 525 families of mothers of dizygotic twins. *Human Reproduction* 2010; 25: 1569–80.
- 41 Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004; 108: 196–99.
- 42 Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet* 2006; 38: 1133–41.
- 43 Jeong BS, Hu W, Belyi V, Rabadan R, Levine AJ. Differential levels of transcription of p53-regulated genes by the arginine/proline polymorphism: p53 with arginine at codon 72 favors apoptosis. *FASEB J* 2010; 24: 1347–53.
- 44 Wade M, Wahl GM. Targeting Mdm2 and Mdmx in cancer therapy: Better living through medicinal chemistry? *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1–11.
- 45 Atwal GS, Kirchhoff T, Bond EE. Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10236–41.
- 46 Kadakia M, Slader C, Berberich SJ. Regulation of p63 function by Mdm2 and MdmX. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 321–330.
- 47 Zdzalik M, Pustelny K, Kedracka-Krok S, et al. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle* 2010; 15: 4584–91.
- 48 Evans J, Catalano RD, Brown P, et al. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 2009; 23: 2165–75.
- 49 Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, et al. Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biol Reprod* 1997; 56: 1274–80.
- 50 Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1995; 39: 233–8.
- 51 Stewart CL. Reproduction: the unusual suspect. *Nature* 2007; 450: 619.
- 52 Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, et al. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000 141: 4365–72.
- 53 Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; 76: 1091–6.

- 54 Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 2008; 149: 2877–87.
- 55 Boklage CE. Survival probability of human conceptions from fertilization to term. *Int J Fertil* 1990; 35:75, 79-80, 81-94.
- 56 Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; 44: 266-70.
- 57 Tornesello ML, Waddell KM, Duraturo ML, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk of conjunctival squamous cell carcinoma in Uganda. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 501-8.
- 58 Marcel V, Hainaut P. p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 391-406.
- 59 Nylander PP. The frequency of twinning in a rural community in Western Nigeria. *Ann Hum Genet* 1969; 33: 41–44.
- 60 Little J. Descriptive epidemiology. In: MacGillivray I, Campbell DM, Thompson B (eds). *Twinning and twins*. New York, New York, 1988.
- 61 Seifer DB, Frazier LM, Grainger DA. Disparity in assisted reproductive technologies outcomes in black women compared with white women. *Fertil Steril* 2008; 90:1701–10.
- 62 Fujimoto VY, Luke B, Brown MB, et al. Racial and ethnic disparities in assisted reproductive technology outcomes in the United States. *Fertil Steril* 2010; 93: 382–90.
- 63 Seifer DB, Zackula R, Grainger DA. Trends of racial disparities in assisted reproductive technology outcomes in black women compared with white women: Society for Assisted Reproductive Technology 1999 and 2000 vs. 2004–2006. *Fertil Steril* 2010; 93:626–35.
- 64 Huddleston HG, Cedars MI, Sohn SH, Giudice LC, Fujimoto VY. Racial and ethnic disparities in reproductive endocrinology and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 413-9.
- 65 Charow J. Ashkenazi Jewish genetic disorders. *Fam Can* 2004; 3: 201-06.
- 66 Zlotogora J. Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations. *Eur J Hum Gen* 2007; 15: 272-78.

## **CAPÍTULO 5**

**ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS Asn680Ser *FSHR* e 677C→T *MTHFR***

---

Neste capítulo apresentamos as análises dos polimorfismos nos genes *FSHR* (receptor do hormônio folículo estimulante) e *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase). Estes resultados farão parte de um manuscrito que será elaborado posteriormente e, portanto, serão apresentados brevemente no corpo da dissertação como um capítulo separado.

Gêmeos DZ são frutos da fertilização de dois óvulos liberados no mesmo ciclo menstrual. A concentração de FSH é responsável pela seleção do “folículo dominante”, ou seja, do maior folículo (Messinis et al., 2010). O crescimento de múltiplos folículos ocorre na época da seleção folicular, ou quando a concentração de FSH está muito alta ou quando as concentrações de FSH excedem o limiar por muito tempo (Baird, 1987; Schoemaker et al., 1993). Portanto, genes desta rota controladora da síntese, liberação e de atividade do FSH são bons candidatos para o aumento da frequência de gêmeos DZ.

O polimorfismo Asn680Ser no gene *FSHR* parece aumentar a sensibilidade do receptor de FSH e conseqüentemente aumentar a ocorrência de gêmeos DZ (Al-Hendy et al., 2000). Apesar de um estudo ter associado esse polimorfismo com nascimentos de gêmeos DZ (Al-Hendy et al., 2000), na nossa amostra não houve associação deste polimorfismo com gemelaridade tanto DZ quanto MZ (Tabela 1 e Tabela 2), estando de acordo com outros dados da literatura (Montgomery et al., 2001; Derom et al., 2001).

**Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Asn680Ser *FSHR* entre casos e controles.**

	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>P-value</b>
<b>Alelo</b>			
G	21,5% (9)	26,7% (27)	0,551*
A	78,5% (33)	73,3% (74)	
<b>Genótipo</b>			
<b>Modelo Co-dominante</b>			
GG	21,4% (9)	26,7% (27)	0,797*
GA	52,4% (22)	49,5% (50)	
AA	26,2% (11)	23,8% (24)	
<b>Modelo recessivo</b>			
AA	26,2% (11)	23,7% (24)	0,925*
GG+AA	73,8% (31)	76,3% (77)	
<b>Modelo dominante</b>			
AA+GA	78,5% (33)	73,3% (74)	0,505*
GG	21,5% (9)	26,7% (27)	

\* Qui-quadrado

**Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Asn680Ser *FSHR* em mães de gêmeos analisadas por tipo de gêmeo.**

<b>Genótipo/Alelo</b>	<b>Tipo de gêmeo</b>		<b>P-value</b>
	<b>DZ (n= 20)</b>	<b>MZ (n= 11)</b>	
GG	25,0% (5)	36,4% (4)	0,294 <sup>&amp;</sup>
GA	65,0% (13)	36,4% (4)	
AA	10,0% (2)	27,2% (3)	
G	57,5% (23)	54,5% (12)	0,965*
A	42,5% (17)	45,5% (10)	

<sup>&</sup> Teste-G (Williams)

\* Qui-quadrado

Apesar de possuir uma taxa de nascimentos gemelares mais alta do que outras localidades (Tagliani-Ribeiro et al., 2011), a proporção de gêmeos DZ/MZ em Cândido

Godói não difere de outras populações (Tabela 3), sugerindo a ação de um mecanismo comum responsável por aumentar as freqüências tanto de gêmeos DZ quanto de MZ. Descartando a associação de mecanismos que controlam a ovulação, decidimos estudar nessa população genes que possam influenciar no desenvolvimento dos embriões.

**Tabela 3. Proporção de nascimentos gemelares em Cândido Godói (CG) e em outras populações.**

	<b>CG</b>	<b>Bélgica<sup>[1]</sup></b>	<b>P-value<sup>#</sup></b>	<b>Coréia<sup>[2]</sup></b>	<b>P-value<sup>*</sup></b>
<b>DZ</b>	71% (29/41)	68% (10.069/14.712)	0,892	71% (404/569)	0,912
<b>MZ</b>	29% (12/41)	32% (4.643/14.712)	0,818	29% (165/569)	0,886

\*Qui-quadrado

<sup>[1]</sup> Gielen M, et al. Secular trends in gestational age and birthweight in twins. Hum Reprod 2010; 25: 2346-53

<sup>[2]</sup> Lee KA, et al. The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. Twin Res Hum Gent 2010; 13: 609-19

O suplemento de folato é um fator importante para o desenvolvimento do embrião. Em gestações múltiplas, a demanda de ácido fólico está aumentada, em consequência do rápido crescimento dos embriões nas primeiras semanas de gestação (Tremblay et al. 1989). Um estudo sugere que o polimorfismo 677 C→T no gene *MTHFR* está envolvido com chance de sobrevivência do embrião por ter influência direta em seu desenvolvimento (Hasbargen et al., 2000). Essa substituição aumentaria a dependência de ácido fólico para a enzima MTHFR funcionar corretamente, resultando em perdas gestacionais indetectáveis em mulheres TT e TC que não possuem o suplemento de folato adequado. Assim, seria esperada uma maior frequência do alelo C em mães de gêmeos. Porém, nossa análise não sugere que haja associação desse alelo com gravidez de gêmeos DZ ou MZ em Cândido Godói (Tabela 4 e Tabela 5).

**Tabela 4. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo 677C→T *MTHFR*.**

	<b>Casos</b> % (N)	<b>Controles</b> % (N)	<b>P-value</b>
<b>Alelo</b>			
C	71,4% (60)	66,3% (134)	0,401*
T	28,6% (24)	33,7% (68)	
<b>Genótipo</b>			
<b>Modelo Co-dominante</b>			
CC	50,0% (21)	43,6% (44)	0,689&
CT	42,9% (18)	45,5% (46)	
TT	7,10% (3)	10,9% (11)	
<b>Modelo recessivo</b>			
TT	7,10% (3)	10,9% (11)	0,701#
CC+CT	92,9% (39)	89,1% (90)	
<b>Modelo dominante</b>			
TT+CT	50% (21)	56,4% (57)	0,481*
CC	50% (21)	43,6% (44)	

\* Qui-quadrado

& Teste-G (Williams)

# Teste-G (Yates)

**Tabela 5. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo 677C→T *MTHFR* em mães de gêmeos analisadas por tipo de gêmeo.**

<b>Genótipo/Alelo</b>	<b>Tipo de gêmeo</b>		<b>P-value</b>
	<b>DZ (n= 20)</b>	<b>MZ (n= 11)</b>	
CC	45,0% (9)	45,4% (5)	0,997&
CT	45,0% (9)	45,4% (5)	
TT	10,0% (2)	9,2% (1)	
C	67,5% (27)	68,2% (15)	0,818*
T	32,5% (13)	31,8% (7)	

& Teste-G (Williams)

\* Qui-quadrado



## **CAPÍTULO 6**

### **DISCUSSÃO**

---

Nascimento de gêmeos é um evento que sempre despertou a curiosidade dos seres humanos. Apesar dos avanços tecnológicos que possibilitaram a elucidação de muitos mistérios biológicos, a ocorrência da gemelaridade ainda é um assunto sem respostas conclusivas. O que faz uma mulher ter filhos duplos? Como ela consegue gerar dois, às vezes mais, indivíduos em um sistema reprodutor adaptado para carregar somente um (Haukioja et al., 1989)? Ter filhos gêmeos é resultado somente de fatores genéticos? Essas perguntas ainda são objeto de várias pesquisas ao redor do mundo.

Este trabalho teve como objetivo obter mais conhecimento sobre a etiologia da gemelaridade através da caracterização genética e epidemiológica dos nascimentos gemelares no município de Cândido Godói - RS. Internacionalmente reconhecido pela sua recorrência de nascimentos gemelares, o município se tornou alvo de especulação por parte da imprensa leiga. Baseados em um livro de um jornalista argentino, jornais com circulação internacional vincularam os gêmeos de Cândido Godói a experimentos do médico nazista Josef Mengele.

No nosso primeiro artigo descartamos a hipótese de que a alta taxa de gemelaridade no município seja resultado de experimentos nazistas. A comparação dos registros dos nascimentos gemelares ocorridos antes e depois da suposta visita de Mengele, no início da década de 1960, a análise dos sobrenomes de mulheres com e sem filhos gêmeos, juntamente com a história do município, indicam que a ação de fatores genéticos potencializados por um efeito fundador ocorrido durante a colonização de Cândido Godói é a hipótese mais plausível para explicar o fenômeno dos gêmeos.

Assim sendo, os perfis genéticos de 42 mães de gêmeos e 101 mães de não gêmeos naturais de Cândido Godói foram comparados baseados na genotipagem de polimorfismos em sete genes. Foram estudados genes envolvidos no mecanismo de ovulação (*FSHR*), desenvolvimento do embrião (*MTHFR*) e implantação do blastocisto (*TP53*, *MDM2*, *MDM4*, *LIF* e *USP7*, todos na “rota da p53”).

Não encontramos associação entre o polimorfismo Asn680Ser do gene *FSHR* e nascimentos de gêmeos. Baseados nas análises de livros de batismo e nos testes de zigosidade verificamos que tanto a taxa de nascimentos de gêmeos dizigóticos (DZ) como de monozigóticos (MZ) estão aumentadas em Cândido Godói. Sugerindo a ação de um mecanismo comum responsável pelo aumento dos nascimentos gemelares no município.

Genes que possam influenciar no desenvolvimento do embrião e na implantação do blastocisto são bons candidatos para explicar a alta frequência de gêmeos DZ e MZ. Sabe-se que no mínimo 12% das concepções naturais são gestações de gêmeos, porém na grande maioria, ambos os embriões serão perdidos sem que a mulher tome conhecimento da gravidez (Boklage, 1990). Apesar de não haver associação entre o polimorfismo 677 C→ T do gene *MTHFR*, dois genes da rota da p53 foram associados com nascimentos duplos.

A implantação do blastocisto no útero é um fator crítico no desenvolvimento embrionário dos mamíferos. Nessa etapa o blastocisto estabelece uma interação íntima com o tecido uterino a qual leva à formação da placenta, que vai servir de suporte para o crescimento e desenvolvimento do feto (Hu, 2008). Estudos recentes sugerem que a proteína p53 regula a eficiência da reprodução humana através da regulação transcricional do Fator Inibitório da Leucemia (LIF), um fator crucial para a implantação do blastocisto (Chen et al., 2000; Lass et al., 2001). Corroborando essa hipótese, SNPs em genes da rota da p53 foram associados com mulheres inférteis (Kay et al., 2006; Kang et al., 2009; Feng et al., 2011).

Nossas análises de cinco SNPs em genes da rota da p53 obtiveram um resultado interessante. Foi observada associação do alelo P72 do gene *TP53* e do alelo T do gene *MDM4* com gemelaridade. Estudos sugerem que esses alelos, além de estarem envolvidos nos mecanismos de supressão tumoral, estariam relacionados com infertilidade por diminuírem a expressão de LIF. Esse resultado contraditório pode ser explicado por observações como: existem outros fatores além da p53 que induzem a expressão de LIF (Evans et al, 2009; Sawai K et al, 1997; Stewart, 2007) e já foi demonstrado que vários outros genes possuem um papel tão importante como o do LIF para o sucesso da implantação do blastocisto (Evans et al., 2008). Porém, por serem alelos que resultam em apoptose menos eficiente, uma hipótese alternativa é que esses alelos aumentariam a probabilidade de sobrevivência dos dois embriões, quando o mais comum seria a eliminação de pelo menos um (Boklage, 1990). Trabalhos demonstrando que camundongos com apoptose deficiente mantêm em maior porcentagem suas gestações (Norimura et al., 1996) e que, a combinação do alelo P72 com genótipos selvagens de *MDM2* e *LIF* altera a probabilidade de sobrevivência de bebês do sexo masculino (Ucisik-Akkaya et al., 2010), são evidências que suportam a hipótese de que os genes da rota da p53 possuiriam um papel importante no período pós-implantação.

Nossos resultados sugerem uma explicação genética para o grande aumento na taxa de gemelaridade em CG e também apontam para uma possível nova função dos genes da rota da p53 na reprodução humana. Entretanto, mais estudos devem ser realizados em coortes maiores e grupos com diferentes *backgrounds* genéticos para a validação dos resultados.

## **Referências**

---

Aghajanova L (2004) Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann NY Acad Sci* 1034:176-183.

Al-Hendy A, Moshynska O, Saxena A e Feyles V (2000) Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 356:914.

Asklund C, Jensen TK, Jorgensen N, Tabor A, Sperling L e Skakkebaek NE (2007) Twin pregnancy possibly associated with high semen quality. *Hum Reprod* 22:751–755.

Atwal GS, Kirchhoff T, Bond EE, Monagna M, Menin C, Bortorelle R, Scaini MC, Bartel F, Böhnke A, Pempe C, et al (2009) Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10236–10241.

Baird DT (1987) A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation. *J Steroid Biochem* 27:15–23.

Baldo G, Ayala A, Melendez M, Nonnemacher K, Lima L, Segal SL, Kieling C, Vieira SG, Ferreira CT, et al (2008) Prevalence of the serpin peptidase inhibitor (alpha-1-antitrypsin) PI\*S and PI\*Z alleles in Brazilian children with liver disease. *Gen Mol Bio* 31:423-426.

Barrai I, Rodríguez-Larralde A, Mamolini E, et al. (2000) Elements of the surname structure of Austria. *Ann Hum Biol* 27:607–622.

Basso O, Nohr EA, Christensen K e Olsen J (2004) Risk of twinning as a function of maternal height and body mass index. *JAMA* 291:1564–1566.

Becker K, Marchenko ND, Palacios G e Molt UM (2008) A role of HAUSP in tumor suppression in a human colon carcinoma xenograft model. *Cell Cycle* 7:1205-1213.

Beiguelman B e Franchi-Pinto C (2000) Perinatal mortality among twins and singletons in a city in southeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 23:15-23.

Bergamaschi D, , Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T e Lu X. (2006) iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet* 38:1133–1141.

Berry RJ e Kihlberg R (2005) Folic acid supplementation is not associated with an increase in dizygotic twinning. *Early Hum Dev* 81:465–467.

Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finnell RH e Hecht JT (2011) Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:50-60.

Boklage CE (1990) Survival probability of human conceptions from fertilization to term. *Int J Fertil* 35:75, 79-80, 81-94.

Boomsma DI, Frants RR, Bank RA e Martin NG (1992) Protease inhibitor (Pi) locus, fertility and twinning. *Hum Genet* 89:329-332.

Bortolus R, Parazzini F, Chatenoud L, Benzi G, Bianchi MM e Marini A (1999) The epidemiology of multiple births. *Hum Reprod Update* 5:179–187.

Bronberg RA, Dipierri JE, Alfaro EL, Barraí I, Rodríguez-Larralde A, Castilla EE, Colonna V, Rodríguez-Arroyo G e Bailliet G (2009) Isonymy structure of Buenos Aires city. *Hum Biol* 81:447-461.

Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y e Gu W (2007) The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26:7262–7266.

Bulmer MG (1970) *The Biology of Twinning in Man*. Oxford: Oxford Clarendon Press.

Busjahn A, Knoblauch H, Faulhaber HD, Aydin A, Uhlmann R, Tuomilehto J, et al (2000) A region on chromosome 3 is linked to dizygotic twinning. *Nat Genet* 26:398–399.

Camarasa J (2008) *Josef Mengele: O Anjo da Morte da na América do Sul*. Buenos Aires: Grupo Editorial NORMA.

Campbell DM (2005) Natural Factors Influencing Multiple Gestation: Perspectives from long-term observations in Scotland. In: Blickstein I, Keith LG, Keith DM (eds). *Multiple Pregnancy* 2nd edn. London and New York: Taylor and Francis Group London and New York.

Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE ([http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados\\_divulgados/index.php?uf=43](http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php?uf=43) – acessado 17/06/2011).

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L e Stewart CL (2000) Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 141: 4365–4372.

Creinin M e Keith LG (1989) The Yoruba contribution to our understanding of the twinning process. *J Reprod Med* 34:379-387.

Crow JF e Mange AP (1965) Measurements of inbreeding from frequency of marriages between persons of the same surnames. *Eugen Q* 12:199–203.

Cyranoski D (2009) Developmental biology: Two by two. *Nature* 16:826-829.

de Serres FJ, Blanco I e Fernández-Bustillo E (2009) Estimates of PI\*S and PI\*Z Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles prevalence in the Caribbean and North, Central and South America. *Monaldi Arch Chest Dis* 71:96-105.

Degioanni A, Darlu P e Raffoux C (2003) Analysis of the French National Registry of unrelated bone marrow donors, using surnames as a tool for improving geographical localisation of HLA haplotypes. *Eur J Hum Genet* 11:794-801.

Derom R, Orlebeke J, Eriksson A e Thiery M (1995) The epidemiology of multiple births in Europe. In: Keith LG, Papiernik E, Keith DM, Luke B, eds. *Multiple Pregnancy*. 1st ed. London: Parthenon Publishing Group.

Derom C, Groenen P e Vlietinck R (2001) Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet* 357:230–231.

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

Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, Clark I, Paiva P, Kovacs G e Salamonsen LA (2006) Interleukin- 11, IL-11 receptor  $\alpha$  and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 69:53-64.

Duffy D, Montgomery G, Treloar S, Birley A, Kirk K, et al (2001) IBD sharing around the PPARG locus is not increased in dizygotic twins or their mothers. *Nat Genet* 28:315.

Ericson A, Kallen B e Aberg A (2001) Use of multivitamins and folic acid in early pregnancy and multiple births in Sweden. *Twin Res* 4:63–66.

Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN (2008) Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 149:2877–87.

Evans J, Catalano RD, Brown P, et al (2009) Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 23:2165-75.

Fauser BC, Devroey P e Macklon NS (2005) Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 365:1807–1816.

Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ e Hu W (2011) Regulation of female reproduction by p53. *FASEB J* [no prelo].

Geyer RK, Yu ZK e Maki CG (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol* 2: 569–573.

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

Glianaia SV, Rankin J e Wright C (2008) Congenital anomalies in twins: A register based study. *Hum Reprod* 23:1306–1311.

Hall JG (2003) Twinning. *Lancet* 362:735-743.

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

Hambartsoumian E (1998) Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 39(2):137-43.



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

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

Haukioja E, Lemmetyinen R e Pikkola M (1989) Why are twins so rare in *Homo sapiens*? *Am. Nat.* 133: 572–577.

Hayden MR, Hopkins HC, Macrea M e Beighton PH (1980) The origin of Huntington's chorea in the Afrikaner population of South Africa. *S Afr Med J* 58:197-200.

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

Hu M, Gu L, Li M, Jeffrey PD, Gu W e Shi Y (2006) Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway. *PLoS Biol*; 4: 228-239.

Hu W, Feng Z, Teresky AK e Levine AJ (2007) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450:721–724.

Huang L, Yan Z, Liao X, Li Y, Yang J, Wang ZG, Zuo Y, Hawaii H, Shadfan M, Ganapathy S e Yuan ZM (2011) The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* [no prelo].

Kallen K (1998) Maternal smoking and twinning. *Twin Res* 1:206–211.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy WE, Rebbeck T, Rosenwaks Z, Levine AJ e Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:1-6.

Kay C, Jeyendran RS, e Coulam CB (2006) p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online* 13:492–496.

Keith L (1994) Mortality and morbidity among twins: recent observations from the United States. *Acta Genet. Med Gemellol* 43:25-31.

King TE e Jobling MA (2009) What's in a name? Y chromosomes, surnames and the genetic genealogy revolution. *Trends Gent* 25:351-360

Laberge AM, Michaud J, Richter A, Lemyre E, Lambert M, Brais B e Mitchell GA (2005) Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet* 68:287-301.

Lambalk CB, De Koning CH e Braat DD (1998) The endocrinology of dizygotic twinning in human. *Mol Cell Endo* 145:97–102.

Lass A, Weiser W, Munafo A e Loumayer E (2001) Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 76:1091-2006.

Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW e Melino G (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:259-265.

Lewis CM, Healey SC e Martin NG (1996) Genetic contribution to DZ twinning. *Am J Med Genet* 61:237-246.

Li Z, Gindler J, Wang H, Berry RJ, Li S, Correa A, Zheng JC, Erickson JD e Wang Y (2003) Folic acid supplements during early pregnancy and likelihood of multiple births: a population-based cohort study. *Lancet* 361:380–384.

Loyo MA, de Guerra DC, Izaguirre MH e Rodriguez-Larralde A (2004) Admixture estimates for Churuguara, a Venezuelan town in the State of Falcón. *Ann Hum Biol* 31:669-680

MacGillivray I e Campbell DM (1978) The physical characteristics and adaptations of women with twin pregnancies. *Prog Clin Biol Res* 24:81–86.

MacGillivray I, Samphier M, Little J, Ian M, Dorris MC e Barbara T (1988) Factors affecting twinning. In: MacGillivray I, Campbell DM, Thompson B (eds). *Twinning and twins*, New York: John Wiley and Sons New York.

Machin G (2009) Familial Monozygotic Twinning: A report of seven pedigrees. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C:152–154.

Marine J-C, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F e Lozano G (2006) Keeping p53 in check essential and synergistic functions of Mdm2 and MdmX. *Cell Death Differ* 13:927-934.

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

Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. Harvard university press, Cambridge, MA.

McBride OW, Merry D e Givol D (1986) The gene of human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA* 83:130-134.

Messinis IE, Messini CI e Dafopoulos K (2010) The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci* 1205:5-11.

Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, Teunisse AF, Ovaas H, Abraham TE, Dirks RW e Jochemsen AG (2005a) Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell* 18:565-576.

Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y e Jochemsen AG (2005b) ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle* 4:1166-1170.

Mikołajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K e Wirstlein P (2003) The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol* 3:259-270.

Mikołajczyk M, Wirstlein P e Skrzypczak J (2007) The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women—a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 58:65–74.

Montgomery GW, Duffy DL, Hall J, Kudo M, Martin NG e Hsueh AJ (2001) Mutations in the follicle-stimulating hormone receptor and familial dizygotic twinning. *Lancet* 357:773–774.

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

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

Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y e Kondo S (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med* 2:577-580.

Nylander PP (1969) The frequency of twinning in a rural community in Western Nigeria. *Ann Hum Genet* 33:41–44.

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

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

Olsen J, Bonnelykke B e Nielsen J (1988) Tobacco smoking and twinning. *Acta Med Scand* 224:491–494.

Painter JN, Willemsen G, Nyholt D, Hoekstra C, Duffy DL, Henders AK, Wallace L, Healey S, Cannon-Albright LA, et al (2010) A genome wide linkage scan for dizygotic twinning in 525 families of mothers of dizygotic twins. *Hum Reprod* 25:1569-1580

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

Parazzini F, Chatenoud L, Benzi G, Di Cintio E, Dal Pino D, Tozzi L e Fedele L (1996) Coffee and alcohol intake, smoking and risk of multiple pregnancy. *Hum Reprod* 11:2306–2309.

Parisi P, Gatti M, Prinzi G e Caperna G (1983) Familial incidence of twinning. *Nature* 304:626–628.

Pim D e Banks L (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108:196–199.

Randolph JF Jr, Sowers M, Gold EB, Mohr BA, Luborsky J, Santoro N, McConnell DS, Finkelstein JS, et al (2003) Reproductive hormones in the early menopausal transition: relationship to ethnicity, body size, and menopausal status. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1516-1522.

RESOLUÇÃO CFM nº 1.957/10 (<http://www.sindmedgabc.com.br/> - acessado 01/07/2011).

Ridley M (2006) Eventos Aleatórios na Genética de Populações. In: *Evolução*. 3ª edição. Artmed, Porto Alegre, pp. 170-184.

Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T e Levine AJ (1998) Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Eur Mol Biol Org J* 17: 554–564.

Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, et al (1997) Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biol Reprod* 56:1274–80.

Scapoli C, Mamolini E, Carrieri A, Rodriguez-Larralde A e Barraí I (2007) Surnames in Western Europe: a comparison of the subcontinental populations through isonymy. *Theor Popul Biol.* 71:37-48

Schoemaker J, van Weissenbruch MM, Scheele F e van der Meer M (1993) The FSH threshold concept in clinical ovulation induction. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 7:297–308.

Sheng Y, Saridakis V, Sarkari F, Duan S, Wu T, Arrowsmith CH e Frappier L. (2006) Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat Struct Mol Biol* 13:285-291.

Shur N (2009) The genetics of twinning: From splitting eggs to breaking paradigms. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C:105–109.

Steinman G (2000) The mechanism initiating and controlling monozygotic twinning in humans remains to be elucidated. *Twin Res* 3:337.

Steinman G (2006) Mechanisms of twinning: VII. Effect of diet and heredity on the human twinning rate. *J Reprod Med* 51:405-410

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F e Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76–79.

Stewart CL (2007) Reproduction: the unusual suspect. *Nature* 450:619.

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

Tao W e Levine AJ (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3077–3080.

Tarskaia L, El'chinova GI, Scapoli C, Mamolini E, Carrieri A, Rodriguez-Larralde A e Barrai I (2009) Surnames in Siberia: a study of the population of Yakutia through isonymy. *Am J Phys Anthropol.* 138:190-198.

Terzian T, Wang Y, Van Pelt CS, Box NF, Travis EL e Lozano G (2007) Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol Cell Biol* 27:5479–5485.

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

Tremblay GF, Matte JJ, Dufour JJ, et al (1989) Survival rate and development of fetuses during the first 30 days of gestation after folic acid addition to a swine diet. *Anim Sci* 67:724-732.

Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Do TN, Morrison BA, Stemmer SM, Amadio WJ e Tevfik Dorak M (2010) Examination of genetic polymorphisms in newborns for signatures of sex-specific prenatal selection. *Mol Hum Reprod* 16:770-777.

Wade M, Wahl GM (2009) Targeting Mdm2 and Mdmx in cancer therapy: Better living through medicinal chemistry? *Mol Cancer Res* 7:1–11.

Weinberg W (1901) Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Mehrlinggeburten beim Menschen. *Arch Gesamte Physiol* 88:346–430.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S e Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet Metab* 64:169-172.

Wolff T, Witkop CT, Miller T e Syed SB (2009) Folic acid supplementation for the prevention of neural tube defects: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 150:632-639.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15:323–354.

Xiong S, Van Pelt CS, Elizondo-Fraire AC, Liu G e Lozano G (2006) Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3226-3231.

Zlotogora J (2007) Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations. *Eur J Hum Genet* 15:272-278.



## **ANEXO 1**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Estamos estudando fatores que podem estar envolvidos no alto número de gêmeos observado no município de Cândido Godói, RS. Para isso vamos investigar desde dados geológicos (como composição da água e dos solos) até fatores biológicos (como níveis de hormônios e fatores genéticos). Também vamos analisar as histórias das famílias com e sem gêmeos do município. Para isso precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família e se existem gêmeos nela, perguntar sobre algumas situações de saúde que podem estar relacionadas ao nascimento de gêmeos e coletar amostras de sangue saliva. Também precisamos coletar amostras de água e do solo da sua casa. Além disso, se você autorizar, iremos consultar seus registros médicos em hospitais ou postos de saúde para obter informações sobre seu parto e/ou de seus filhos.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. Algumas pessoas podem preferir participar de apenas uma etapa da pesquisa e não de outras, sem que isso seja um impedimento. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é para a pesquisa de fatores envolvidos no nascimento de gêmeos, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. A coleta de sangue será feita com um pequeno furo na ponta do dedo, que pode causar dor no local. As análises dos fatores biológicos será feita no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e as análises de água e solo na Unisinos, sem nenhum custo para os participantes. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são a Profa. Lavinia Schuler-Faccini (51-2101-8011) e a bióloga Ursula Matte (51-2101- 8838), que poderão ser contatadas em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (51-2101-8304).

Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia mesmo depois de ter concordado.

### **Coleta de dados aspectos ambientais**

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

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

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

### **Coleta de material biológico (sangue)**

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

### **Coleta de material biológico (sangue)**

- Concordo em fornecer uma amostra de sangue para avaliação de níveis hormonais.
- Não concordo em fornecer uma amostra de sangue para avaliação de níveis hormonais.



**Autorização para acesso de informações de prontuários**

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

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

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

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

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

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

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

## ANEXO 2

### QUESTIONARIO ESTRUTURADO

Entrevista nº

Preenchida por:

Data:

Hora:

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

1. Nome:
2. Sobrenomes:

CASADA

SOLTEIRA

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

---

9. Onde moram (colocar cidade e endereço)?

10. Tem outros irmãos não gêmeos?

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

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

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

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

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

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

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

14. Teve outros filhos não gêmeos? Quantos?

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

16. São todos saudáveis ou há algum com problemas?

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

18. Teve gestações que terminaram em abortamento ou natimortos?

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

20. Todos seus filhos são do mesmo cônjuge?

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

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

---

PARTE A SER PREENCHIDA PARA AS FAMILIAS COM GÊMEOS

Evolução dos gêmeos:

Placenta:

Data Nascimento Mãe:

Altura da mãe:

Peso na época da gravidez:

Uso de Anticoncepcional:

Período:

Tratamento para engravidar:

Época:

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

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

Concordância para   canhoto/destro

tendência a engordar

temperamento