



**Sílvia Tadeu dos  
Anjos Pires**

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE MICROSSATÉLITES  
PARA ESTUDOS DE ZIGOTIA**





**Sílvia Tadeu dos  
Anjos Pires**

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE MICROSSATÉLITES  
PARA ESTUDOS DE ZIGOTIA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor António Nogueira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Doutora Paula Jorge, Assistente Principal da Carreira Técnica Superior de Saúde – Ramo de Genética do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães.



Dedico este trabalho ao Quim, aos meus Pais e à minha querida Avó pelo incansável apoio.



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**  
professor catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Mário Manuel da Silva Leite de Sousa**  
professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Prof. Doutor António José Arsénio Nogueira**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

**Doutora Paula Maria Vieira Jorge**  
assistente principal da carreira técnica superior de saúde do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães – INSARJ



## **agradecimentos**

A todos aqueles que, de alguma forma, me apoiaram na realização deste trabalho e tornaram possível a sua concretização, o meu sincero obrigado. Agradeço à Doutora Maximina Pinto e à Dr.<sup>a</sup> Rosário Santos por me terem aberto as portas e proporcionado a realização desta tese.

Um obrigado muito especial à Doutora Paula Jorge e ao Professor António Nogueira pela orientação prestada, por todos os ensinamentos, críticas e sugestões.

Um obrigado do tamanho do mundo, ao Quim, aos meus Pais e à minha Avó pelo apoio e carinho incondicional.



## palavras-chave

gémeos, zigotia , microssatélites.

## resumo

A incidência de um vasto leque de complicações perinatais, entre elas, malformações estruturais e funcionais, está aumentada em gémeos monozigóticos, sendo a correcta determinação pré-natal da zigotia de extrema importância para o acompanhamento clínico pré e pós-natal.

O desenvolvimento da PCR em multiplex e da análise automática de fragmentos conduziram a mudanças revolucionárias na investigação de amostras biológicas e permitiram determinar geneticamente a zigotia em pares de fetos gemelares.

A monozigotia é estabelecida quando um par de gémeos é concordante em todos os alelos estudados. No entanto, não podemos descartar a vertente probabilística desta determinação, pois um par de gémeos pode ser concordante em todos alelos estudados e ser dizigótico.

Este trabalho teve como principal objectivo a implementação de métodos bioestatísticos para calcular a probabilidade média de concluir correctamente que um par de gémeos é monozigótico quando partilha o mesmo genótipo em todos os *loci*.

O estudo incidiu sobre um grupo de 9 pares de fetos gemelares considerados “aparentemente” monozigóticos após determinação da zigotia.

Recorrendo a várias ferramentas do programa *ECLIPSE2* foi possível fazer uma análise estatística a um conjunto de microssatélites amplamente utilizados para a determinação da zigotia e aumentar a precisão dos resultados, dotando-os de uma probabilidade de monozigotia num intervalo de confiança mediante diferentes níveis de erro.



**keywords**

twins, zygosity, microsatellites.

**abstract**

The incidence of several perinatal complications, including structural and functional malformations, is increased in monozygotic twins. Thus the accurate prenatal determination of the zygosity is of extreme importance for the clinical follow up during pregnancy.

The development of multiplex PCR and automated fragment analysis lead to revolutionary changes in molecular studies of biological prenatal samples and also allowed the genetic determination of zygosity in pairs of twins.

The monozygosity is established when a pair of twins is concordant in all the studied alleles. However, we cannot discard the probabilistic basis of this determination, therefore, a pair of twins can be concordant in all studied alleles and be dizygotic.

The main purpose of this work is the implementation of biostatistic methods to calculate the average probability of monozygosity when a pair of twins share the same genotype across all *loci*.

The study was performed on a group of 9 pairs of twin fetus considered as "apparently" monozygotic after zygosity determination, starting with a subset of 8 polymorphic markers.

Using some tools of program *ECLIPSE2* it was possible to make an statistic analysis within a set of microsatellites widely used for the determination of the zygosity and increase the results accuracy, endowing them with a monozygosity probability in a confidence interval with different error rates.



# ÍNDICE

Lista de Figuras .....	iv
Lista de Tabelas .....	v
1. Introdução .....	1
1.1. Gestação Multifetal.....	1
1.1.1. A Formação dos Gémeos .....	1
1.1.2. Gémeos Monozigóticos discordantes quanto ao sexo.....	5
1.1.3. Superfecundação Heteropaternal.....	5
1.1.4. Factores que influenciam o nascimento de gémeos .....	6
1.1.5. Complicações Perinatais.....	8
Morbimortalidade.....	9
Crescimento diferencial.....	10
Morte de um dos fetos .....	12
Acardia .....	13
Gémeos siameses.....	14
Complicações maternas.....	14
1.1.6. Determinação da Corionicidade.....	15
1.1.7. Determinação da Zigotia .....	16
1.2. Diagnóstico Pré-Natal .....	19
1.2.1. Indicações para a realização do Diagnóstico Pré-Natal .....	20
1.2.2. Determinação da Zigotia no contexto do Diagnóstico Pré-Natal .....	21
1.2.3. Procedimentos para a obtenção de tecido fetal .....	22
Amniocentese.....	22
Punção de Vilosidades Coriônicas .....	23
Cordocentese .....	24
1.3. Métodos Moleculares aplicados ao estudo da Zigotia .....	25
1.3.1. Biologia Molecular e seu contributo no diagnóstico .....	25
1.3.2. PCR .....	26
QF-PCR (Quantitative fluorescent polymerase chain reaction) .....	28
1.3.3. Marcadores genéticos .....	29
1.4. Estatística e a Genética .....	31
1.4.1. A Importância do Princípio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	31
1.4.2. O Contributo das investigações de Morgan .....	32
1.4.3. Estatística aplicada à determinação da Zigotia .....	33
1.5. Objectivo.....	36

2. Materiais e Métodos .....	37
2.1. Local do estudo e População.....	37
2.2. Material Biológico .....	38
2.3. Análise Molecular .....	38
2.4. Análise Bioestatística/Bioinformática .....	39
3. Resultados e Discussão .....	41
3.1. Análise de 8 marcadores STRs na população portuguesa.....	41
3.2. Probabilidade exacta e aproximada de concordância genotípica de um par de gémeos DZ.....	43
3.3. Cálculo da probabilidade média de MZ/DZ em 9 pares de fetos gemelares.....	45
4. Conclusão e Perspectivas Futuras .....	50
5. Referências.....	52
6. Anexos .....	57
Anexo 1 – Extracção de DNA de amniócitos não cultivados e de sangue periférico recolhido em cartão Guthrie.....	57
Anexo 2 – Reacção de PCR em multiplex e análise dos produtos amplificados no sequenciador automático .....	58
Anexo 3 – Electroferograma representativo dos alelos obtidos para os diferentes marcadores numa família.....	60
Anexo 4 – Descrição das características observadas nos 8 marcadores analisados neste estudo .....	62
Anexo 5 – Localização citogenética e posição em cM de cada marcador no respectivo cromossoma .....	65
Anexo 6 – MapFile (dados introduzidos no programa <i>ECLIPSE2</i> referentes aos 8 marcadores utilizados) .....	66
Anexo 7 – PedigreeFile (dados introduzidos no programa <i>ECLIPSE2</i> referentes aos 9 fetos gemelares e respectivos pais) .....	68
Anexo 8 – ErrorFile .....	70
Anexo 9 – Folhas de resultados obtidas recorrendo ao programa <i>ECLIPSE2</i> .....	71
Anexo 10 – Cálculo da probabilidade pós-teste .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formação de gémeos monozigóticos.....	3
Figura 2 - Representação esquemática dos vários tipos possíveis de trigémeos e tetragémeos quanto à sua zigotia.....	4
Figura 3 - Placentação nas gestações gemelares .....	9
Figura 4 - Twin-peaks sign indicativo de uma gravidez gemelar diamniótica/dicoriónica.	16
Figura 5 - Pares de gémeos DZ e número de alelos idênticos partilhados por descendência .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela I - Dados referentes a cada gestação estudada .....	37
Tabela II - Características qualitativas e quantitativas de 8 marcadores polimórficos na população portuguesa (pb = pares de bases).....	42
Tabela III - Probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ baseada na frequência alelica de diferentes marcadores polimórficos. ....	43
Tabela IV - Probabilidade exacta de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados.....	44
Tabela V - Probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ baseada na heterozigotia de diferentes marcadores polimórficos.....	44
Tabela VI - Probabilidade aproximada de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados.....	45
Tabela VII - Comparações entre os genótipos dos gémeos estudados para identificação da zigotia .....	47
Tabela VIII- Descrição dos primers existentes por marcador e sua distribuição por painéis .....	59



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Gestação Multifetal

A gestação multifetal condiciona riscos específicos, quer para os fetos, quer para a grávida, obrigando a uma resposta adequada por parte dos centros assistenciais. Até ao início dos anos 70, a incidência da gestação gemelar acompanhava harmoniosamente a curva de aumento populacional. Contudo, entre 1973 e 1990, a incidência de gestação gemelar aumentou a um ritmo duas vezes superior ao da gestação única e, nas gestações de ordem mais elevada, a um ritmo sete vezes superior. Um terço deste aumento está relacionado com o uso de agentes indutores de ovulação, outro terço está relacionado com técnicas de reprodução assistida e o último terço com a tendência actual para o protelamento da gravidez (Antsaklis, 2006).

Define-se assim gravidez gemelar como aquela que apresenta dois ou mais fetos simultaneamente numa gravidez, sendo a gravidez gemelar dupla a mais comum, com frequência de 1/80, sendo apenas 1/512000 no caso da gravidez quádrupla.

### 1.1.1. A Formação dos Gémeos

Se, no momento da ovulação, forem expelidos dois ovócitos, em vez de um, e se ambos forem fecundados, os zigotos resultantes darão origem a gémeos dizigóticos (DZ) ou bivitelinos.

Estes gémeos, em média, não apresentam maior similaridade genética entre si do que pares de irmãos gerados sucessivamente, porque, tanto os pares DZ quanto os pares de irmãos sucessivos são oriundos de pares de zigotos distintos. Os pares DZ são, por isso, considerados como irmãos da mesma idade e, em consequência, também denominados gémeos fraternos (do latim, *frater* = irmão) ou falsos.

Por terem origem biovular, os pares DZ podem ter o mesmo sexo, isto é, serem ambos do sexo masculino (MM) ou ambos do sexo feminino (FF) ou, ainda,

discordantes quanto ao sexo (MF). Porém, nem sempre os pares DZ apresentam duas placentas distintas, pois, na eventualidade de uma proximidade excessiva dos locais de implantação dos blastocistos que dão origem aos gémeos DZ, as placentas podem, aparentemente, fundir-se numa única. Quando isso acontece, somente o exame microscópico da região de união das placentas mostrará a presença da chamada *zona T*, composta de quatro lâminas (um âmnio de cada lado e dois córions no meio). Entre os dois córions será possível observar a presença do trofoblasto e vilosidades coriônicas atrofiadas (Benirschke, 1994).

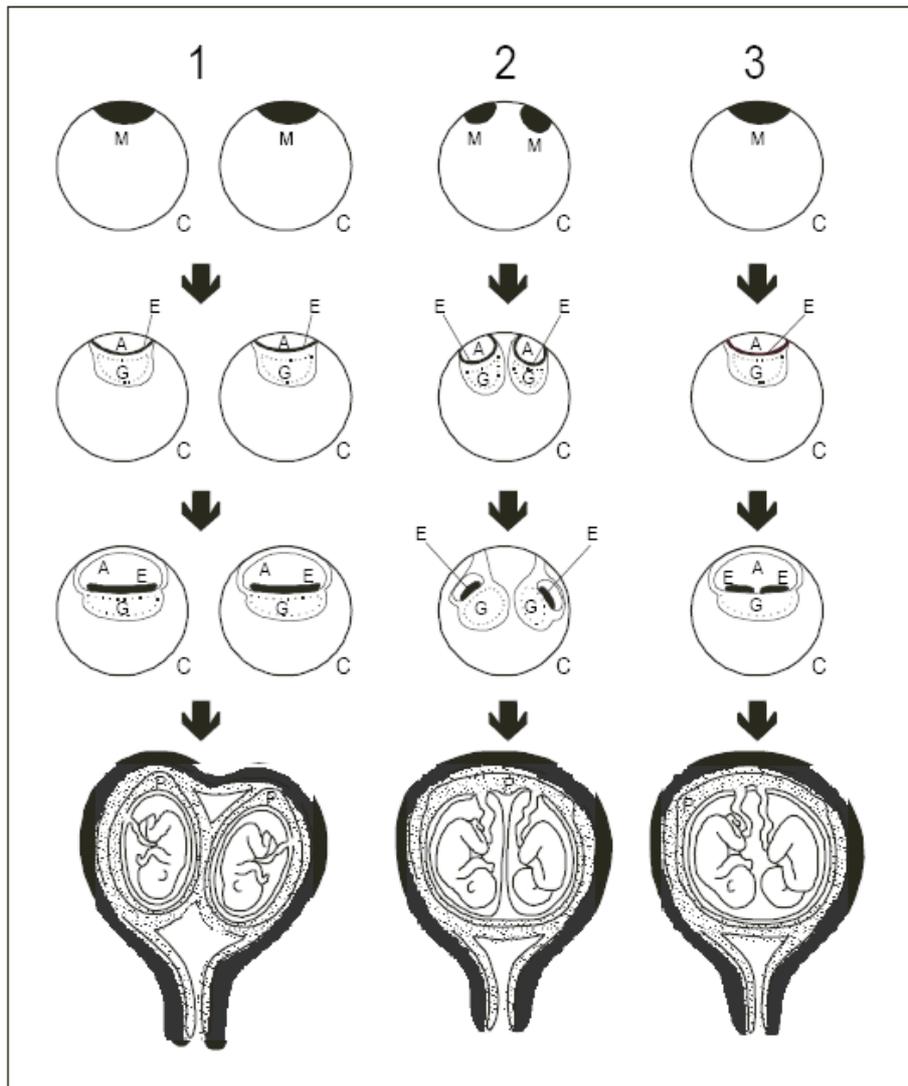
Um outro tipo de gémeos, os pares monozigóticos (MZ) ou univitelinos, é formado no período entre 1 a 14 dias depois da fertilização, quando um único zigoto sofre desenvolvimento irregular, dando origem a dois fetos que são considerados idênticos do ponto de vista genético, pois possuem o mesmo património genético, visto que são oriundos de uma única célula – ovo ou zigoto.

Os gémeos MZ são do mesmo sexo, isto é, MM ou FF e, frequentemente são denominados gémeos idênticos. Esta denominação refere-se ao genótipo e não ao fenótipo, havendo casos em que os pares MZ apresentam grandes diferenças fenotípicas.

Em termos gerais, mais de 30% dos gémeos são monozigóticos (50% MM e 50% FF) e cerca de 70% dizigóticos (50% MF, 25% MM e 25% FF) (Antsaklis, 2006).

Cerca de 20 a 30% dos pares MZ originam-se da separação dos blastómeros num período muito precoce (Benirschke, 1994), isto é, até o terceiro dia após a fecundação, quando o zigoto segmentado ainda está no estado de mórula. Em consequência disso, formam-se dois blastocistos e os gémeos resultantes apresentarão, ao nascer, dois córions (dicoriônicos ou bicoriônicos), dois âmnios (diamnióticos ou biamnióticos) e, dependendo da proximidade dos locais em que estavam implantados no útero, duas placentas separadas ou unidas (Figura 1-1). Os outros 70% de pares MZ são o resultado de alterações que ocorrem entre o quarto até o décimo quarto dia após a fecundação do ovócito. Essas alterações podem provocar a divisão da massa celular interna (Figura 1-2), o que propicia o nascimento de gémeos com dois âmnios, um córion e uma placenta (diamnióticos monocoriônicos). No caso das alterações serem

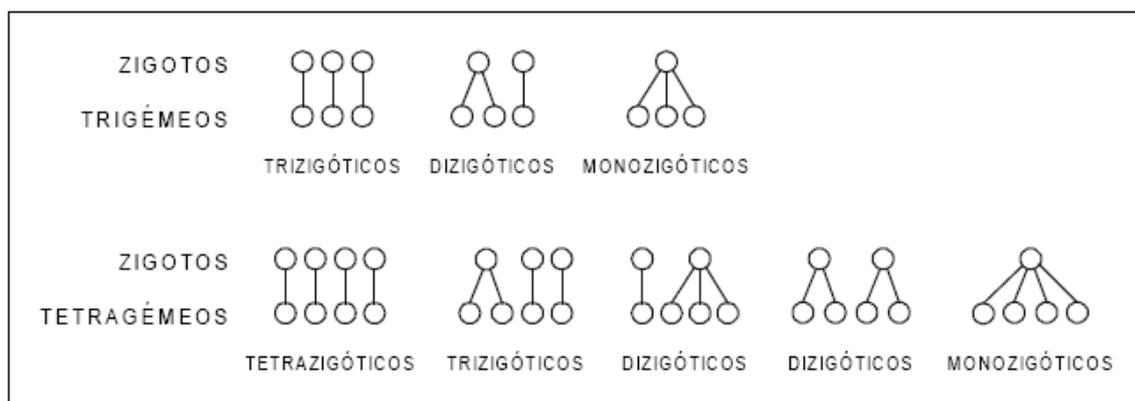
mais tardias (1% das gestações monozigóticas), ocorre a divisão do disco embrionário (Figura 1-3), resultando no nascimento de gémeos com um único âmnio, um único córion (monoamnióticos monocoriônicos) e placenta única (Stephen *et al.*, 2005). Essas alterações tardias também podem provocar uma repartição desigual do material embrionário e, por conseguinte, a produção de maiores diferenças entre os pares MZ.



**Figura 1** - Formação de gémeos monozigóticos: 1. por produção de dois blastocistos, em consequência da separação precoce dos blastómeros; 2. por divisão da massa celular interna; 3. por divisão do disco embrionário. A-cavidade amniótica; C-córion; E-disco embrionário; G-saco vitelino; M-massa celular interna; P-placenta.

Se a separação do material embrionário for incompleta durante a formação de um par MZ, os gémeos resultantes poderão apresentar-se ligados por intermédio de uma estrutura comum, que permitirá a comunicação dos seus sistemas circulatórios. Estes gémeos são denominados *teratópagos* (o que em grego significa: *téras* = monstro; *pagos* = unido) ou *siameses*. Esta é a designação mais frequentemente utilizada para indicar a união física de gémeos, tendo esta ligação já ocorrido, inclusive, em trigémeos e em tetragémeos (Schinzel *et al.*, 1979).

De entre os partos múltiplos, os de trigémeos são menos frequentes que os de gémeos, sendo mais raros, ainda, os de tetragémeos e de quádruplos. Muito esporadicamente assinala-se o nascimento de um número de gémeos superior a cinco. A exemplo do que ocorre com os pares de gémeos, a origem dos trigémeos, tetragémeos e quádruplos pode ser monozigótica ou resultar de mais de um zigoto. Assim, por exemplo, no caso de trigémeos, eles podem ser trizigóticos, dizigóticos ou monozigóticos, se oriundos, respectivamente, de três zigos, dois zigos ou de um único zigoto. A Figura 2 mostra, esquematicamente, os vários tipos de trigémeos e tetragémeos quanto à sua zigotia.



**Figura 2** - Representação esquemática dos vários tipos possíveis de trigémeos e tetragémeos quanto à sua zigotia.

### 1.1.2. Gêmeos Monozigóticos discordantes quanto ao sexo

Os gêmeos MZ são considerados sempre do mesmo sexo, mas existem casos muito excepcionais que mereceram registro na literatura. Assim, Dallapiccola *et al.* (1985) descreveram gêmeos MZ *heterocarióticos* (que apresentam cariótipos diferentes) discordantes quanto ao sexo, compostos por um indivíduo do sexo masculino com cariótipo normal (46,XY) e por outro, do sexo feminino, com síndrome de Turner (45,X), em consequência da perda de um cromossoma Y no início do desenvolvimento embrionário. Também já foram descritos pares de gêmeos em que os indivíduos do sexo masculino apresentavam cariótipo normal 46,XY, e os do sexo feminino apresentavam mosaicismo 45,X/46,XY (Arizawa *et al.*, 1988). Um caso curioso foi relatado por Edwards *et al.* (1966) em que o gêmeo do sexo feminino era um mosaico 45,X/46,XY e o masculino tinha cariótipo 45,X.

Casos mais raros, de gêmeos MZ que, apesar de apresentarem cariótipo idêntico, isto é, de serem *isocarióticos*, eram discordantes quanto ao sexo, foram descritos por alguns autores. Assim, Reindollar *et al.* (1987) descreveram a discordância em relação ao sexo em pares MZ com mosaicismo 45,X/46,XY. Fujimoto *et al.* (1991), por sua vez, assinalaram um caso de gêmeos MZ discordantes quanto ao sexo que eram mosaicos 45,X/46,X,*idic*(Y), ao passo que Kurosawa *et al.* (1992) descreveram essa discordância num par MZ com mosaicismo 45,X/47,XYY. Nesses casos, a explicação mais plausível para a discordância quanto ao sexo é a distribuição desigual na linhagem germinativa de células com cariótipo 45,X e de células que apresentam pelo menos um cromossoma Y, indutor do desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos.

### 1.1.3. Superfecundação Heteropaterna

Um parto múltiplo pode ser o resultado da fertilização de dois ou mais ovócitos expelidos simultaneamente, mas pode também resultar de *superfecundação*, isto é, da fecundação de ovócitos emitidos em ovulações sucessivas durante um único ciclo menstrual. No caso de mulheres monogâmicas, é impossível saber se um parto múltiplo resultou de poliovulação

ou de superfecundação. Sabe-se, porém, em decorrência de observações sobre *superfecundação heteropaterna* que a superfecundação existe. Foram registrados casos de mulheres com mais de um parceiro sexual que geraram gémeos DZ de pais diferentes (meios-irmãos). Apesar destes casos serem pouco mencionados na literatura, é possível que a sua frequência esteja em ascensão nas sociedades modernas (Malinowski *et al.*, 2006).

### 1.1.4. Factores que influenciam o nascimento de gémeos

O nascimento de gémeos DZ depende, evidentemente, da ocorrência de poliovulação, a qual, por sua vez, depende do nível da hormona folículo-estimulante (FSH). O nível de FSH, por sua vez, depende de causas genéticas, sendo mais alto em mulheres de raça negra do que em mulheres caucasianas, além de que mulheres que já deram à luz gémeos possuem, em média, níveis mais elevados de FSH do que as que tiveram parto único (Nylander, 1981). A produção de FSH está, ainda, correlacionada com o tamanho da hipófise, cujo peso máximo é atingido aos 40 anos de idade.

Estas informações explicam, pois, o facto de o nascimento de gémeos DZ ser influenciado pela raça (varia desde 3/1000 nos orientais até cerca de 50/1000 nos africanos).

O nascimento de gémeos DZ também depende da idade materna (aumenta dos 35 aos 40 anos e diminui acentuadamente após os 40) e, antes do advento de métodos anticoncepcionais eficientes, era mais comum em mulheres muito fecundas, ou seja, com maior paridade. Essas mulheres não davam à luz gémeos DZ por uma questão probabilística, mas sim porque a poliovulação está associada a maior fecundidade.

Gestações múltiplas dizigóticas tendem a ser recorrentes. Mulheres que tenham dado à luz gémeos DZ têm 10 vezes mais hipóteses de terem outra gravidez múltipla (Antsaklis, 2006).

Parisi (1982) sugeriu que, em decorrência do *stress* sofrido pelas pessoas que vivem em grandes aglomerados urbanos, seria possível ocorrer a diminuição da concentração e da qualidade espermática. Esse fenómeno, aliado aos

distúrbios da ovulação sofrido pelas mulheres, também causados pelo *stress*, poderia ser, pois, incluído entre os factores capazes de diminuir a incidência de gémeos DZ.

As sugestões de que também existiriam factores genéticos capazes de influenciar o nascimento de gémeos DZ são antigas (Lewis *et al.*, 1996). Assim, já em 1909, Weinberg havia sugerido que a tendência hereditária à gestação de gémeos DZ é transmitida via materna e que seria provavelmente recessiva. Em oposição, o estudo de ocorrência espontânea de gémeos DZ em genealogias feito por Meulemans *et al.* (1996) defenderam a teoria de herança dominante monogénica.

Outra demonstração da participação de factores genéticos no nascimento de gémeos DZ foi dada por Hasbargen *et al.* (2000), os quais demonstraram que mulheres que possuem o alelo determinante da deficiência de redutase de metilenotetra-hidrofolato (MTHFR) têm menor probabilidade de gerar gémeos DZ. Nas gestações gemelares, a necessidade de ácido fólico está aumentada. Por ser a deficiência de MTHFR responsável pela baixa produção de 5-metiltetra-hidrofolato e aumento da concentração plasmática de homocisteína, o alelo que causa essa deficiência diminui a probabilidade de gestação gemelar. De acordo com Hasbargen *et al.* (2000), a frequência desse alelo, em parturientes de recém-nascidos únicos, foi 30%, enquanto que, em mães de gémeos, essa frequência foi praticamente metade (16%).

A influência de fármacos indutores da ovulação, utilizados em técnicas de fertilização assistida, faz-se sentir principalmente em termos de gestações dizigóticas, sendo 3 vezes mais marcada para as gonadotrofinas do que para o clomifeno.

Vários autores defendem que para além dos aspectos já citados a gestação dizigótica também é influenciada por aspectos individuais, tais como: peso, altura, nutrição e intervalo de tempo decorrido após interrupção de contraceptivos orais. Bem mais difícil do que detectar os factores que determinam a poliovulação, que é condição *sine qua non* para o nascimento de gémeos DZ, é o reconhecimento de factores que influenciam a gestação de pares MZ.

A incidência da gestação monozigótica é mundialmente constante e situa-se nos 4/1000. A hipótese mais plausível para explicar o nascimento de pares MZ é a diminuição da motilidade tubária e/ou as alterações da mucosa do endométrio e/ou do epitélio tubário, que são factores capazes de retardar a implantação do embrião na mucosa uterina. De facto, o retardamento experimental da ovulação em coelhos (nos quais não ocorre monozigotia) foi capaz de induzir gestações MZ (Bomse-Helmreich e Papiernik-Berkhauer, 1976).

Existem indicações que permitem supor que os anovulatórios orais são responsáveis pelo aumento da incidência de pares MZ, partindo do conhecimento de que a depressão da motilidade tubária, bem como as alterações das mucosas do endométrio e do epitélio tubário, estão incluídas entre os efeitos residuais do uso de anticoncepcionais (Beiguelman *et al.*, 1996).

A fertilização assistida também tem favorecido o nascimento deste tipo de gémeos por razões que ainda não são claras, aumentando a incidência de gémeos MZ de 2 a 8 vezes. Este fenómeno foi atribuído principalmente à delgadeza e/ou micromanipulação da zona pelúcida (Alikani *et al.*, 1994).

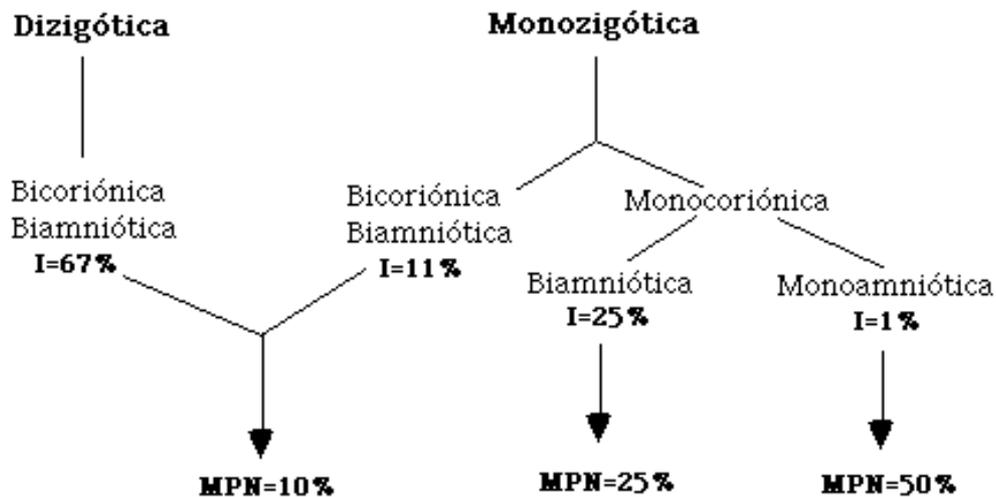
### **1.1.5. Complicações Perinatais**

A gravidez gemelar predispõe uma série de riscos para a mãe e para os fetos e é sempre considerada como gestação de alto risco, sendo, em todas as populações humanas estudadas, a taxa de mortalidade perinatal de gémeos maior quando comparada com gestações únicas (3 a 11 vezes superior). Este quadro deve-se à maior incidência de prematuridade, ao síndrome de transfusão feto-fetal, ao deficiente crescimento fetal e a anomalias congénitas (Pharoah, 2002).

A nível geral, a incidência de anomalias é maior em gémeos MZ do que em gémeos DZ, estimando-se que entre 10 e 15% sejam afectados. Gémeos MZ possuem um risco mais elevado de apresentarem anomalias estruturais e funcionais, incluindo defeitos relacionados com o tubo neural.

Anomalias exclusivas dos gémeos MZ incluem gémeos siameses, transfusão feto-fetal, acardia e feto papiráceos (Antsaklis, 2006).

A morbimortalidade fetal e perinatal de cada tipo de placentação é muito diferente (Figura 3). As gestações monozigóticas apresentam um risco substancialmente mais elevado de atraso de crescimento intra-uterino, anomalias congénitas e morte fetal. O síndrome de transfusão feto-fetal ocorre praticamente sempre em gestações monozigóticas. A gestação monoamniótica, ainda que rara, constitui uma gestação de altíssimo risco pela possibilidade de transfusão feto-fetal e entrelaçamento dos cordões. Assim, para além da determinação da zigotia, a correcta e precoce determinação ecográfica da corionicidade e amniocidade de uma gestação gemelar é de elevada importância na avaliação do risco, abordagem e decisão perinatológica.



**Figura 3** - Placentação nas gestações gemelares. (I: incidência; MPN: mortalidade perinatal)

**Morbimortalidade**

A significativa morbimortalidade perinatal imputável à gestação gemelar e de ordem superior advém sobretudo da elevada frequência de parto pré-termo (nascimento antes das 37 semanas gestacionais completas) (Gardner *et al.*, 1995). Três factores poderão estar envolvidos nessa associação:

- Parto espontâneo, possivelmente relacionado com a hiperdistensão uterina;
- Parto após ruptura prematura de membranas, possivelmente relacionado com corioamnionite subclínica;
- Prematuridade por decisão médica, em face de indicações de ordem materna ou fetal.

Curiosamente, com base em estudos populacionais de mortalidade infantil, (U.S. Linked Birth/Infant Death Data Sets, de 1985 e 1986), Powers (1994) chegou à conclusão de que a taxa de mortalidade neonatal, entre as 31 e as 36 semanas de gestação, é menor para os gémeos do que para os fetos de gestações únicas. Esta situação é possivelmente explicável pela instalação de uma progressiva insuficiência placentar, levando ao aumento da produção endógena de esteróides e consequente indução da maturidade pulmonar.

### **Crescimento diferencial**

O peso do feto constitui o mais importante factor da morbimortalidade nas gestações gemelares. O atraso de crescimento intra-uterino (ACIU) verifica-se quando o peso do feto, no nascimento, é menor que o percentil 10 das curvas de gestações simples, de acordo com a idade gestacional ao parto.

O crescimento diferencial de um dos fetos, manifestando-se, a nível clínico, por uma diferença superior a 20% no peso estimado, pode dever-se a insuficiência placentar, síndromes genéticas ou transfusão feto-fetal (Rodrigues *et al.*, 2005).

#### **a) Insuficiência placentar**

A insuficiência placentar está geralmente associada a uma massa placentar desigual, sendo mais característica das gestações dicoriónicas. Implica, geralmente, um ACIU assimétrico, e o crescimento diferencial não é geralmente perceptível antes das 24 semanas. Este quadro tem tradução cardiotocográfica e fluxométrica ao nível da artéria umbilical (Divon *et al.*, 1989).

### **b) Alterações genéticas**

As anomalias genéticas ocorrem três a quatro vezes mais nas gestações gemelares, e são mais frequentes nas gestações monocoriônicas. O crescimento diferencial destes fetos ocorre precocemente (entre as 16 e as 20 semanas), traduzindo-se por ACIU simétrico.

As anomalias mais comuns são malformações do tubo neural, cardíacas e do palato. A incidência de cromossomopatias está também aumentada, ainda que de forma ligeira. Ocorrem também anomalias do cordão, estando a frequência da artéria umbilical única aumentada 3 a 4 vezes e a da inserção velamentosa, 6 a 9 vezes.

### **c) Transfusão feto-fetal**

O quadro de ACIU devido a transfusão feto-fetal é quase exclusivo das gestações monocoriônicas. Ocorre em 5 a 15% destas gestações, sendo excepcional nas gestações dicoriônicas. Resulta da existência de *shunts* vasculares tipo artério-venosos na placenta partilhada, com passagem de sangue de forma aguda ou crónica de um para o outro feto. Este fenómeno foi verificado em 1990 por Fisk, que injectou sangue Rh negativo de adulto no feto mais pequeno e o detectou posteriormente no sangue do feto maior, através do teste de Kleihauer-Betke.

Nas situações mais graves, um dos fetos é fortemente anémico e o outro policitémico. No extremo desta situação, está a descrição clássica do "stuck-twin", quando há repercussão acentuada sobre o volume do líquido amniótico, com hidrâmnios de um dos fetos e oligoâmnios severo do outro. O gémeo receptor morre geralmente por insuficiência cardíaca congestiva e edema pulmonar, enquanto o gémeo dador desenvolve hidropsia fetal e atraso de crescimento.

A atitude expectante está associada a uma mortalidade perinatal superior a 90%. Quase invariavelmente é necessário interromper a gestação precocemente, afim de salvar os fetos, estando assim indicada a administração de fármacos para indução da maturidade pulmonar. A partir das 34 semanas, a interrupção da gestação é a regra.

A atitude obstétrica perante um quadro de crescimento diferencial está dependente da sua etiologia. Perante causa placentar, o desenvolvimento e bem-estar fetais devem ser cuidadosamente monitorizados, interrompendo-se a gravidez quando considerado oportuno. Perante causa genética, a atitude dependerá da natureza da anomalia, prognóstico e da possibilidade de correcção terapêutica. É possível levar a cabo a interrupção selectiva de um ou mais fetos com o diagnóstico pré-natal de anomalia cromossómica ou estrutural.

### **Morte de um dos fetos**

A morte de um dos gémeos ocorre pelo menos em 4-8% dos casos de gestação gemelar (Santema *et al.*, 1995) e, num número ainda mais elevado, em gestações de ordem superior.

A morte de um dos fetos antes das 16 semanas não acarreta qualquer risco para o feto sobrevivente ou para a mãe, para além de uma escassa hemorragia vaginal. A frequência de desaparecimento de um dos gémeos ("vanishing twin") em grávidas submetidas a ecografia antes das 14 semanas de gestação alcança os 20%.

Em fases mais tardias, verifica-se um risco aumentado de parto pré-termo, atraso de crescimento e mortalidade perinatal. Por vezes, o feto morto transforma-se em feto papiráceo.

A morte de um dos fetos pode ocorrer com qualquer tipo de placentação, mas o risco é 2,2 vezes superior para uma gestação monocoriónica. Nesta situação, a mortalidade e morbilidade por complicações neurológicas estão claramente aumentadas no feto sobrevivente. A libertação de material tromboplástico pelo feto morto pode produzir oclusões arteriais trombóticas, afectando a circulação cerebral do outro gémeo e podendo condicionar encefalomalácia. Existe ainda um risco, embora pequeno, de morbilidade materna, incluindo coagulação vascular disseminada. Esta complicação pode ocorrer várias semanas após a morte fetal, devendo-se por isso monitorizar a contagem de plaquetas, doseamento do fibrinogénio e tempo parcial de tromboplastina de 15/15 dias, durante 8 semanas.

A atitude obstétrica depende da idade gestacional, da causa da morte fetal e do aparecimento de complicações maternas ou fetais. Se a condição que provocou a morte do feto for susceptível de afectar o sobrevivente (por exemplo, pré-eclâmpsia), pode estar indicado o parto imediato por indicação médica. Se a causa da morte foi uma anomalia fetal, a atitude depende da placentação. Numa gestação dicoriónica, pode ser adoptada uma atitude expectante, com cuidadosa vigilância. Numa gestação monocoriónica com mais de 32 semanas, o parto poderá ser a opção mais segura. Com idades gestacionais inferiores, o parto estará indicado ao menor sinal de dano fetal (Prompler *et al.*, 1994).

### **Acardia**

A acardia é uma malformação rara que se observa em menos de 1% das gestações gemelares MZ, caracterizada por uma agenesia cardíaca total (holocardia) ou parcial (hemicardia).

Em 1553, Benedetti descreveu o primeiro caso de gémeo acárdico. O primeiro caso de acardia diagnosticado por ecografia pré-natal coube a Lehr, em 1978. Foram descritos vários tipos de acardia, constituindo a acardia acéfala, com ausência da extremidade cefálica, a forma mais frequente, representando 60 a 75% dos casos publicados.

A presença de um gémeo acárdico requer um gémeo normal ("gémeo-bomba"), que fornece circulação para ele próprio e para o gémeo acárdico. Em muitos casos o gémeo acárdico é praticamente igual em tamanho ao gémeo normal.

A etiopatogenia desta malformação permanece obscura, tendo sido formuladas diversas teorias para a explicar. A mortalidade perinatal é da ordem dos 55%, sobretudo associada à prematuridade. Os principais problemas neonatais estão relacionados com a insuficiência cardíaca congestiva do "gémeo-bomba", com o hidrâmnios e com o trabalho de parto pré-termo.

As diferentes atitudes terapêuticas visam melhorar o prognóstico, sempre reservado, do gémeo-bomba. Como o tratamento do hidrâmnios, com vista à

diminuição da incidência do trabalho de parto pré-termo, também estão na primeira linha as amniocentese seriadas.

Alguns autores preconizam a realização de histerotomia, com extracção do feto acárdico, durante o terceiro trimestre. Podem também ser utilizadas várias técnicas para a interrupção selectiva da circulação do feto acárdico (Sepúlveda *et al.*, 1995).

### **Gémeos siameses**

Anomalia rara (1/50000 gestações, 1/200 gestações MZ) afecta unicamente gémeos monozigóticos e ocorre quase exclusivamente em gestações monoamnióticas, sendo raríssimos os casos descritos em gestações diamnióticas.

Nem sempre os gémeos siameses constituem um par com o mesmo desenvolvimento, podendo um dos gémeos apresentar desenvolvimento rudimentar, denominado de gémeo parasita. Geralmente, o gémeo parasita é removido cirurgicamente.

O parto deve ser, por razões óbvias de incompatibilidade feto-pélvica, por cesariana. O prognóstico fetal é reservado, e agravado pelas frequentes malformações associadas (nomeadamente cardiovasculares), verificando-se 40% de nado-mortos e 35% com morte neonatal durante o 1º dia de vida.

A separação cirúrgica representa a única esperança de vida autónoma para estes recém-nascidos (Khalid, 2007).

### **Complicações maternas**

A morbidade materna está claramente aumentada na gestação gemelar e ainda mais nas gestações de ordem superior. Complicações pré-natais ocorrem em 80% dos casos, contra 32% na gestação única. A incidência de hiperemese gravídica, colestase, anemia, pré-eclâmpsia e diabetes gestacional, é significativamente maior na gestação múltipla e aumenta com o número de fetos.

Particular destaque merece a pré-eclâmpsia, com um aumento de frequência para mais do dobro, a ruptura prematura de membranas, três vezes

mais frequente na gestação gemelar, e as complicações hemorrágicas severas no pós-parto. O hidrâmnios tem uma incidência 80 vezes maior na gestação gemelar.

O número de cesarianas é muito mais elevado nas gestações gemelares, acarretando morbidade suplementar, relacionada sobretudo com as complicações tromboembólicas e infecciosas (Campbell *et al.*, 2004).

### 1.1.6. Determinação da Corionicidade

A determinação pré-natal da corionicidade baseia-se na identificação do sexo dos fetos, número de massas placentares e características da membrana separadora. A corionicidade é estabelecida através de um exame ultrasonográfico realizado normalmente entre as 6 e 9 semanas de gestação, podendo ser posteriormente confirmada por estudo macroscópico e/ou histológico da placenta e membranas ovulares (Ferreira *et al.*, 2005).

A identificação de dois gémeos de sexo diferente ou de duas massas placentares independentes é o suficiente para o diagnóstico de dicorionicidade, mas, perante fetos com o mesmo sexo e uma só massa placentar, o esclarecimento ecográfico da corionicidade fica dependente da avaliação da membrana separadora.

Histologicamente, a membrana divisória nos gémeos monocoriónicos é composta por dois níveis de âmnio, enquanto nos fetos dicoriónicos existe tecido coriónico entre dois níveis de âmnio. Assim, numa gestação dicoriónica, a membrana tem que ser, necessariamente, mais espessa do que numa gestação monocoriónica, o que foi verificado em diversos estudos.

Segundo Winn (1989) e colaboradores, o limite de 2 mm na espessura da membrana apresenta um valor predictivo de 82% para a monocorionicidade e 95% para a dicorionicidade. D'Alton (1989) considerou excessiva a variabilidade da espessura da membrana, sobretudo em idades gestacionais mais avançadas, e valoriza sobretudo a contagem das camadas, atribuindo-lhe um valor predictivo de 100% para as gestações dicoriónicas e de 94,4% para as gestações monocoriónicas. A avaliação das camadas é, contudo, tecnicamente morosa, o que limita o seu uso clínico.

O sinal da forquilha ("twin-peaks sign") (Figura 4), projecção triangular de tecido placentar, representando a proliferação de vilosidades coriônicas entre os dois estratos coriônicos da membrana separadora, é de grande fiabilidade no diagnóstico da dicorionicidade, com um valor predictivo positivo de 100%. No entanto, esta imagem não é sempre detectável e desaparece após as 16 semanas (Antsaklis, 2006).



**Figura 4** - Twin-peaks sign (entre setas) indicativo de uma gravidez gemelar diamniótica/dicoriônica.

### 1.1.7. Determinação da Zigotia

Uma correcta determinação da zigotia em pares de gémeos é importante por razões médicas, científicas e pessoais (Derom *et al.*, 2001). Grupos sanguíneos, sexo dos fetos, tipagem HLA, avaliação da corionicidade por ultrasonografia e avaliação das placentas após o nascimento, têm sido métodos utilizados para determinar a zigotia (Scardo *et al.*, 1995). No entanto estes testes não são totalmente fiáveis, uma vez que podem surgir erros na interpretação dos resultados. Por exemplo, um par de gémeos concordantes quanto ao sexo e

grupo sanguíneo, não significa que sejam necessariamente gémeos MZ. Dos comentários feitos a respeito da placenta pode-se concluir que tem pouco valor para o diagnóstico da zigotia ao nascimento, pois as placentas dos gémeos DZ podem-se apresentar aparentemente unidas, além de que os pares MZ diamnióticos dicoriónicos (cerca de 30%) apresentam duas placentas. Já a presença de um único âmnio ou de um único córion serve para rejeitar a hipótese de dizigotia, apesar de a presença de dois córions ou de dois âmnios não servirem para excluir a hipótese de monozigotia (Scardo *et al.*, 1995). Consequentemente, a determinação da zigotia deve ser confirmada através de análises genotípicas.

Após a descoberta do padrão genético individual no genoma por Jeffreys (1985), foi desenvolvido um método que permite a determinação da zigotia por RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Akane *et al.*, 1991). Pouco tempo depois, a invenção da técnica da PCR (reacção em cadeia da polimerase) e a descoberta dos STR (short tandem repeats) no genoma, tornaram a determinação da zigotia ainda mais fácil e rápida. O desejo de obter mais informação a partir de uma amostra, associado à necessidade de limitar o consumo de DNA, levou à coamplificação e tipagem de sistemas de STR.

Actualmente, o desenvolvimento de kits, da PCR em multiplex e a análise automática de fragmentos tornaram possível amplificar e detectar em simultâneo até 15 *loci* diferentes. Estes factos levaram a mudanças revolucionárias na investigação de amostras biológicas, sejam elas para fins forenses, de diagnóstico, antropológicos ou para investigações genéticas de zigotia em pares de gémeos (Chen *et al.*, 1999).

A dizigotia é estabelecida quando os gémeos herdaram alelos diferentes num mínimo de 2 marcadores independentes.

Partindo do princípio que os gémeos MZ se formam a partir de uma mesma célula-ovo, os seus genomas devem ser idênticos. Nesta base, a monozigotia é estabelecida quando um par de gémeos é concordante em todos os alelos estudados.

No entanto, não podemos descartar a vertente probabilística desta determinação, tendo a estatística um papel muito importante na precisão dos

resultados, pois um par de gémeos pode ser concordante em todos alelos estudados e ser DZ. A probabilidade de esta situação ocorrer é baixa, mas deve ser equacionada. Assim, quantos mais marcadores não ligados forem utilizados, mais precisos tendem a ser os resultados no estudo da zigotia.

É necessário ter em conta eventuais erros que possam ocorrer, quer sejam eles inerentes ao método de estudo utilizado, quer sejam produzidos durante a amplificação ou relacionados com mutações espontâneas que possam ter ocorrido nos genótipos em estudo.

Existe um vasto leque de amostras biológicas que podem ser utilizadas nesta determinação, variando consoante o estudo seja pré ou pós-natal. No diagnóstico pós-natal da zigotia, a amostra de eleição é o sangue periférico. No diagnóstico pré-natal, a amostra mais frequentemente utilizada é o líquido amniótico, podendo este estudo ser realizado também em vilosidades do córion e em sangue fetal.

Os objectivos/interesses da determinação da zigotia são vários. A incidência de um vasto leque de complicações perinatais, entre elas, malformações estruturais e funcionais, está aumentada em gémeos MZ, sendo de extrema importância a determinação da zigotia para o correcto acompanhamento clínico pré e pós-natal.

Outros procedimentos médicos, tais como, transplante de órgãos entre gémeos e exclusão do uso de agentes imunossupressores, dependem também da determinação da zigotia (St. Clair *et al.*, 1998).

O estudo dos gémeos e consequente determinação da zigotia pode também ser valioso para estudos epidemiológicos genéticos de doenças complexas, para investigar a interacção do genótipo com sexo, idade e factores ambientais, e ainda para estudos psicológicos e psiquiátricos (Boomtsma *et al.*, 2002).

Por ultimo, os pais de gémeos cada vez mostram mais interesse em saber a zigotia dos filhos (Keith *et al.*, 1997).

### 1.2. Diagnóstico Pré-Natal

O diagnóstico pré-natal surgiu em 1966, quando Steele e Breg mostraram que era possível determinar a constituição cromossômica de um feto por análise de células cultivadas do líquido amniótico. Como já era conhecida a associação entre idade materna avançada e um risco aumentado de síndrome de Down, o relato deles levou directamente à criação do diagnóstico pré-natal como um serviço médico (Thompson *et al.*, 1993). Três anos após, Valenti *et al.*, (1969), relatam o primeiro caso de detecção pré-natal de síndrome de Down.

O diagnóstico pré-natal de doenças genéticas é ainda um procedimento relativamente caro e cresceu rapidamente devido à estreita interacção do uso da ultra-sonografia e dos métodos laboratoriais básicos da genética. Ambos propiciaram a invasão do “ninho fetal” e tornaram possível a obtenção de material do produto gestacional, podendo-se, assim, proceder a diagnósticos cada vez mais precisos. Com o aperfeiçoamento dessas técnicas, a medicina pôde desenvolver métodos de tratamento intra-útero e de correcções fetais, conduzindo a esse novo e promissor campo que foi denominado medicina fetal (Pinto, 2002).

O objectivo do diagnóstico pré-natal vai mais além do simples detectar de anomalias e permitir a interrupção da gravidez quando um defeito é identificado no feto (Thompson *et al.*, 1993). Quando uma alteração, ou uma potencial alteração genética é diagnosticada a nível pré-natal, os clínicos podem oferecer uma série de opções esclarecidas aos pais. A informação obtida através do diagnóstico pré-natal vai ser útil a nível clínico para o correcto acompanhamento da gravidez e parto e a disponibilidade deste diagnóstico permite aos pais preparar o nascimento de uma criança com anomalias, terminar uma gravidez afectada, ou ainda, quando possível, recorrer aos tratamentos fetais já existentes (Cunniff, 2004).

O diagnóstico pré-natal também vai permitir tranquilizar e reduzir a ansiedade, sobretudo em grupos de alto risco. Permite também que casais com risco elevado de terem uma criança com uma anomalia, que, de outro modo, renunciariam a gerar filhos, comecem uma gestação sabendo que a presença ou ausência da anomalia no feto será confirmada por testes.

O diagnóstico pré-natal exige a colaboração de várias áreas: obstetrícia, ultra-sonografia, genética clínica (incluindo avaliação, diagnóstico e informação genética) e ciências laboratoriais (incluindo citogenética, bioquímica e molecular). Perante a complexidade de cada uma destas áreas e da integração dessas funções, o diagnóstico pré-natal é sobretudo um programa multidisciplinar.

Um largo conjunto de técnicas já amplamente estudadas e documentadas são usadas no âmbito do diagnóstico pré-natal. Para a maioria dessas técnicas, a precisão, rentabilidade e segurança dos procedimentos estão positivamente relacionados com a experiência do operador. Processos como a amniocentese, a punção de vilosidades coriônicas, o estudo do sangue fetal e o diagnóstico pré-implantatório permitem a análise de tecidos, células fetais ou embrionárias para detecção de anomalias cromossómicas, genéticas e bioquímicas. Estudos imagiológicos fetais, tais como, ultra-sonografia, ressonância magnética e ecocardiografia fetal identificam anomalias estruturais, permitindo um diagnóstico definitivo ou sugerindo estudos adicionais. Em adição a estas técnicas, o estudo do sangue materno permite identificar gestações que apresentam risco aumentado de alterações genéticas, tais como, defeitos do tubo neural, anomalias cromossómicas e defeitos da parede abdominal (Cunniff, 2004).

### **1.2.1. Indicações para a realização do Diagnóstico Pré-Natal**

Em linhas gerais, o diagnóstico pré-natal é indicado sempre que uma condição familiar, materna ou fetal confira um risco aumentado de malformação, anomalia cromossómica ou alteração genética. Alguns estudos de diagnóstico pré-natal são realizados após o conhecimento de resultados anómalos em testes como ultra-sonografia ou estudo do sangue materno (Ayres *et al.*, 2005).

Indiscutivelmente, a principal indicação para o diagnóstico pré-natal recai na idade materna avançada (IMA). Em Portugal considera-se idade materna avançada quando a grávida tem 35 anos ou mais na altura provável do nascimento. Na Europa ocidental e na América do Norte, segundo dados estatísticos, cerca de metade das mulheres grávidas com mais de 35 anos de idade submete-se à realização de amniocentese. Se não houver historial clínico

anterior de anomalias, somente nesta faixa etária é que o risco de nascimento de um feto com anomalias excede o risco de aborto devido a tal procedimento (Cunniff, 2004).

Em gestações gemelares dizigóticas, o risco relacionado com a IMA de cada gémeo possuir anomalias cromossómicas é o mesmo que em gestações únicas, e, conseqüentemente, a possibilidade de pelo menos um feto ser afectado por um defeito cromossómico é o dobro em relação as gestações únicas. Por exemplo, em uma gestante com 40 anos de idade, o risco baseado na IMA de o feto possuir trissomia 21 é cerca de 1 em 100. Em gestações gemelares dizigóticas, o risco de um feto ser afectado é 1 em 50 (1 em 100 mais 1 em 100), enquanto que o risco de ambos os fetos serem afectados é 1 em 10 000 (1 em 100 vezes 1 em 100). Assim sendo, e uma vez que a percentagem de gestações gemelares dizigóticas aumenta com a idade materna, a proporção de gestações gemelares com anomalias cromossómicas é maior do que em gestações únicas.

Em gémeos MZ, o risco relacionado com a IMA de anomalias cromossómicas é o mesmo que em gestações únicas e, na maioria dos casos, ambos os fetos são afectados.

### **1.2.2. Determinação da Zigotia no contexto do Diagnóstico Pré-Natal**

A determinação da zigotia é um dos testes enquadrados no âmbito do diagnóstico pré-natal, estando os seus métodos de pesquisa relacionados com o rastreio de aneuploidias (alteração do número de cromossomas). A partir da mesma amostra biológica e, utilizando os mesmos métodos moleculares de detecção, é possível dar resposta a estas duas pesquisas.

As anomalias cromossómicas mais frequentes são a trissomia do cromossoma 13, 18 ou 21 e aneuploidias dos cromossomas sexuais (X e Y). Estas alterações estão associadas a fenótipos específicos e graves como síndrome de Patau, síndrome de Edwards e síndrome de Down (trissomia 13, 18 e 21 respectivamente), e a fenótipos menos severos, como o síndrome de Turner (monossomia X) e síndrome de Klinefelter (XXY) (Mann *et al.*, 2004).

Uma vez que as técnicas moleculares de rastreio de aneuploidias se encontram amplamente optimizadas, e sendo esta uma das detecções mais requeridas pelos clínicos no âmbito do diagnóstico pré-natal, a utilização dos mesmos marcadores polimórficos para a determinação da zigotia tornou-se prática comum em diversos laboratórios de genética molecular e citogenética.

Como referido anteriormente, a amostra de eleição para estes estudos é o líquido amniótico (LA), no entanto, e menos utilizadas, as vilosidades do córion e o sangue fetal também surgem na lista das amostras biológicas adaptadas a estes estudos. Os métodos de obtenção das amostras são sempre invasivos, estando sempre associados a risco para a mãe e fetos.

Ponderando o tempo de gestação e o risco de cada um dos métodos de obtenção de tecido fetal, a escolha do tipo de amostra a utilizar em cada caso é realizada pelo clínico e pela gestante.

No entanto, a determinação da zigotia por si só não é suficiente para que uma grávida seja sujeita ao DPN recorrendo a métodos invasivos. Esta determinação só deverá ser efectuada se a grávida estiver enquadrada em qualquer uma das indicações para a realização DPN anteriormente referidas.

### **1.2.3. Procedimentos para a obtenção de tecido fetal**

#### **Amniocentese**

A amniocentese é um método de diagnóstico pré-natal que consiste na aspiração transabdominal de uma pequena quantidade de líquido amniótico (do âmnio, a membrana que envolve o feto) através de uma punção percutânea do útero. A ultra-sonografia facilita o procedimento confirmando a idade gestacional antecipadamente e delineando a posição do feto e da placenta.

A amniocentese tornou-se uma prática médica no final dos anos 60 e, hoje em dia, é um procedimento rotineiro para mulheres grávidas, sendo o processo mais usado para a obtenção de células fetais que posteriormente podem ser analisadas a nível citogenético, bioquímico e molecular. Este procedimento é realizado, por norma, entre as 15 e 18 semanas de gravidez.

Os especialistas recomendam a amniocentese para mulheres cuja gravidez comporta riscos de anomalias cromossómicas, doenças hereditárias ou defeitos do tubo neural, além de outras condições para as quais existem exames pré-natais. O estudo dos cromossomas (cariótipo) fetais é o exame laboratorial mais realizado a partir do líquido amniótico obtido através da amniocentese.

A amniocentese realizada no segundo trimestre está associada com um baixo nível de complicações e permite a obtenção de amostra em boas condições de análise em 99% dos casos (Simpson *et al.*, 1976). No entanto, como método invasivo, a amniocentese apresenta riscos tais como, perda fetal, corionamnionite, lesões fetais e imunização por Rh materno. Como a amniocentese é realizada com o auxílio da ultra-sonografia, o risco do feto ser atingido por picada é minimizado, e anomalias graves relacionadas directamente com a punção da agulha são raríssimas. O risco de indução de aborto é baixo e está estimado em cerca de 0,5%, tendo, em vários centros de diagnóstico pré-natal, uma percentagem inferior. 1% das mulheres que se submetem a este procedimento podem apresentar hemorragias, cólicas e perda de líquido amniótico, devendo, nestes casos, procurar ajuda médica. Para evitar imunização por Rh da mãe, a administração de imunoglobulina anti-Rh é rotineira para mulheres Rh-negativas.

Apesar desses riscos, a amniocentese é, actualmente, o exame mais completo para detectar possíveis anomalias fetais e possibilita a tomada de medidas médicas em benefício do bebé e dos futuros pais (Pinto, 2002).

### **Punção de Vilosidades Coriónicas**

A punção de vilosidades coriónicas consiste na aspiração de tecido de trofoblasto fetal da área vilosa do córion por via transcervical (inserção intra-uterina de um cateter) ou transabdominal (inserção transabdominal de uma agulha) sob a orientação da ultra-sonografia. Este procedimento, por norma, é realizado entre as 10 e as 12 semanas de gravidez, sendo a amostra posteriormente utilizada para estudos citogenéticos, moleculares e alguns estudos bioquímicos.

A sua principal vantagem é permitir que os resultados estejam disponíveis num estágio inicial da gravidez, reduzindo assim o período de incerteza e possibilitando realizar, de uma maneira mais fácil e menos agressiva, quer do ponto de vista técnico, quer do ponto de vista psicológico, a interrupção da gestação, se escolhida.

O risco de aborto inerente à punção de vilosidades coriônicas é um pouco mais elevado que o risco da amniocentese, sendo a sua estimativa de 0,6 a 1,6% (Lippman *et al.*, 1992).

O sucesso do diagnóstico citogenético em vilosidades coriônicas é ligeiramente inferior em relação ao diagnóstico citogenético em líquido amniótico. Esta técnica está relacionada com um aumento da frequência de mosaicismo placentar, que é uma anomalia citogenética que, quando detectada nas vilosidades coriônicas, pode não ser encontrada no feto.

Uma outra contra-indicação, tal como na amniocentese, diz respeito a imunização prévia no sistema Rh, porque, inevitavelmente, esta biópsia induz à mistura de sangue materno e fetal (Warren *et al.*, 1985).

### **Cordocentese**

A cordocentese é um procedimento usado para obter uma amostra de sangue fetal directamente do cordão umbilical sob orientação ultra-sonográfica.

O sangue fetal requer apenas alguns dias de cultura para fornecer células para análise cromossómica, servindo para esclarecer os casos em que o resultado citogenético da amniocentese não foi suficiente e, ainda, para a obtenção, em 72 horas, do diagnóstico citogenético fetal das gestações que apresentam alguma anomalia detectada ultra-sonograficamente.

A técnica consiste num minucioso exame ultra-sonográfico para a localização da região de implantação do cordão na placenta, sendo essa região, sempre que possível, a eleita para a cordocentese. A agulha deve penetrar na pele perpendicularmente ao cordão, aspirando-se para uma seringa heparinizada entre 1 e 3 mL de sangue fetal.

O risco de aborto inerente à cordocentese é um pouco mais elevado que o risco da amniocentese e da punção de vilosidades coriônicas, sendo a sua estimativa de 1 a 2% (Tongsong *et al.*, 2001).

### **1.3. Métodos Moleculares aplicados ao estudo da Zigotia**

#### **1.3.1. Biologia Molecular e seu contributo no diagnóstico**

As técnicas hoje utilizadas na genética molecular têm sido desenvolvidas a partir da pesquisa acadêmica básica, em diferentes campos da actividade científica (Atkins *et al.*, 2004). O trabalho de Watson e Crick, em 1953, onde foi proposta a estrutura de dupla-hélice do DNA (ácido desoxirribonucleico), marcou a revolução molecular.

Em 1975, Nathans e Smith purificaram enzimas de restrição, ferramentas essenciais para a manipulação *in vitro* do DNA. Estas foram de fundamental importância para o isolamento e amplificação de fragmentos específicos de DNA para a clonagem *in vivo*, tecnologia desenvolvida a partir das técnicas de DNA recombinante descritas por Berg em 1972. Também em 1975, uma nova metodologia, denominada *Southern blotting*, começou a ser usada para investigar a localização de genes e marcou o início da aplicação destas tecnologias no estudo das doenças genéticas.

Em 1977, técnicas de sequenciação permitiram a identificação de alterações específicas na sequência de DNA e a associação destas com diferentes doenças genéticas. Depois disso, o principal marco no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR), um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1987.

Desde a introdução da técnica da PCR, rápidos avanços nas técnicas de genética molecular têm revolucionado a prática da Patologia, Anatomia e Análises Clínicas, entre outras ciências laboratoriais (Moreira-Filho, 2004).

Na área de genética humana, a biologia molecular tornou-se ferramenta fundamental no diagnóstico das doenças monogénicas, permitindo não só a

identificação do gene afectado, mas também da mutação responsável pela doença. A disponibilidade dos métodos diagnósticos tem possibilitado também a identificação de portadores heterozigóticos, o diagnóstico pré-natal e a triagem populacional para estas doenças.

Embora a maioria dos testes genéticos ainda se destine ao diagnóstico e prevenção de doenças raras, os avanços tecnológicos têm permitido o uso destes testes para a avaliação de risco de doenças, como cancro e doenças cardiovasculares (Veillon, 2002). A correlação entre mutações génicas e susceptibilidade a doenças é particularmente importante no cancro, sendo que cerca de 5% a 10% dos casos ocorrem em indivíduos que herdaram alguma predisposição.

### 1.3.2. PCR

De todas as técnicas disponíveis para análise do DNA e RNA, nenhuma teve o impacto ou tem o potencial de um procedimento conceptualmente simples desenvolvido em 1985, a reacção de polimerização em cadeia, conhecida pela sigla PCR.

A PCR é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial selectiva de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula. Esta técnica revolucionou o mundo científico e as suas aplicações são imensas: é usada no diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, testes de paternidade, identificação de “impressões digitais” genéticas, entre outras. De facto, a PCR revolucionou várias áreas, como a Biologia Molecular, Patologia, Farmácia, Botânica, Medicina Forense e valeu o prémio Nobel, em 1993, a Kary Mullis (Bauer *et al.*, 1994).

O objectivo da PCR é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. O molde pode ser qualquer forma de DNA, como o DNA genómico, podendo usar-se uma gota de sangue, uma raiz de cabelo, uma célula

do epitélio oral, um blastómero, eliminando-se assim a necessidade de preparar grandes quantidades de DNA e RNA de amostras teciduais.

Um ciclo da PCR consiste em três fases: desnaturação do DNA molde (a 95°C), ligação (“annealing”) dos primers (a 52-64°C) e polimerização do DNA (a 72°C). Na 1ª etapa, faz-se a separação das cadeias de dupla hélice de DNA através do calor. Esta separação é essencial para que, na 2ª fase, dois *primers* de oligonucleótidos se liguem às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde. Estes *primers* são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar. Os *primers* servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA e, na última etapa, faz-se a sua extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termo-estável (Taq), tendo sido isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos da PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os 52°C e 95°C. Para executar este ciclo, usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Normalmente são repetidos cerca de 30 ciclos, o que demora apenas algumas horas.

Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da PCR, logo dá-se um crescimento exponencial, havendo ao fim de  $n$  ciclos  $2^n$  vezes mais cópias do que no início.

O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins (Molina *et al.*, 2004).

O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA, aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*. É uma técnica rápida, barata e segura.

Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos. Outras desvantagens são a relativa facilidade com que ocorre

contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) e a limitada extensão da sequência que é possível amplificar (é difícil aplicar a PCR a sequências maiores do que 5 kb). Pode também ocorrer incorporação errônea de bases durante o processo de amplificação.

### **QF-PCR (Quantitative fluorescent polymerase chain reaction)**

O uso da QF-PCR para a análise STRs com o objectivo de detectar aneuploidias foi inicialmente proposto por Mansfield em 1993. Desde então, e após a sua validação, este método foi implementado com sucesso num largo número de laboratórios como método rápido de diagnóstico pré-natal de aneuploidias e de determinação da zigotia (Cirigliano *et al.*, 2001; Levett *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2004).

Esta técnica baseia-se no uso da PCR para amplificar, de uma forma quantitativa, sequências repetitivas altamente polimórficas específicas de cada cromossoma. Um fluorocromo é incorporado nos produtos da PCR (*primers* previamente marcados), de maneira a serem analisáveis por meio de sequenciadores automáticos. Após a amplificação, os fragmentos resultantes são separados pelo tamanho através de electroforese capilar em sequenciadores automáticos.

A QF-PCR apresenta inúmeras vantagens. É uma técnica altamente sensível e específica, que, uma vez automatizada permite analisar um grande número de amostras simultaneamente, apresenta custos reduzidos e é pouco trabalhosa, com possibilidade de resultados após 24h, máxima fiabilidade com pequenas quantidades de amostra (menos de 1 mL de LA, sem ser necessária cultura celular prévia e uma só gota de sangue fetal), precisão, reprodutibilidade e consistência dos resultados.

### 1.3.3. Marcadores genéticos

O DNA genómico apresenta regiões de cópia única e outras com níveis variáveis de repetições. Estas repetições podem ser longas (satélites), curtas (minissatélites) ou muito curtas (microsatélites).

Os STR (Short Tandem Repeat), também chamados microsatélites, são regiões de DNA que incluem um número variável de sequências repetitivas consecutivas de 2 a 6 pares de bases. Estas regiões de DNA, por serem altamente polimórficas, são os considerados marcadores de eleição para diagnósticos genéticos, sendo cada vez mais usados em outras áreas, como a genética de populações, a análise de relações, a identificação criminal e o mapeamento genético. Os STR permitem obter um perfil genético único para cada indivíduo.

Os microsatélites apresentam algumas características desejáveis: podem ser encontrados em número relativamente elevado e estão distribuídos regularmente ao longo de muitas regiões do DNA genómico. Além disso, apresentam um grau elevado de heterozigotia.

A maior parte dos estudos realizados em microsatélites tem revelado que as suas frequências genotípicas se apresentam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma característica importante para que o marcador possa ser útil nos estudos populacionais.

Por causa do excelente nível de discriminação e óptima reprodutibilidade, estes marcadores fazem parte de várias pesquisas em todo o mundo, resultando num amplo banco de dados sobre as diferentes populações existentes. As suas sequências são amplamente conhecidas e disponíveis em algumas bases de dados na Internet.

Existem medidas de qualidade a ter em conta na escolha dos marcadores a utilizar. A informatividade de um marcador depende do número de alelos que ele apresenta e das suas respectivas frequências. Assim sendo, qualitativamente, um marcador é denominado de polimórfico quando apresenta um mínimo de 2 alelos e quando o alelo mais frequente na população tem uma frequência de, no máximo, 99% (Shete *et al.*, 2000). Marcadores com muitos alelos, tendem a ser

mais informativos e são considerados altamente polimórficos (Hildebrand *et al.*, 1992).

Quantitativamente, o grau de polimorfismo do marcador é avaliado por dois parâmetros: heterozigotia e PIC (Polymorphism Information Content).

Heterozigotia é definida como a probabilidade de um indivíduo escolhido aleatoriamente na população ser heterozigótico num determinado locus. Considerando  $i$  como os alelos que um determinado marcador apresenta e  $p$  como as suas respectivas frequências, podemos calcular a heterozigotia de um marcador recorrendo à seguinte fórmula:

$$H = 1 - \sum_i p_i^2$$

O valor do PIC é definido como a probabilidade de um marcador genético herdado pela descendência a partir de um progenitor afectado, na ausência de crossing-over, permitir deduzir o genótipo do progenitor no *locus* do marcador. Também pode ser definido como a probabilidade de a descendência ser informativa vezes a probabilidade do progenitor ser heterozigótico. O valor do PIC pode ser calculado recorrendo à seguinte fórmula, considerando  $i$  como os alelos que um determinado marcador apresenta,  $p$  como as suas respectivas frequências e  $n$  como o número de diferentes alelos:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2 = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Os valores do PIC variam entre 0 e 1, correspondendo um PIC de 0 a um marcador que possui apenas um alelo, e um PIC de 1 a um marcador com um número infinito de alelos. Marcadores com um PIC superior a 0,7 são considerados altamente informativos (Hildebrand *et al.*, 1992).

## 1.4. Estatística e a Genética

A Estatística tem acompanhado a Genética desde os seus primórdios. Foi nos finais do século passado que Mendel estabeleceu os alicerces da Genética. A dedução dos princípios básicos, posteriormente transformados em leis, da transmissão de caracteres hereditários de geração em geração, tiveram como suporte a repetição de experiências com a ervilha-de-cheiro.

Nestas últimas décadas, intensificou-se a ligação Estatística-Genética, tendo-se a Estatística tornado fundamental em varias áreas, como é o caso da Análise Forense.

### 1.4.1. A Importância do Princípio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A teoria da evolução defendida por Darwin, em 1859, no livro "*A Origem das Espécies*", renova-se com o interesse pelas frequências genotípicas e genéticas numa determinada população. O estudo evolutivo de uma população ao longo do tempo, ou a sua caracterização genética em determinados momentos, desde cedo impuseram a presença imprescindível da Matemática na Genética, em particular, na Genética das Populações.

Em 1908, o matemático inglês G. H. Hardy e o físico alemão G. Weinberg, demonstraram independentemente, o conhecido Princípio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, que se pode enunciar da seguinte forma: numa população em que os cruzamentos ocorram ao acaso e na ausência de mutações, selecção natural e migração, as frequências genéticas e genotípicas associadas a um determinado *locus* permanecem constantes de geração em geração.

As frequências genotípicas determinam as genéticas. Considerando os alelos A e a, os três genótipos possíveis são AA, Aa e aa. Sob a validade deste princípio, a frequência conjunta de um par de alelos é o produto das frequências alélicas; assim, existe a relação entre as frequências genotípicas e genéticas:

$$P_{AA} = P_A^2$$

$$P_{Aa} = 2P_A P_a$$

$$P_{aa} = P_a^2$$

Se, numa população, num dado momento, se verificar um excesso de homozigóticos ou heterozigóticos, ocorre um desequilíbrio. Para averiguar o equilíbrio/desequilíbrio de populações foram desenvolvidos vários estudos estatísticos. Um estudo geométrico, efectuado, em 1926, pelo estatístico Bruno De Finetti, permite verificar se uma ou mais populações estão ou não em equilíbrio, tendo em conta os genótipos determinados por dois alelos (A, a) através de um triângulo - Triângulo de De Finetti.

Weir descreve alguns testes estatísticos para averiguar a validade do equilíbrio de Hardy-Weinberg, por vezes também designados por testes de independência. Ultimamente, com o uso dos fragmentos de DNA (medidos em pares de bases (pb) ou kilobases (kb)) na análise forense e na identificação da paternidade, surgiram novos testes e readaptações (Weir, 1993).

A necessidade de estimar as frequências genotípicas e genéticas que, obviamente, dependem da verificação ou não deste princípio, contribuiu para a implantação da amostragem e para o desenvolvimento de métodos estatísticos de estimação na Genética.

#### 1.4.2. O Contributo das investigações de Morgan

Os primeiros registos da organização dos genes nos cromossomas devem-se a Morgan e seus colaboradores, que, entre 1909 até por volta de 1940, estudaram activamente a hereditariedade de caracteres da mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*).

As exaustivas experiências de cruzamentos de milhares e milhares de moscas-da-fruta, revelaram que todos os seus genes podiam ser dispostos em grupos, consoante fossem ou não transmitidos segundo as leis de Mendel. Pares de caracteres que não obedeciam ao esquema mendeliano passavam de geração em geração sempre ligados. Segundo Morgan, os genes que os controlavam

estavam no mesmo cromossoma e são designados por genes ligados. O tipo de herança correspondente, designa-se por ligação factorial ou *linkage*.

Nalguns caracteres investigados, a ligação revelou-se apenas parcial: em algumas experiências com as moscas-da-fruta, apareceram proporções fenotípicas em determinadas gerações menos habituais. Morgan atribuiu essas percentagens irregulares a alguns acontecimentos que poderão ocorrer na formação dos gâmetas. Os cromossomas homólogos emparelham e, antes de se separarem, podem "cruzar-se" e trocar segmentos idênticos. Estes processos ficaram conhecidos por recombinação. Em particular, o fenómeno de emparelhamento seguido por uma troca de material passou a ser designado por *crossing-over*.

Quanto mais afastados estejam dois genes num dado cromossoma, maior será a probabilidade de ocorrer *crossing-over* entre eles. A frequência de *crossing-over* é expressa em termos de percentagem de recombinação ou distância genética entre dois *loci*. A unidade, arbitrária, da distância genética é chamada: unidade de recombinação, unidade de mapa, ou centimorgan (cM) e corresponde, por convenção, a 1% de recombinação (Lawrence *et al.*, 2006).

Com base nas excepções às leis de Mendel, iniciou-se a elaboração dos primeiros mapas genéticos ou mapas de *linkage*, que tentam mostrar a disposição e a distância dos genes para cada cromossoma em vários seres vivos. Como dependem de inúmeros cruzamentos, nem sempre possíveis nalgumas espécies, essa cartografia genética avançou devagar, principalmente no Homem, o alvo das maiores atenções.

Este tipo de mapas, apesar de actualmente os geneticistas os continuarem a elaborar, foram ultrapassados pelos mapas físicos que surgiram com a descoberta do DNA e que não dependem de uma observação indirecta da expressão dos genes, mas de uma manipulação directa do material genético.

### **1.4.3. Estatística aplicada à determinação da Zigotia**

Segundo as leis de segregação de Mendel, pais possuindo genótipos (b,c) e (d,e) podem originar, com igual probabilidade, descendência com as seguintes

combinações: (b,d), (b,e), (c,d) e (c,e). A Figura 5 mostra os 16 possíveis pares de gêmeos DZ e o número de alelos idênticos partilhados por descendência (IBD).

	(b,d)	(b,e)	(c,d)	(c,e)
(b,d)	<b>2</b>	1	1	0
(b,e)	1	<b>2</b>	0	1
(c,d)	1	0	<b>2</b>	1
(c,e)	0	1	1	<b>2</b>

**Figura 5** - Pares de gêmeos DZ e número de alelos idênticos partilhados por descendência

Baseado no número de alelos IBD entre os possíveis 16 pares de gêmeos, existem 3 tipos de pares de gêmeos DZ:

1. aqueles que não partilham nenhum alelo ( $Z_0$ ), com frequência de  $4/16 = 1/4$ ;
2. aqueles que partilham um alelo ( $Z_1$ ), com frequência de  $8/16 = 1/2$ ;
3. aqueles que partilham dois alelos ( $Z_2$ ), com frequência de  $4/16 = 1/4$ .

Sendo assim, a probabilidade de concordância genotípica entre dois gêmeos DZ é:

$$M(DZ) = 1/4 \text{ Prob}(z_0) + 1/2 \text{ Prob}(z_1) + 1/4 \text{ Prob}(z_2)$$

Quando dois gêmeos DZ não possuem alelos IBD ( $z_0$ ), são considerados como dois indivíduos não relacionados. Assumindo uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a probabilidade de concordância genotípica entre dois indivíduos ao acaso é o somatório das frequências de todos os pares de genótipos idênticos. Simplificando, primeiro considera-se um *locus* com dois alelos: alelo  $A_i$  e alelo  $A_j$ , com frequências  $p_i$  e  $p_j$ , e genótipos  $A_i A_i$  e  $A_i A_j$ , com frequências  $(p_i p_i)$  e  $(p_i p_j)$ . A frequência de dois indivíduos ao acaso ambos serem  $A_i A_i$  é  $(p_i)^2 \times (p_i)^2 = (p_i)^4$  e a frequência de dois indivíduos ao acaso ambos serem  $A_i A_j$  é  $(2p_i p_j) \times (2p_i p_j) = (2p_i p_j)^2$ . Assim sendo, a probabilidade aleatória de concordância de dois indivíduos ao acaso é:

$$\begin{aligned}
 M_0 &= \sum_{i=1}^n (A_i A_i)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (A_i A_j)^2 \\
 &= \sum_{i=1}^n (p_i)^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2
 \end{aligned}$$

Para *loci* com mais de dois alelos ( $n$ ),  $i$  e  $j$  apresentam valores desde 1 a  $n$ .

Quando dois gêmeos DZ possuem um alelo IBD ( $z_1$ ), são considerados como um par pai/filho, sendo a probabilidade de concordância genotípica entre pai e filho igual ao somatório das probabilidades de homozigotia. A frequência de um indivíduo ao acaso ser  $A_i$  é  $(p_i)$  e a frequência de pai e filho ambos serem  $A_i$  é  $(p_i)^2$ . Assim sendo, a probabilidade aleatória de concordância entre pai e filho igual é:

$$a_2 = \sum_{i=1}^n (p_i)^2$$

Quando dois gêmeos DZ possuem ambos os alelos IBD ( $z_2$ ), são como gêmeos MZ com probabilidade de concordância genotípica igual a 1. Assim sendo, a probabilidade de concordância genotípica entre dois gêmeos DZ -  $M(DZ)$  é (Nyholt, 2006):

$$\begin{aligned}
 M(DZ) &= 1/4 \text{Prob}(z_0) + 1/2 \text{Prob}(z_1) + 1/4 \text{Prob}(z_2) \\
 &= 1/4 M_0 + 1/2 a_2 + 1/4 \\
 &= 1/4 \left( \sum_{i=1}^n (p_i)^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2 \right) + 1/2 \sum_{i=1}^n (p_i)^2 + 1/4
 \end{aligned}$$

### 1.5. Objectivo

Este trabalho teve como principal objectivo a implementação de métodos bioestatísticos para calcular a probabilidade média de concluir correctamente que um par de gémeos é MZ quando partilha o mesmo genótipo em todos os *loci*. Para tal foram seleccionados 8 marcadores polimórficos com elevada taxa de sucesso na população alvo.

A importância clínica da determinação da zigotia reflecte a necessidade de aumentar a precisão dos resultados, dotando-os de uma probabilidade de monozigotia num intervalo de confiança e mediante diferentes níveis de erro.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Local do estudo e População

Este estudo foi realizado na Unidade de Genética Molecular do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães.

O estudo incidiu sobre um grupo de 9 pares de fetos gemelares e respectivos pais, que recorreram a esta unidade para realização de estudos pré-natais, entre os quais a determinação da zigotia.

Todos estes fetos foram considerados “aparentemente MZ” após a determinação da zigotia. A informação reunida para cada família está disponível na Tabela I.

**Tabela I** - Dados referentes a cada gestação estudada

Identificação da família	Indicação para o estudo	Idade gestacional (semanas)	Sexo	Corionicidade	Resultado molecular
715	IMA	15	M	DA/MC	Aparentemente MZ
720	IMA	14	F	DA/DC	Aparentemente MZ
736	IMA	15	M	DA	Aparentemente MZ
757	IMA	20	F	DA/MC?	Aparentemente MZ
780	---	---	F	DA/MC	Aparentemente MZ
819	IMA	22	F	DA/DC	Aparentemente MZ
827	---	16	F	DA/DC	Aparentemente MZ
849	2ºfeto Fibrose quistica?	24	M	DA/DC	Aparentemente MZ
859	IMA	14	M	DA/DC	Aparentemente MZ

IMA – Idade materna avançada; M – masculino; F – feminino; DA – diamnióticos; DC – dicoriônicos; MC – monocoriônicos; --- – sem informação;

A população controlo utilizada consistiu num grupo de 50 indivíduos (pais de fetos gemelares) não relacionados que recorreram a esta unidade para realização de estudos pré-natais.

### 2.2. Material Biológico

Em todos os fetos os estudos moleculares foram efectuados em DNA genómico obtido a partir de aproximadamente 2 mL de líquido amniótico não cultivado, previamente recolhido por amniocentese.

Nos pais os estudos moleculares foram efectuados em DNA genómico obtido a partir de sangue periférico, recolhido em 2 *spots* de cartão Guthrie.

### 2.3. Análise Molecular

O DNA genómico foi obtido pelos métodos convencionais de extracção (protocolo em Anexo 1) e posteriormente amplificado pela PCR em multiplex usando a *PCR Master Mix – Multiplex QIAGEN*<sup>®</sup> (protocolo em Anexo 2). Foi utilizado um conjunto de marcadores polimórficos (subdivididos em painéis de *primers* – Anexo 2) localizados nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y, uma vez que é nestes cromossomas que ocorrem as aneuploidias mais frequentes na população. Um dos respectivos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) de cada marcador foi marcado com um fluorocromo para posterior análise em sequenciador automático (Anexo 2).

De forma a determinar o tamanho dos alelos, os produtos da PCR foram submetidos a electroforese capilar num sequenciador automático *ABI 3130xl* Applied Biosystems e o tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado usando o programa *GeneScan*.

A análise dos resultados foi feita recorrendo á aplicação *GeneMapper* para análise de fragmentos (Anexo 3).

## 2.4. Análise Bioestatística/Bioinformática

De acordo com os resultados observados, foram seleccionados 8 marcadores polimórficos com elevada taxa de sucesso na população de fetos gemelares em estudo e representativos de diferentes cromossomas: D13S742, D13S1265, D18S59, D18S978, D21S1414, D21S1914, DXS1224 e DXS7593.

Para cada marcador fez-se um estudo populacional em 50 indivíduos (população controlo) com o objectivo de determinar o número de alelos presentes na população, a frequência de cada alelo, a heterozigotia e o PIC dos marcadores.

Posteriormente, de acordo com os alelos observados na nossa população e com as medidas qualitativas e quantitativas dos marcadores estudados, calculou-se a probabilidade média de MZ:DZ para cada par de fetos gemelares, recorrendo ao programa *ECLIPSE2* (Sieberts *et al*, 2002).

Uma vez que a estratégia de determinação da zigotia optimizada pela Unidade de Genética Molecular envolve a amplificação de diferentes marcadores polimórficos será importante determinar qual a probabilidade de um par de gémeos DZ ser genotipicamente idêntico em todos os marcadores estudados.

Esta situação apesar de extremamente rara deve ser equacionada uma vez que pode implicar uma pressuposição errada de monozigotia.

Da literatura consultada foi seleccionado o programa *ECLIPSE2* como ferramenta de análise bioestatística para avaliação da zigotia. Este programa permite efectuar cálculos probabilísticos aplicados á determinação da zigotia, permitindo, entre outras funções, calcular a probabilidade exacta e aproximada de um par de gémeos DZ ser concordante em ambos os alelos em múltiplos *loci*.

Como referido na introdução, a probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ (“genotype match” -  $M(DZ)$ ) é dada pela seguinte formula:

$$\begin{aligned} M(DZ) &= \frac{1}{4} \text{Prob}(Z_0) + \frac{1}{2} \text{Prob}(Z_1) + \frac{1}{4} \text{Prob}(z_2) \\ &= \frac{1}{4} M_0 + \frac{1}{2} a_2 + \frac{1}{4} \end{aligned}$$

As conclusões acerca da zigotia dos gémeos basearam-se no cálculo dos valores de probabilidade associados a cada um dos valores de razão de

probabilidade de MZ:DZ gerados pelo Eclipse2. Para o efeito, a probabilidade de concordância genotípica  $M(DZ)$  foi utilizada para produzir um valor de razão de probabilidade de MZ:DZ pré-teste. Este valor foi multiplicado pela razão de probabilidade de MZ:DZ, gerada pelo Eclipse, para obtermos uma razão de probabilidades de MZ:DZ pós-teste. A partir deste valor pode calcular-se o valor de probabilidade que lhe está associado assim como o valor do erro experimental que lhe está associado:

$$\begin{aligned}LR(MZ_t / DZ_t) &= M(DZ) / (1-M(DZ)) \\LR(MZ/DZ) &= LR(MZ_t/DZ_t) \times LR(MZ_e/DZ_e) \\P(MZ) &= LR(MZ/DZ) / (LR(MZ/DZ) + 1)\end{aligned}$$

em que

$M(DZ)$	Probabilidade teórica do par de gémeos ser monozigótico
$LR(MZ_t/DZ_t)$	Razão de Probabilidade de MZ:DZ pré-teste
$LR(MZ_e/DZ_e)$	Razão de Probabilidade de MZ:DZ calculado por Eclipse2
$LR(MZ/DZ)$	Razão de Probabilidade de MZ:DZ pós-teste
$P(MZ)$	Probabilidade pós-teste do par de gémeos ser monozigótico

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde 2001 que a Unidade de Genética Molecular do CGMJM efectua a determinação da zigotia englobada no contexto do Diagnóstico Pré-Natal. Desde então recebeu um total de 95 amostras de fetos gemelares com indicação para rastreio rápido de aneuploidias e determinação da zigotia. Após análise molecular verificou-se que em 63 casos os fetos eram dizigóticos (DZ) e em 32 casos os fetos apresentavam resultados compatíveis com “aparentemente monozigóticos”.

Estes números mostram que a nossa população apresenta a mesma tendência de todas as populações gemelares já anteriormente estudadas, representando os gémeos monozigóticos (MZ) aproximadamente um terço da totalidade de gémeos estudados nesta Unidade.

Em relação às aneuploidias mais frequentes, foi identificado apenas um caso de trissomia 21 num par de gémeos DZ, apresentando os restantes gémeos resultados normais para o rastreio das aneuploidias 13, 18, 21, X e Y (é de salientar que as técnicas utilizadas não permitem a detecção de aneuploidias parciais nem mosaicos).

#### 3.1. Análise de 8 marcadores STRs na população portuguesa

Para o correcto cálculo da probabilidade de um par de gémeos ser MZ é extremamente importante realizar o estudo das características dos marcadores utilizados na determinação da zigotia.

Qualitativamente a informatividade de um marcador depende do número de alelos que ele apresenta e das suas respectivas frequências. Quantitativamente, o grau de polimorfismo do marcador é avaliado pela heterozigotia e pelo PIC (Polymorphism Information Content).

Foram seleccionados para análise 8 marcadores polimórficos não ligados, com elevada taxa de sucesso na população de fetos gemelares em estudo e representativos de diferentes cromossomas.

Após análise de uma população controlo (50 indivíduos – 100 alelos), foi efectuada uma caracterização qualitativa e quantitativa de cada um dos 8 marcadores na população portuguesa.

Em anexo encontra-se a descrição de todos os alelos encontrados por marcador e as respectivas frequências (Anexo 4), tal como a localização citogenética e distância em cM no respectivo cromossoma (Anexo 5).

Partindo desses dados foi possível calcular a heterozigotia e PIC por marcador. A Tabela II apresenta estes resultados bem com o tipo de repetição, o número de alelos e o tamanho do alelo (em pares de bases) menor e maior na nossa população controlo.

**Tabela II** - Características qualitativas e quantitativas de 8 marcadores polimórficos na população portuguesa (pb = pares de bases)

<b>Marcador</b>	<b>Repetição</b>	<b>Nº de alelos</b>	<b>Alelo menor (pb)</b>	<b>Alelo maior (pb)</b>	<b>Heterozigotia</b>	<b>PIC</b>
D13S742	AC	18	339	375	0,910	0,903
D13S1265	AC	13	278	304	0,808	0,790
D18S59	AC	9	156	174	0,825	0,803
D18S978	ACTC	5	239	255	0,705	0,651
D21S1414	TATC	10	339	363	0,854	0,837
D21S1914	GT	10	202	220	0,830	0,810
DXS1224	TG	6	160	176	0,446	0,418
DXS7593	GT	8	215	231	0,729	0,692

De acordo com o que está descrito, normalmente quantos mais alelos um marcador apresenta mais informativo este é. Da análise da Tabela II pode concluir-se que dos 8 marcadores seleccionados, à excepção do marcador DXS1224, todos os outros marcadores apresentam valores de heterozigotia e PIC bastante elevados. A análise conjunta destes valores sugere que os marcadores são altamente polimórficos.

### 3.2. Probabilidade exacta e aproximada de concordância genotípica de um par de gémeos DZ

Recorrendo a folhas de cálculo disponibilizadas por Nyholt (2006), foi possível determinar o valor de  $M(DZ)$  obtido através do uso de cada marcador (Tabela III). Estes cálculos baseiam-se na frequência de cada um dos alelos na nossa população controlo, sendo estas probabilidades denominadas de probabilidades exactas.

**Tabela III** - Probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ baseada na frequência alelica de diferentes marcadores polimórficos.

Marcador	$a_2 = \text{SUM}(p_i^2)$	$a_4 = \text{SUM}(p_i^4)$	$M_o = 2a_2^2 - a_4$	$0.25 + 0.5a_2 + 0.25M_o$
D13S742	0,090315	0,001239	0,015074799	0,298926340
D13S1265	0,192470	0,019034	0,055055471	0,359998778
D18S59	0,175083	0,009127	0,052180841	0,350586570
D18S978	0,294603	0,032124	0,141458824	0,432666441
D21S1414	0,146117	0,004133	0,038567616	0,332700559
D21S1914	0,169931	0,008921	0,048831772	0,347173448
DXS1224	0,554440	0,280108	0,334699594	0,610894953
DXS7593	0,271013	0,036305	0,110590909	0,413154122

Foi também calculada a probabilidade exacta de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados, na nossa população controlo (Tabela IV).

**Tabela IV** - Probabilidade exacta de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados.

<b>Prob. de um par DZ partilhar ambos os alelos em todos os loci =</b>	0,000475874
<b>Razão de Probabilidade de MZ:DZ =</b>	2101,395
<b>Probabilidade do par de gémeos ser MZ (%) =</b>	99,952

Presciuttini e colaboradores mostraram que a probabilidade  $M(DZ)$  dependeria da heterozigotia (H) do locus, sendo pouco afectada pela variação da distribuição das frequências alélicas (Presciuttini *et al*, 2002). Isso permitiu-lhe obter uma série de curvas empíricas relacionando  $M(DZ)$  e H e avançar com uma equação para o cálculo aproximado da probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ,  $M(DZ)_{aprox}$ :

$$M(DZ)_{aprox} = 0,7753 + 0,0358 \times H - 1,1771 \times H^2 + 0,6181 \times H^3$$

O valor aproximado para  $M(DZ)_{aprox}$ , obtido através do uso de cada marcador e tendo em conta a sua heterozigotia na nossa população controlo, foi calculado utilizando a folha de cálculo fornecida por (Nyholt, 2006) de acordo com a metodologia apresentada por (Presciuttini *et al*, 2002) (Tabela V).

**Tabela V** - Probabilidade de concordância genotípica entre dois gémeos DZ baseada na heterozigotia de diferentes marcadores polimórficos.

<b>Marcador</b>	<b>Heterozigotia (H)</b>	<b>Probabilidade de partilharem ambos os alelos</b>
D13S742	0,90975436	0,299044010
D13S1265	0,80803277	0,361775168
D18S59	0,82493827	0,350783896
D18S978	0,70533241	0,431841305
D21S1414	0,85386258	0,332455710
D21S1914	0,83007545	0,347483012
DXS1224	0,44560634	0,612212451
DXS7593	0,72899927	0,415304110

Após o cálculo de  $M(DZ)$  baseado na heterozigotia dos marcadores foi calculada, na nossa população controlo, a probabilidade aproximada de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados (Tabela VI).

**Tabela VI** - Probabilidade aproximada de um par de gémeos DZ partilhar ambos os alelos em todos os marcadores polimórficos utilizados.

<b>Prob. de um par DZ partilhar ambos os alelos em todos os loci =</b>	0,000481364
<b>Razão de Probabilidade de MZ:DZ =</b>	2077,431
<b>Probabilidade do par de gémeos ser MZ (%) =</b>	99,952

Quer no cálculo da probabilidade exacta quer no cálculo da probabilidade aproximada a percentagem de probabilidade de monozigotia utilizando este conjunto de marcadores é bastante elevada e satisfatória. O resultado de ambos ao cálculos é bastante similar, sendo o cálculo aproximado uma boa alternativa quando se recorre a bases de dados populacionais para obter o valor da heterozigotia, evitando o estudo das características dos marcadores numa população controlo.

### **3.3. Cálculo da probabilidade média de MZ/DZ em 9 pares de fetos gemelares**

O programa *ECLIPSE2* permite estabelecer probabilidades de relações de parentesco em pares de indivíduos relacionados (por ex: meios-irmãos, pai - filho, primos em 1º grau, avô - neto) ou não relacionados, permitindo assim, entre outras funções, calcular a probabilidade média de MZ/DZ para pares de fetos gemelares. Este programa baseia-se numa abordagem paramétrica, assumindo percentagens de erro, possíveis correlações na partilha de alelos devidas ao uso marcadores relacionados e tendo em conta que a probabilidade de um par de

indivíduos partilhar alelos comuns na população é maior do que a probabilidade de partilhar alelos raros.

Após análise dos 8 marcadores polimórficos numa população controlo e da recolha de dados efectuada aos fetos gemelares e respectivos pais, foi calculada a razão de probabilidade de MZ/DZ (“likelihood ratio” -  $LR(MZ/DZ)$ ) (Tabela VII).

O software recorre a três tipos de dados:

- **MapFile** – Este ficheiro diz respeito às características dos 8 marcadores polimórficos utilizados na determinação da zigotia: 1) identificação do cromossoma em que o marcador se encontra; 2) posição em cM; 3) nº de alelos do marcador; 4) nome de cada alelo e a respectiva frequência. O ficheiro com estes dados encontra-se no Anexo 6.
- **PedigreeFile** – Este ficheiro diz respeito às características dos 9 fetos gemelares estudados e respectivos pais: 1) identificação da família; 2) identificação do indivíduo; 3) identificação de pai e mãe se conhecidos; 4) sexo; 5) alelos observados por marcador. Este estudo foi dividido em duas fases. A primeira utilizando apenas dados referentes aos 9 fetos gemelares e a segunda utilizando dados referentes aos 9 fetos gemelares e respectivos pais. Os ficheiros com estes dados encontram-se no Anexo 7.
- **ErrorFile** – Por último, neste ficheiro devem ser introduzidos uma série de erros teóricos possíveis, permitindo obter probabilidades de MZ/DZ diferentes tendo em conta cada valor de erro estabelecido. O ErrorFile efectuado para este estudo encontra-se em anexo (Anexo 8). Para esta determinação o programa assume sempre que um erro de genotipagem possa ocorrer em pelo menos um alelo por *locus*/indivíduo.

**Tabela VII** - Comparações entre os genótipos dos gêmeos estudados para identificação da zigotia

<b>Identificação da família</b>	<b>Identificação dos fetos comparados</b>	<b>Erro experimental</b>	<b>LR(MZ/DZ)</b>	<b>Conclusão (Margem de erro)</b>
f_715	a715 : b715	0	11,1997	P(MZ) > 91% Erro < 0.001
		0,001	11,1918	
		0,01	11,1172	
		0,05	10,7178	
f_720	a720 : b720	0	10,1827	P(MZ) > 90% Erro < 0.05
		0,001	10,1787	
		0,01	10,1421	
		0,05	9,9712	
f_736	a736 : b736	0	49,0636	P(MZ) > 97% Erro < 0.01
		0,001	49,0255	
		0,01	48,6726	
		0,05	46,8865	
f_757	a757 : b757	0	279,898	P(MZ) > 99% Erro < 0.001
		0,001	279,688	
		0,01	277,780	
		0,05	268,817	
f_780	a780 : b780	0	78,9205	P(MZ) > 98% Erro < 0.001
		0,001	78,8603	
		0,01	78,3123	
		0,05	75,7361	
f_819	a819 : b819	0	186,146	P(MZ) > 99% Erro < 0.001
		0,001	185,972	
		0,01	184,404	
		0,05	177,206	
f_827	a827 : b827	0	241,092	P(MZ) > 99% Erro < 0.001
		0,001	240,875	
		0,01	238,904	
		0,05	229,712	
f_849	a849 : b849	0	198,602	P(MZ) > 99% Erro < 0.001
		0,001	198,434	
		0,01	196,906	
		0,05	189,735	
f_859	a859 : b859	0	190,467	P(MZ) > 99% Erro < 0.001
		0,001	190,281	
		0,01	188,595	
		0,05	180,785	

As folhas com a totalidade dos resultados obtidos são apresentadas em anexo, devido à sua extensão (Anexo 9).

O que se pode imediatamente observar é que independentemente de inserir no programa o tamanho dos alelos observados nos pais, ou não, os resultados que relacionam os dois fetos são sempre iguais. Assim sendo, podemos tirar conclusões apenas inserindo os dados dos fetos no programa informático.

A razão de probabilidade de MZ/DZ representa o conjunto de probabilidades a favor de dois indivíduos serem um par de gémeos MZ comparadas com o conjunto de probabilidades de dois indivíduos serem um par DZ, sendo que valores superiores a 1 representam uma grande probabilidade do par ser MZ. Quanto mais elevados os valores obtidos, maior é a certeza do par ser MZ.

Todos os valores obtidos de razão de probabilidade,  $LR(MZ/DZ)$ , para os 9 fetos gemelares em estudo, independentemente da margem de erro utilizada, são sempre indicadores de elevada probabilidade de MZ. No entanto é sempre importante incorporar margens de erro nos resultados pois, por exemplo, dois indivíduos que partilham ambos os alelos em 7 marcadores de 8 em estudo, apresentam maior probabilidade de serem um par MZ com um erro de genotipagem, do que um par DZ.

Os valores de erro utilizados neste trabalho referem-se a margens de erro teóricas na quantificação dos marcadores. Apesar de uma margem de erro de 0,05 ser elevada, este valor foi utilizado como referência e, associou-se os valores de erro que apresentavam uma probabilidade de monozigotia idêntica. Os valores de erro 0,001, 0,01 e 0,05 equivalem respectivamente a uma margem de erro nos resultados de 0,1%, 1% e 5%.

A correspondência dos resultados da razão de probabilidade,  $LR(MZ/DZ)$ , a uma percentagem foi obtida através do cálculo da probabilidade pós-teste do par de gémeos ser MZ ( $P(MZ)$ ). A folha de cálculo utilizada encontra-se em anexo (Anexo 10).

Pode-se observar que o par de fetos gemelares (f\_757) com o maior valor de razão de probabilidade,  $LR(MZ/DZ)$  – 279,898 e probabilidade pós-teste,  $P(MZ)$  – 99%, também é o par com maior número de resultados (8 marcadores). Os pares f\_715 e f\_720 em que apenas se obteve resultado de 3 e 4 marcadores (dos marcadores estudados) respectivamente, são os pares com valores menores de razão de probabilidade,  $LR(MZ/DZ)$  e de probabilidade pós-teste,  $P(MZ)$  – 11,200 - 91% e 10,183 - 90%, respectivamente.

Nos pares f\_757, f\_819, f\_827, f\_849 e f\_859 a probabilidade pós-teste,  $P(MZ)$ , apresenta valores na ordem dos 99% para uma margem de erro inferior a

0,1%. Em todos estes casos obtiveram-se resultados num mínimo de 7 dos 8 marcadores utilizados. Estes valores conferem um elevado grau de confiança e demonstram a elevada probabilidade de monozigotia.

#### 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A escolha da população em estudo recaiu nestes 9 casos de fetos gemelares aparentemente MZ uma vez que são todos os casos estudados na Unidade de Genética Molecular para a determinação da zigotia após a implementação desta combinação específica de marcadores.

Ecograficamente, todos os pares de fetos gemelares apresentavam o mesmo sexo e, 3 dos 9 pares eram diamnióticos/monocoriônicos, sendo estas características, em simultâneo, indicadoras de elevada probabilidade de uma gestação gemelar MZ. No entanto, nos 5 casos diamnióticos/dicoriônicos estudados, apenas a utilização de métodos de análise molecular nos poderiam elucidar na determinação da zigotia.

Em conclusão, e apesar do estudo estar restringido à partida pelo número de marcadores utilizados na análise estatística, a maioria dos fetos gemelares apresentavam uma probabilidade de monozigotia superior a 99% para uma margem de erro de 0,1%.

Um estudo mais alargado, abrangendo todos os marcadores polimórficos utilizados na determinação da zigotia na Unidade de Genética Molecular, permitirá fazer ajustes nos painéis de marcadores, recorrendo-se apenas ao uso de marcadores altamente polimórficos. Possibilitará obter uma probabilidade pré-teste correcta tendo em conta os marcadores utilizados, assegurando assim, uma maior precisão e fiabilidade de resultados. Permitirá, também, entrar em linha de conta com um número mais alargado de marcadores para cálculos da probabilidade de zigotia no programa *ECLIPSE2*.

O presente estudo baseou-se na utilização de erros teóricos de genotipagem na determinação de zigotia. O cálculo, futuro, da probabilidade de erro, associada a quantificação de cada marcador, num conjunto de indivíduos controlo poderá traduzir-se na utilização de margens de erro experimentais, e não teóricas, assegurando-se assim, um maior rigor nos resultados. Uma vez que o valor de erro a utilizar no *ECLIPSE2* se refere à probabilidade de um erro de genotipagem ocorrer no máximo num alelo por *locus*, estipula-se este valor como

sendo o valor de erro mais elevado determinado para um conjunto de marcadores estudados.

A implementação e optimização da análise estatística estabelecida neste trabalho, permitirá incorporar no relatório de resultados, apresentado ao utente e aos respectivos médicos, um valor numérico de probabilidade de monozigotia nos fetos gemelares que acederem a esta Unidade para estudos de determinação da zigotia, acrescentando assim, uma vertente mais científica e mais precisa a esta determinação.

Assim sendo, em futuros pedidos de determinação da zigotia, após o rotineiro estudo molecular, a criação de um ficheiro (PedigreeFile) com os dados referentes aos fetos gemelares e aos alelos observados por marcador, permitirá o cálculo imediato no programa *ECLIPSE2* da probabilidade de monozigotia.

## 5. REFERÊNCIAS

- Akane A, Matsubara K, Shioto H, Yamada M, Nakagome Y. Diagnosis of twin zygosity by hypervariable RFLP markers. *Am J Med Genet* 1991;41(1):96-8.
- Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z. Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Human Reprod* 1994; 9:1318-1321.
- Antsaklis A. Invasive genetic studies in a multiple pregnancy. *Balkan J Med Genet* 2006; 91(2):41.
- Arizawa M, Suehara N, Takemura T, Nakayama M. Monozygotic twins discordant for sex. *Acta Obstet Gynecol Jap* 1988; 40:1479-1482.
- Atkins D, Clark M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet.* 2004; 45(1):3-15.
- Ayres D, Montenegro N. *Protocolos de Medicina Materno-Fetal*. Lidel 2005;12.
- Bauer D, Warthoe P, Rohde L, Struss M. PCR Methods and Applications. *Cold Spring Harbor Lab. Press* 1994; S97–S108.
- Beiguelman B, Franchi-Pinto C, Krieger H, Magna A. Twinning rate in a southeastern Brazilian population. *Acta Genet Med Gemellol* 1996; 45:317-324.
- Benirschke K. Multiple gestation, incidence, etiology and inheritance. *Maternal fetal medicine-principles and practice*. Saunders Philadelphia 1994; 3.
- Bomsel-Helmreich O, Papiernik-Berkhauer E. Delayed ovulation and monozygotic twinning. *Acta Genet Med Gemellol* 1976; 25:73-76.
- Boomtsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond. *Nat Genet* 2002; 3:872-82.
- Campbell M, Templeton A. Maternal complications of twin pregnancy. *International J Gynecol Obstet* 2004; 1(84):71-73(3).
- Cirigliano V, Ejarque M, Canadas P, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(10):1001-6.
- Chen J, Wang J, Yu V, Lee K. Perinatal mortality and prevalence of major congenital malformations of twins in Taipei City. *Acta Genet Med Gemellol* 1992; 41:197-203.

- Chen J, Chang W, Wu Z, Lin C, Chang C, Chiu N, Soong T. Diagnosis of zygosity by questionnaire and polymarker polymerase chain reaction in young twins. *Behav Genet* 1999; 29(2):115-23.
- Cunniff C. Prenatal Screening and Diagnosis for Pediatricians. *Pediatrics* 2004; 114:889-894.
- Dallapiccola B, Stomeo C, Ferranti G, Di Lecce A, Purpura M. Discordant sex in one of three monozygotic triplets. *J Med Genet* 22: 6-11, 1985.
- D'Alton E, Dudley K. The ultrasonographic prediction of chorionicity in twin gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160(3):557-561.
- Derom R, Bryan E, Derom C, Keith L, Vlietinck R. Twins, chorionicity and zygosity. *Twin Research* 2001; 4:134–136.
- Divon Y, Girz A, Sklar A, Guidetti A, Langer O. Discordant twins - A prospective study of the diagnostic value of real-time ultrasonography combined with umbilical artery velocimetry. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(3):757-760.
- Edwards H, Dent T, Kahn J. Monozygotic twins of different sex. *J Med Genet* 1966; 3:117-123.
- Ferreira I. Corionicidade e Complicações Perinatais. *Acta Med Port* 2005; 18:183-188.
- Fisk M, Borrell A, Hubinont C, Tannirandorn Y, Nicolini U, Rodeck H. Fetofetal transfusion syndrome: do the neonatal criteria apply in utero? *Arch Dis Child* 1990; 65(7):657-661.
- Fujimoto A, Boelter D, Sparkes S, Lin S, Battersby K. Monozygotic twins of discordant sex both with 45,X/46,X,idi(Y) mosaicism. *Am J Med Genet* 1991; 41:239-245.
- Gardner O, Goldenberg L, Cliver P, Tucker M, Nelson G, Copper L. The origin and outcome of preterm twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 1995; 85(4):553-557.
- Hasbargen U, Lohse P, Thaler J. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C-->T mutation. *Hum Reprod* 2000; 15:2659-2662.
- Hildebrand C, Torney D, Wagner R. Informativeness of Polymorphic DNA Markers. *Los Alamos Science* 1992; 20:101-102.
- Jeffreys J, Wilson V, Thein L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985; 316:76-9.
- Khalid K. Conjoined Twins. *Emedicine* Jan 2007;1-11.

- Keith L. Mortality and morbidity among twins: recent observations from the United States. *Acta Genet Med Gemellol* 1994; 43:25-31.
- Keith L, Machin G. Zygosity testing, current status and evolving issues. *J Reprod Med* 1997; 42:699–707.
- Kurosawa K, Kuromaru R, Imaizumi K, Nakamura Y, Ishikawa F, Ueda K, Kuroki Y. Monozygotic twins with discordant sex. *Acta Genet Med Gemellol* 1992; 41:301-310.
- Lawrence C, Seigfried T, Bass H, Anderson L. Predicting Chromosomal Locations of Genetically Mapped Loci in Maize Using the Morgan2McClintock Translator. *Genetics* March 2006; 172:2007-2009.
- Levett J, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio- PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17(2):115-8.
- Lewis M, Healey C, Martin G. Genetic contribution to DZ twinning. *Am J Med Genet* 1996; 61:237-246.
- Lippman A, Tomkins DJ, Shime J, Hamerton L. Canadian multicentre randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis - Final report. *Prenat Diagn* 1992; 12:385–408.
- Lumme H, Saarkoski V. Perinatal deaths in twin pregnancy: a 22-year review. *Acta Genet Med Gemellol* 1988; 37:47-54.
- Malinowski W, Waszynski W. Superfecundation in etiology of twin pregnancy. *Ginekol Pol* 2006; 77(10):797-803.
- Mann K, Donaghue C, Fox S, Docherty Z, Ogilvie C. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European J Hum Genet* 2004; 12:907–915.
- Meulemans J, Lewis M, Boomsma I, Derom A, Van den Berghe H, Orlebeke F, Vlietinck F, Derom M. Genetic modeling of dizygotic twinning in pedigrees of spontaneous dizygotic twins. *Am J Med Genet* 1996; 61:258-263.
- Molina A, Tobo P. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein* 2004; 2(2):139-142.
- Moreira-Filho A. Medicina genômica e prática clínica. *Genômica*. Atheneu 2004; 195-206.
- Nicolaides H, Sebire J, Snijders M. Gestação múltipla - O exame ultra-sonográfico entre 11-14 semanas. *Diagnóstico de anomalias fetais*. Parthenon Publishing Group 1999; 155-94.

- Nylander S. The factors that influence twinning rates. *Acta Genet Med Gemellol* 1981; 30:189-202.
- Nyholt D. On the Probability of Dizygotic Twins Being Concordant for Two Alleles at Multiple Polymorphic Loci. *Twin Research and Human Genetics* 2006; 9(2):194–197.
- Parisi P, Caperna G. Twinning rates, fertility and industrialization: a secular study. *Human Genetics*. Bonn -Tamir N.York Ed.1982; A:375-394.
- Pharoah P. Neurological outcome in twins. *Semin Neonatol* 2002; 7:223-230.
- Pinto W. Prenatal Diagnosis. *Ciência & Saúde Colectiva* 2002; 7(1):139-157.
- Powers F, Kiely L. The risks confronting twins: A national perspective. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(2):456-461.
- Presciuttini S, Toni C, Tempestini E, Verdiani S, Casarino L, Spinetti I, De Stefano F, Domenici R, Bailey-Wilson J E. Inferring relationships between pairs of individuals from locus heterozigoties. *BMC Genetics* 2002; 3(1): 23.
- Reindollar H, Byrd R, Hahn H, Haseltine P, McDonough G. A cytogenetic and endocrinologic study of monozygotic isokaryotic 45,X/46,XY twins discordant for phenotypic sex: mosaicism versus chimerism. *Fertil Steril* 1987; 47:626-633.
- Rodrigues M, Pinelo S,Carvalho I,Figueiredo H, Felgueira E, Pinho M. Comparative study of the obstetric and neonatal complications of in vitro fertilization/intracitoplasmatic sperm injection twin pregnancies vs naturally conceived twin gestations. *Fertilidad* 2005; 22(6):395-401.
- Santema G, Swaak M, Wallenburg S. Expectant management of twin pregnancy with single fetal death. *Br J Obstet Gynecol* 1995;102(1):26-30.
- Scardo A, Ellings M, Newman B. Prospective determination of chorionicity, amnionicity, and zygosity in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1376–1380.
- Schinzel A, Smith W, Miller R. Monozygotic twinning and structural deffects. *J Pediatr* 1979; 95:921-930.
- Sieberts SK, Wijsman EM, Thompson EA. Relationship inference from trios of individuals, in the presence of typing error. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1):170-80
- Simpson N, Dallaire L, Miller R. Prenatal diagnosis of genetic disease in Canada: report of a collaborative study. *Can Med Assoc J* 1976; 115:739–748.

- Shete S, Tiwari H, Elston R. On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value. *Theoretical Population Biology* 2000; 57:265-271.
- St. Clair M, St. Clair B, Swainson P, Bamforth F, Machin A. Twin zygosity testing for medical purposes. *Am J Med Genet* 1998; 77:412–414.
- Stephen C, Tyfield L, Reeve L, Porter H, Soothill P, Kyle P. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:757-61.
- Thompson M, McInnes R, Willard H. *Genetics in Medicine*. Guanabara Koogan. 1993; (5):69-81.
- Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikantikul C, Sirirhotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:719–723.
- Valenti C, Schutta EF, Kehaty T. Cytogenetic diagnosis of Down's syndrome in utero. *J Am Med Assoc* 1969; 207:1513.
- Veillon M. Impact of molecular genetics on the practice of pathology. *Pathol Case Rev* 2002; 7(2):51-2.
- Warren C, Butler J, Morsman M, Mckenzie C, Rodek H. Does chorionic villus sampling cause fetomaternal haemorrhage? *Lancet* 1985; 1:201.
- Weir S. Independence tests for VNTR alleles defined as quantile bins. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 53:1107-1113.
- Winn N, Gabrielli S, Reece A, Roberts A, Salafia C, Hobbins C. Ultrasonographic criteria for the prenatal diagnosis of placental chorionicity in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(6I):1540-1542.

## 6. ANEXOS

### Anexo 1 – Extracção de DNA de amniócitos não cultivados e de sangue periférico recolhido em cartão Guthrie

#### Reagentes:

- *ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System* da Promega:  
*ReadyAmp™ Genomic DNA Purification Resin*
- H<sub>2</sub>O bidestilada e estéril

#### Método:

1. **a) Passo específico para líquido amniótico** – Homogeneizar o líquido amniótico e transferir aproximadamente 1,5 mL para um eppendorf;
1. **b) Passo específico para sangue periférico recolhido em cartão Guthrie** – Recolher dois spots ( $\pm$  4 mm de diâmetro) com sangue seco para um eppendorf, adicionar 1mL de H<sub>2</sub>O e agitar durante 10min (repetir 2x);
2. Centrifugar a 20820 g durante 15min e remover o sobrenadante (no caso dos sangues secos em cartão Guthrie, passar directamente para a alínea 4);
3. Ressuspender o pellet no líquido residual por agitação no vórtex;
4. Adicionar 75 $\mu$ l de resina *ReadyAmp* e agitar a suspensão no vórtex a elevada velocidade;
5. Incubar a 56 °C durante 20 min em constante agitação;
6. Agitar no vórtex a elevada velocidade durante 5-10s para ressuspender a resina;
7. Incubar a 100 °C durante 8 min em conatante agitação;
8. Agitar no vórtex a elevada velocidade durante 5-10s para ressuspender a resina;
9. Centrifugar a 20820 g durante 4 min;
10. Guardar as amostras centrifugadas a 4 °C.

---

## Anexo 2 – Reacção de PCR em multiplex e análise dos produtos amplificados no sequenciador automático

### Reagentes:

- Conjunto de *primers* (painel com as diferentes combinações e as seqüências dos *primers* descrito na Tabela VIII)
- *Multiplex PCR Master Mix 2x* da Qiagen
- H<sub>2</sub>O bidestilada e estéril
- Formamida desionizada *grau u.p.* (M = 45,04 g/mol)
- ROX 500: *Gene Scan 500 Rox™ Size Std.* da Applied Biosystems

### Método:

1. Para cada conjunto de *primers* (denominados painéis M1, M2, M3 e M4) preparar as seguintes soluções: 3 µl do respectivo painel + 10 µl da *Multiplex PCR Master Mix* + 2 µl de H<sub>2</sub>O + 5 µl de gDNA obtido segundo protocolo descrito no anexo 1;
2. Homogeneizar as soluções e colocar os tubos no termociclador e correr o programa nas seguintes condições: 1) 15min a 95 °C; 2) 40 ciclos de – 30s a 94 °C; 90s a 57 °C; 90s a 72 °C; 3) 10min 72 °C; 4) 15 °C indefinidamente;
3. Para cada reacção de PCR em *multiplex*, adicionar 1 µl desse produto a 15 µl de formamida desionizada contendo 0,5 µl de padrão interno (ROX 500). As amostras ficam prontas para serem aplicadas no sequenciador automático.

Tabela VIII- Descrição dos primers existentes por marcador e sua distribuição por painéis

Nome Localização	Denominação	Sequência (5'→3')	Conc. (pmol/μl)	Fluorocromo
D18S59 p11.32	F	AGCTTCTATCCAACAGGGGC	3	HEX™
	R	ACCAGAATGTGAACGACCCCT		---
D13S153 q21.1	F	AGCATTGTTTCATGTTGGTG	5	6FAM™
	R	CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC		---
AmelX : p22.2 AmelY : p11.2	F	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	5	6FAM™
	R	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG		---
D13S742 q12.12	F	TCCAGCCTGGTCAACACAG	5	HEX™
	R	TCCAGACTTCCCAATTCAGG		---
D13S1265 q33.3	F	TACAGACCTCATAGGATTCTTT	5	6FAM™
	R	TTGTTTTCTGCTAATGTGTG		---
D21S1412 q22.2	F	CGGAGGTTGCAGTGAGTTG	5	6FAM™
	R	GGGAAGGCTATGGAGGAGA		---
XHPRT q26.2	F	ATGCCACAGATAATACACATCCCC	5	6FAM™
	R	CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGGTAT		---
D18S535 q12.3	F	TCATGTGACAAAAGCCACAC	5	NED™
	R	AGACAGAAATATAGATGAGAATGCA		---
D18S978 q12.3	F	TTCTTCAGTATCATCTTGTGCC	5	NED™
	R	GCCAAATGTAGATCTTGGGA		---
D13S305 q13.2	F	TTGAGGACCTGTCGTTACG	10	HEX™
	R	TTATAGAGCAGTTAAGGCACA		---
D21S1411 q22.3	F	ATGATGAATGCATAGATGGATG	10	HEX™
	R	AATGTGTGTCCTTCCAGGC		---
DXS1224 p22.2	F	CTTCAAGCCTACAAAATCTGG	3	VIC
	R	TGGGTGGCAACACTCACT		---
DXS7593 p22.11	F	GATCACACGATTGCACTCC	3	VIC
	R	AACGAATGGCTTACCCTCC		---
DXS8019 p22.13	F	TTCATTAAGCCGCTCTTTG	3	NED™
	R	GTTGAGTTTCCTCACAGC		---
DXS8067 q24	F	CAGGAGTCCAAGGCTGCT	3	NED™
	R	CACAGAGTGATACCCTGTCTCTAAA		---
DXS8088 q23	F	CTACTCCTGTTTTCCAGTACCAG	3	NED™
	R	ACAATTGAATTACACCATACACATA		---
DXS8009 q25	F	AGCCTTCGTCCTCTATATATTC	3	VIC
	R	GCAATTCAAAAGATTCTGATTAATT		---
SRY p11.31	F	GAATATTCCCGCTCTCCGGA	10	6FAM™
	R	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG		---
DYS385 q11.222	F	AGCATGGGTGACAGAGCTA	5	NED™
	R	TGGGATGCTAGGTAAAGCTG		---
D13S634 q21.31	F	TCCAGATAGGCAGATTCAAT	10	HEX™
	R	CCTTCTTCTCCATTGATA		---
D21S1414 Q21.1	F	GGCACCAGTAAAAAATFACT	5	6FAM™
	R	CTGTCTGTCTGTCTGTCTATC		---
D21S1412 q22.2	F	CGGAGGTTGCAGTGAGTTG	10	6FAM™
	R	GGGAAGGCTATGGAGGAGA		---
D21S1914 q21.2	F	CATTGGGCCTTCTGTCAAAT	5	VIC
	R	CTGAACCAGGGCATGT		---
D18S1371 q23	F	CTCTCTTCATCCACCATTGG	5	6FAM™
	R	GCTGTCAGAGACCTGTGTTG		---

Legenda:

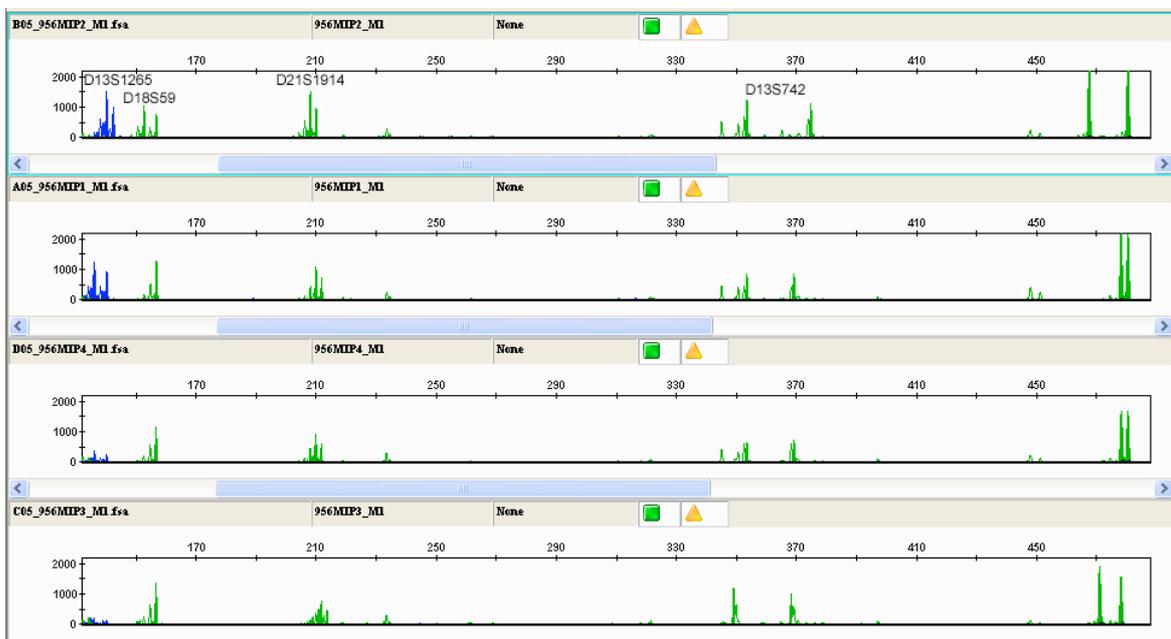
Painel M1 – amarelo

Painel M2 – rosa

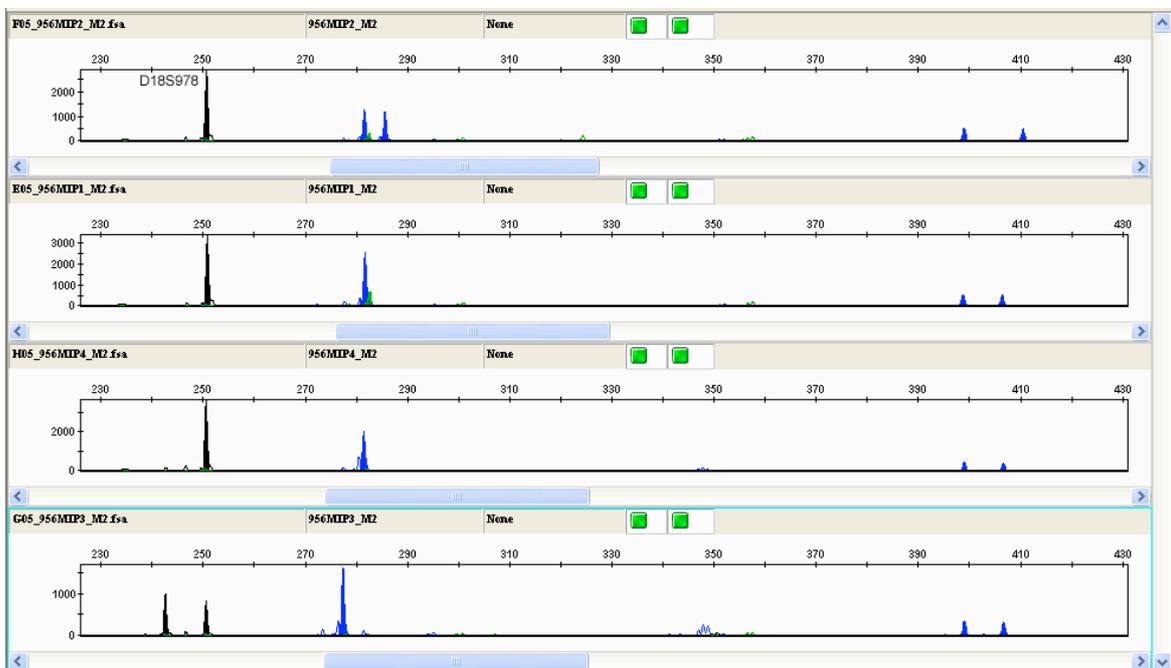
Painel M3 – azul

Painel M4 – branco

### Anexo 3 – Electroferograma representativo dos alelos obtidos para os diferentes marcadores numa família



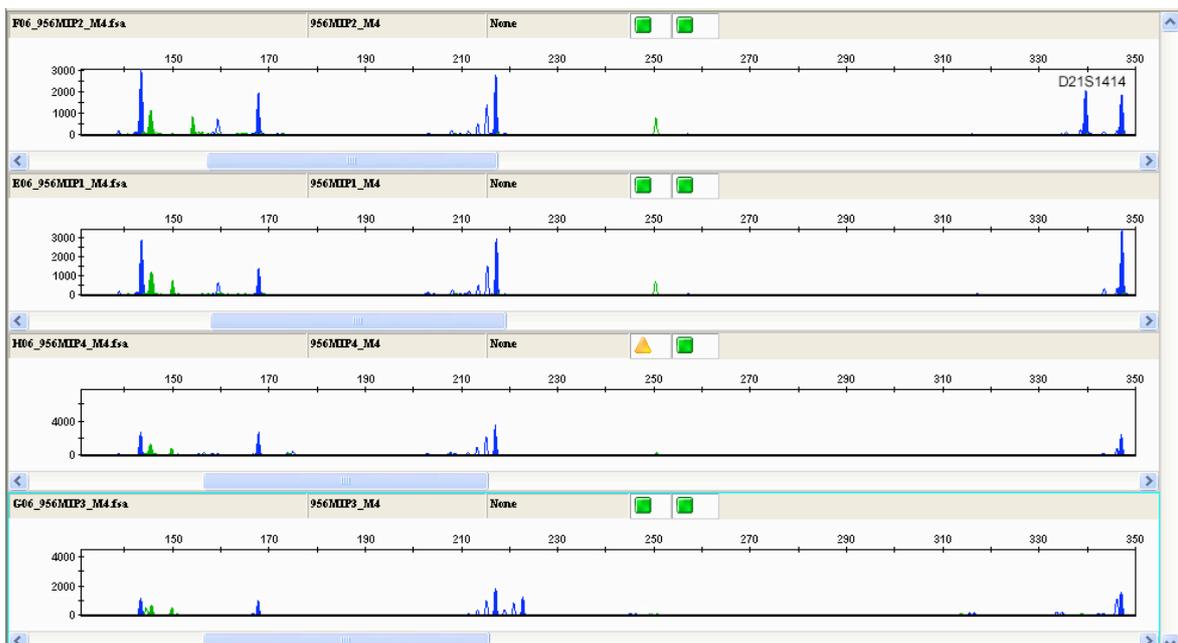
Electroferograma representativo do painel 1, obtido após análise de fragmentos recorrendo à aplicação GeneMapper



Electroferograma representativo do painel 2, obtido após análise de fragmentos recorrendo à aplicação GeneMapper



Electroferograma representativo do painel 3, obtido após análise de fragmentos recorrendo à aplicação GeneMapper



Electroferograma representativo do painel 4, obtido após análise de fragmentos recorrendo à aplicação GeneMapper

Legenda:

MIP1 – feto1

MIP2 – mãe

MIP3 – pai

MIP4 – feto2

#### Anexo 4 – Descrição das características observadas nos 8 marcadores analisados neste estudo

##### D13S742

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
339	0,0377	101
343	0,0283	102
345	0,0566	103
347	0,0094	104
349	0,1226	105
351	0,0472	106
353	0,1038	107
355	0,0849	108
357	0,0943	109
359	0,0283	110
361	0,0755	111
363	0,0094	112
365	0,1604	113
367	0,0094	114
369	0,0849	115
371	0,0094	116
373	0,0094	117
375	0,0283	118

##### D13S1265

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
278	0,0575	201
280	0,0230	202
282	0,1379	203
284	0,1034	204
286	0,3678	205
290	0,1149	206
292	0,0115	207
294	0,0230	208
296	0,0920	209
298	0,0230	210
300	0,0230	211
302	0,0115	212
304	0,0115	213

## D18S59

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
156	0,2889	301
158	0,1000	302
162	0,1556	303
164	0,1000	304
166	0,1889	305
168	0,1000	306
170	0,0222	307
172	0,0333	308
174	0,0111	309

## D18S978

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
239	0,0789	401
243	0,3684	402
247	0,3289	403
251	0,2105	404
255	0,0132	405

## D21S1414

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
339	0,0283	501
341	0,0094	502
343	0,1604	503
347	0,1604	504
351	0,2075	505
353	0,0377	506
355	0,0755	507
357	0,1415	508
361	0,1509	509
363	0,0283	510

## D21S1914

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
202	0,0278	601
204	0,0278	602
206	0,2870	603
208	0,1667	604
210	0,0833	605
212	0,1852	606
214	0,0741	607
216	0,1019	608
218	0,0278	609
220	0,0185	610

## DXS1224

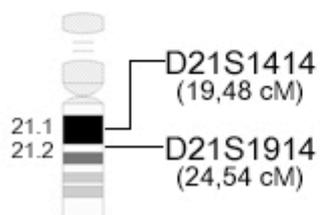
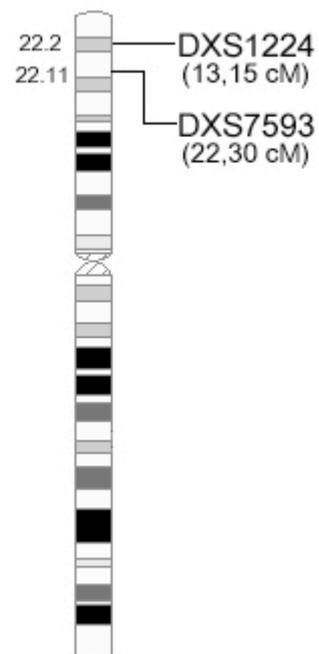
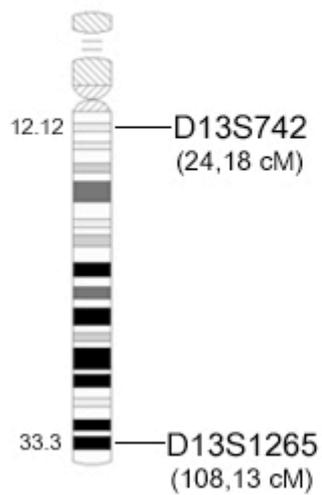
Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
160	0,0130	701
164	0,7273	702
170	0,1169	703
172	0,1039	704
174	0,0260	705
176	0,0130	706

## DXS7593

Tamanho dos alelos (pb)	Frequência	Identificação no programa <i>ECLIPSE2</i>
215	0,0541	801
217	0,0541	802
221	0,4189	803
223	0,1081	804
225	0,0135	805
227	0,0676	806
229	0,2703	807
231	0,0135	808

Nota: pb = pares de bases

**Anexo 5 – Localização citogenética e posição em cM de cada marcador no respectivo cromossoma**



## Anexo 6 – MapFile (dados introduzidos no programa *ECLIPSE2* referentes aos 8 marcadores utilizados)

Legenda:

Vermelho – identificação do cromossoma em que o marcador se encontra

Verde – posição em cM

Azul – nº de alelos do marcador

Rosa – nome de cada alelo

Preto – frequência de cada alelo

13 24.2 18	18 36.6 5
101 0.04	401 0.08
102 0.03	402 0.37
103 0.06	403 0.33
104 0.01	404 0.21
105 0.12	405 0.01
106 0.05	21 19.5 10
107 0.10	501 0.03
108 0.08	502 0.01
109 0.09	503 0.16
110 0.03	504 0.16
111 0.08	505 0.21
112 0.01	506 0.04
113 0.16	507 0.08
114 0.01	508 0.14
115 0.08	509 0.15
116 0.01	510 0.03
117 0.01	
118 0.03	21 24.5 10
13 108.1 13	601 0.03
201 0.06	602 0.03
202 0.02	603 0.29
203 0.14	604 0.17
204 0.10	605 0.08
205 0.37	606 0.19
206 0.11	607 0.07
207 0.01	608 0.10
208 0.02	609 0.03
209 0.09	610 0.02
210 0.02	X 13.2 6
211 0.02	701 0.01
212 0.01	702 0.73
213 0.01	703 0.12
	704 0.10
18 0.7 9	705 0.03
301 0.29	706 0.01
302 0.10	
303 0.16	X 22.3 8
304 0.10	801 0.05
305 0.19	802 0.05
306 0.10	803 0.42
307 0.02	804 0.11
308 0.03	805 0.01
309 0.01	806 0.07
	807 0.27
	808 0.01



## Anexo 7 – PedigreeFile (dados introduzidos no programa ECLIPSE2 referentes aos 9 fetos gemelares e respectivos pais)

Legenda:

Vermelho – identificação da família

Verde – identificação do individuo

Azul – identificação de pai e mãe (se não conhecidos colocar 0)

Rosa – sexo (1 = masculino; 2 = feminino; 0 = indeterminado)

Preto – alelos observados por marcador (colocar 0 na ausência de resultado)

- PedigreeFile apenas com dados referentes aos 9 fetos gemelares

```
f_715 a715 0 0 1 0 0 0 0 0 0 403 405 0 0 601 601 702 702 0 0
f_715 b715 0 0 1 0 0 0 0 0 0 403 405 0 0 601 601 702 702 0 0
f_720 a720 0 0 2 0 0 201 206 304 305 0 0 0 0 0 0 702 704 801 806
f_720 b720 0 0 2 0 0 201 206 304 305 0 0 0 0 0 0 702 704 801 806
f_736 a736 0 0 1 0 0 205 205 305 305 404 405 505 510 0 0 702 702 804 804
f_736 b736 0 0 1 0 0 205 205 305 305 404 405 505 510 0 0 702 702 804 804
f_757 a757 0 0 2 104 111 211 213 301 303 403 403 509 509 603 603 702 702 803 803
f_757 b757 0 0 2 104 111 211 213 301 303 403 403 509 509 603 603 702 702 803 803
f_780 a780 0 0 2 105 107 202 209 303 308 401 403 0 0 0 0 702 703 803 803
f_780 b780 0 0 2 105 107 202 209 303 308 401 403 0 0 0 0 702 703 803 803
f_819 a819 0 0 2 110 115 204 204 302 303 402 403 504 508 0 0 702 703 803 807
f_819 b819 0 0 2 110 115 204 204 302 303 402 403 504 508 0 0 702 703 803 807
f_827 a827 0 0 2 104 115 204 211 303 303 401 403 504 504 0 0 702 702 801 807
f_827 b827 0 0 2 104 115 204 211 303 303 401 403 504 504 0 0 702 702 801 807
f_849 a849 0 0 1 101 104 205 208 302 307 403 403 503 504 0 0 706 706 806 806
f_849 b849 0 0 1 101 104 205 208 302 307 403 403 503 504 0 0 706 706 806 806
f_859 a859 0 0 1 107 113 204 211 305 306 401 402 504 505 0 0 702 702 801 801
f_859 b859 0 0 1 107 113 204 211 305 306 401 402 504 505 0 0 702 702 801 801
```

- PedigreeFile com dados referentes aos 9 fetos gemelares e aos respectivos pais

```

f_715 pai1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 601 601 704 704 801 801
f_715 mae1 0 0 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 601 601 0 0 0 0
f_715 a715 pai1 mae1 1 0 0 0 0 0 0 0 403 405 0 0 601 601 702 702 0 0
f_715 b715 pai1 mae1 1 0 0 0 0 0 0 0 403 405 0 0 601 601 702 702 0 0
f_720 pai2 0 0 1 0 0 201 201 305 305 0 0 0 0 0 0 704 704 806 806
f_720 mae2 0 0 2 0 0 203 206 301 304 0 0 0 0 0 0 702 702 801 807
f_720 a720 pai2 mae2 2 0 0 201 206 304 305 0 0 0 0 0 0 702 704 801 806
f_720 b720 pai2 mae2 2 0 0 201 206 304 305 0 0 0 0 0 0 702 704 801 806
f_736 pai3 0 0 1 0 0 205 211 305 305 403 404 508 510 0 0 702 702 804 804
f_736 mae3 0 0 2 0 0 205 212 305 305 404 405 504 505 0 0 702 702 804 807
f_736 a736 pai3 mae3 1 0 0 205 205 305 305 404 405 505 510 0 0 702 702 804 804
f_736 b736 pai3 mae3 1 0 0 205 205 305 305 404 405 505 510 0 0 702 702 804 804
f_757 pai4 0 0 1 111 111 0 0 303 306 403 403 505 509 603 605 702 702 803 803
f_757 mae4 0 0 2 101 104 211 213 301 305 402 403 505 509 603 604 702 702 803 803
f_757 a757 pai4 mae4 2 104 111 211 213 301 303 403 403 509 509 603 603 702 702 803 803
f_757 b757 pai4 mae4 2 104 111 211 213 301 303 403 403 509 509 603 603 702 702 803 803
f_780 pai5 0 0 1 105 112 209 209 301 303 401 404 0 0 0 0 703 703 803 803
f_780 mae5 0 0 2 107 107 202 209 308 308 403 403 0 0 0 0 702 703 803 807
f_780 a780 pai5 mae5 2 105 107 202 209 303 308 401 403 0 0 0 0 702 703 803 803
f_780 b780 pai5 mae5 2 105 107 202 209 303 308 401 403 0 0 0 0 702 703 803 803
f_819 pai6 0 0 1 107 110 202 204 302 304 401 403 505 508 0 0 703 703 807 807
f_819 mae6 0 0 2 115 115 204 204 303 305 402 403 504 505 0 0 702 702 803 808
f_819 a819 pai6 mae6 2 110 115 204 204 302 303 402 403 504 508 0 0 702 703 803 807
f_819 b819 pai6 mae6 2 110 115 204 204 302 303 402 403 504 508 0 0 702 703 803 807
f_827 pai7 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
f_827 mae7 0 0 2 104 116 205 211 303 303 401 402 503 504 0 0 702 705 801 803
f_827 a827 pai7 mae7 2 104 115 204 211 303 303 401 403 504 504 0 0 702 702 801 807
f_827 b827 pai7 mae7 2 104 115 204 211 303 303 401 403 504 504 0 0 702 702 801 807
f_849 pai8 0 0 1 101 101 205 211 302 302 0 0 504 509 0 0 703 703 805 805
f_849 mae8 0 0 2 104 106 208 212 302 307 401 403 503 509 0 0 705 706 802 806
f_849 a849 pai8 mae8 1 101 104 205 208 302 307 403 403 503 504 0 0 706 706 806 806
f_849 b849 pai8 mae8 1 101 104 205 208 302 307 403 403 503 504 0 0 706 706 806 806
f_859 pai9 0 0 1 107 111 204 210 305 305 0 0 0 0 0 0 704 704 807 807
f_859 mae9 0 0 2 106 113 201 211 305 306 401 402 504 505 0 0 702 702 801 803
f_859 a859 pai9 mae9 1 107 113 204 211 305 306 401 402 504 505 0 0 702 702 801 801
f_859 b859 pai9 mae9 1 107 113 204 211 305 306 401 402 504 505 0 0 702 702 801 801

```

## Anexo 8 – ErrorFile

0 0.001 0.01 0.05

## Anexo 9 – Folhas de resultados obtidas recorrendo ao programa *ECLIPSE2*

- Estabelecimento de relações de parentesco e cálculo da probabilidade média de MZ/DZ introduzindo apenas dados referentes aos 9 fetos gemelares

f_715 a715 : f_715 b715										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-6.27542	-8.09132	-10.4524	-5.22621	-7.51864	-8.09132	-8.09132	-8.63749	11.1997	
0.001	-6.27685	-8.09041	-10.4401	-5.22795	-7.51816	-8.09041	-8.09041	-8.6358	11.1918	
0.01	-6.28956	-8.08167	-10.3343	-5.24357	-7.51352	-8.08167	-8.08167	-8.61981	11.1172	
0.05	-6.34267	-8.03245	-9.94703	-5.31256	-7.48595	-8.03245	-8.03245	-8.53468	10.7178	

f_720 a720 : f_720 b720										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-4.30751	-5.64714	-6.59928	-3.29964	-5.20886	-5.64714	-5.64714	-5.99494	10.1827	
0.001	-4.30907	-5.64796	-6.59946	-3.30138	-5.2098	-5.64796	-5.64796	-5.9956	10.1787	
0.01	-4.32322	-5.65532	-6.60105	-3.3171	-5.21833	-5.65532	-5.65532	-6.00154	10.1421	
0.05	-4.38737	-5.68827	-6.60812	-3.38862	-5.25663	-5.68827	-5.68827	-6.02799	9.97123	

f_736 a736 : f_736 b736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-8.27323	-10.4865	-13.1649	-6.58247	-9.61494	-10.4307	-10.5012	-11.2495	49.0636	
0.001	-8.27637	-10.4878	-13.155	-6.58594	-9.61673	-10.4321	-10.5025	-11.2501	49.0255	
0.01	-8.30458	-10.4994	-13.0704	-6.61729	-9.63244	-10.4446	-10.5139	-11.2547	48.6726	
0.05	-8.4292	-10.5408	-12.7763	-6.75815	-9.6947	-10.4904	-10.5541	-11.262	46.8865	

f_757 a757 : f_757 b757										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-13.3593	-17.7491	-21.8245	-10.9123	-16.5738	-17.6636	-17.7649	-18.8085	279.898	
0.001	-13.3642	-17.7503	-21.82	-10.9175	-16.5752	-17.6648	-17.7661	-18.8092	279.688	
0.01	-13.4083	-17.7609	-21.7808	-10.9646	-16.5881	-17.6759	-17.7766	-18.8163	277.78	
0.05	-13.6084	-17.8105	-21.6291	-11.179	-16.6483	-17.7277	-17.8258	-18.8495	268.817	

f_780 a780 : f_780 b780										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-9.25577	-12.1813	-14.7172	-7.35858	-11.2873	-12.1018	-12.1963	-12.9673	78.9205	
0.001	-9.25892	-12.1824	-14.7146	-7.36206	-11.2888	-12.103	-12.1974	-12.9679	78.8603	
0.01	-9.2873	-12.1926	-14.6919	-7.39347	-11.3023	-12.114	-12.2074	-12.9732	78.3123	
0.05	-9.41541	-12.2363	-14.5946	-7.5361	-11.3611	-12.1615	-12.2502	-12.9948	75.7361	

f_819 a819 : f_819 b819										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-10.0444	-13.1673	-15.5492	-7.77459	-12.2001	-13.114	-13.1743	-13.9652	186.146	
0.001	-10.0484	-13.1696	-15.55	-7.77893	-12.2026	-13.1163	-13.1766	-13.9672	185.972	
0.01	-10.084	-13.1902	-15.5577	-7.81822	-12.2253	-13.1371	-13.1971	-13.9852	184.404	
0.05	-10.2455	-13.2824	-15.5924	-7.99703	-12.327	-13.2305	-13.2892	-14.0657	177.206	

f_827 a827 : f_827 b827										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-12.0369	-15.6826	-19.3094	-9.65471	-14.5033	-15.5931	-15.6979	-16.7353	241.092	
0.001	-12.0408	-15.6844	-19.3063	-9.65905	-14.5055	-15.5949	-15.6996	-16.7365	240.875	
0.01	-12.0766	-15.7	-19.2789	-9.69833	-14.5244	-15.6113	-15.7151	-16.747	238.904	
0.05	-12.238	-15.7682	-19.1629	-9.87679	-14.6082	-15.6831	-15.7826	-16.7921	229.712	

f_849 a849 : f_849 b849										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-11.8763	-15.5214	-19.1566	-9.57829	-14.3895	-15.4313	-15.537	-16.5303	198.602	
0.001	-11.8803	-15.5228	-19.1519	-9.58264	-14.3912	-15.4328	-15.5383	-16.531	198.434	
0.01	-11.9162	-15.5347	-19.1103	-9.62191	-14.4066	-15.4454	-15.5501	-16.5377	196.906	
0.05	-12.0785	-15.5863	-18.937	-9.80036	-14.4738	-15.5002	-15.6011	-16.5647	189.735	

f_859 a859 : f_859 b859										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR (MZ/DZ)	
0	-9.99313	-13.0431	-15.4266	-7.71332	-12.0405	-12.9772	-13.0548	-13.8626	190.467	
0.001	-9.99706	-13.0452	-15.426	-7.71766	-12.0429	-12.9793	-13.0568	-13.8641	190.281	
0.01	-10.0325	-13.0636	-15.4201	-7.75694	-12.0649	-12.9984	-13.0751	-13.878	188.595	
0.05	-10.1926	-13.1456	-15.3962	-7.93548	-12.1627	-13.0832	-13.1565	-13.9392	180.785	

- Estabelecimento de relações de parentesco e cálculo da probabilidade média de MZ/DZ introduzindo dados referentes aos 9 fetos gemelares e aos respectivos pais

```
f_715 pai1 : f_715 mael
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -3.62214 -4.85683 -6.09151 -3.04576 -4.56864 -4.85683 -4.85683 -5.13327 3.77038
0.001 -3.62292 -4.85608 -6.08923 -3.04663 -4.56793 -4.85608 -4.85608 -5.13243 3.76959
0.01 -3.62993 -4.84932 -6.06897 -3.05448 -4.56158 -4.84932 -4.84932 -5.12492 3.76228
0.05 -3.66142 -4.81975 -5.98422 -3.09007 -4.53385 -4.81975 -4.81975 -5.09202 3.72696
```

```
f_715 pai1 : f_715 a715
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -3.62214 -4.85683 -6.09151 -3.04576 -4.56864 -4.85683 -4.85683 -5.13327 3.77038
0.001 -3.62292 -4.85608 -6.08923 -3.04663 -4.56793 -4.85608 -4.85608 -5.13243 3.76959
0.01 -3.62993 -4.84932 -6.06897 -3.05448 -4.56158 -4.84932 -4.84932 -5.12492 3.76228
0.05 -3.66142 -4.81975 -5.98422 -3.09007 -4.53385 -4.81975 -4.81975 -5.09202 3.72696
```

```
f_715 pai1 : f_715 b715
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -3.62214 -4.85683 -6.09151 -3.04576 -4.56864 -4.85683 -4.85683 -5.13327 3.77038
0.001 -3.62292 -4.85608 -6.08923 -3.04663 -4.56793 -4.85608 -4.85608 -5.13243 3.76959
0.01 -3.62993 -4.84932 -6.06897 -3.05448 -4.56158 -4.84932 -4.84932 -5.12492 3.76228
0.05 -3.66142 -4.81975 -5.98422 -3.09007 -4.53385 -4.81975 -4.81975 -5.09202 3.72696
```

```
f_715 mael : f_715 a715
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -3.62214 -4.85683 -6.09151 -3.04576 -4.56864 -4.85683 -4.85683 -5.13327 3.77038
0.001 -3.62292 -4.85608 -6.08923 -3.04663 -4.56793 -4.85608 -4.85608 -5.13243 3.76959
0.01 -3.62993 -4.84932 -6.06897 -3.05448 -4.56158 -4.84932 -4.84932 -5.12492 3.76228
0.05 -3.66142 -4.81975 -5.98422 -3.09007 -4.53385 -4.81975 -4.81975 -5.09202 3.72696
```

```
f_715 mael : f_715 b715
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -3.62214 -4.85683 -6.09151 -3.04576 -4.56864 -4.85683 -4.85683 -5.13327 3.77038
0.001 -3.62292 -4.85608 -6.08923 -3.04663 -4.56793 -4.85608 -4.85608 -5.13243 3.76959
0.01 -3.62993 -4.84932 -6.06897 -3.05448 -4.56158 -4.84932 -4.84932 -5.12492 3.76228
0.05 -3.66142 -4.81975 -5.98422 -3.09007 -4.53385 -4.81975 -4.81975 -5.09202 3.72696
```

```
f_715 a715 : f_715 b715
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -6.27542 -8.09132 -10.4524 -5.22621 -7.51864 -8.09132 -8.09132 -8.63749 11.1997
0.001 -6.27685 -8.09041 -10.4401 -5.22795 -7.51816 -8.09041 -8.09041 -8.6358 11.1918
0.01 -6.28956 -8.08167 -10.3343 -5.24357 -7.51352 -8.08167 -8.08167 -8.61981 11.1172
0.05 -6.34267 -8.03245 -9.94703 -5.31256 -7.48595 -8.03245 -8.03245 -8.53468 10.7178
```

```
f_720 pai2 : f_720 mae2
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -7.83833 -7.23627 -6.63421 -infinity -infinity -7.23627 -7.23627 -6.88409 -infinity
0.001 -7.83717 -7.23589 -6.6346 -19.5207 -12.7461 -7.23589 -7.23589 -6.88422 2.07243e-12
0.01 -7.82687 -7.23247 -6.63811 -15.5207 -10.75 -7.23247 -7.23247 -6.88541 2.02385e-08
0.05 -7.78351 -7.2183 -6.65393 -12.7248 -9.36941 -7.2183 -7.2183 -6.89106 1.14473e-05
```

```
f_720 pai2 : f_720 a720
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -6.346 -6.25776 -7.18583 -infinity -5.8448 -6.25776 -6.25776 -6.58496 -infinity
0.001 -6.34601 -6.25851 -7.186 -11.2332 -5.84565 -6.25851 -6.25851 -6.58559 1.29651e-05
0.01 -6.34613 -6.26529 -7.18754 -9.23971 -5.85332 -6.26529 -6.26529 -6.59126 0.00127768
0.05 -6.34754 -6.29569 -7.19452 -7.87113 -5.88781 -6.29569 -6.29569 -6.61663 0.0299507
```

```
f_720 pai2 : f_720 b720
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
0 -6.346 -6.25776 -7.18583 -infinity -5.8448 -6.25776 -6.25776 -6.58496 -infinity
0.001 -6.34601 -6.25851 -7.186 -11.2332 -5.84565 -6.25851 -6.25851 -6.58559 1.29651e-05
0.01 -6.34613 -6.26529 -7.18754 -9.23971 -5.85332 -6.26529 -6.26529 -6.59126 0.00127768
0.05 -6.34754 -6.29569 -7.19452 -7.87113 -5.88781 -6.29569 -6.29569 -6.61663 0.0299507
```

```
f_720 mae2 : f_720 a720
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR (MZ/DZ)
```

0	-5.7297	-5.59075	-6.04766	-infinity	-5.29318	-5.59075	-5.59075	-5.78939	-infinity	
0.001	-5.72999	-5.59152	-6.04806	-10.9593	-5.29411	-5.59152	-5.59152	-5.79002	5.89748e-06	
0.01	-5.73266	-5.59854	-6.05161	-8.96579	-5.30256	-5.59854	-5.59854	-5.79576	0.000584625	
0.05	-5.74517	-5.63002	-6.06753	-7.59717	-5.34059	-5.63002	-5.63002	-5.82146	0.0140604	
f_720 mae2 : f_720 b720										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-5.7297	-5.59075	-6.04766	-infinity	-5.29318	-5.59075	-5.59075	-5.78939	-infinity	
0.001	-5.72999	-5.59152	-6.04806	-10.9593	-5.29411	-5.59152	-5.59152	-5.79002	5.89748e-06	
0.01	-5.73266	-5.59854	-6.05161	-8.96579	-5.30256	-5.59854	-5.59854	-5.79576	0.000584625	
0.05	-5.74517	-5.63002	-6.06753	-7.59717	-5.34059	-5.63002	-5.63002	-5.82146	0.0140604	
f_720 a720 : f_720 b720										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-4.30751	-5.64714	-6.59928	-3.29964	-5.20886	-5.64714	-5.64714	-5.99494	10.1827	
0.001	-4.30907	-5.64796	-6.59946	-3.30138	-5.2098	-5.64796	-5.64796	-5.9956	10.1787	
0.01	-4.32322	-5.65532	-6.60105	-3.3171	-5.21833	-5.65532	-5.65532	-6.00154	10.1421	
0.05	-4.38737	-5.68827	-6.60812	-3.38862	-5.25663	-5.68827	-5.68827	-6.02799	9.97123	
f_736 pai3 : f_736 mae3										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-13.292	-13.1654	-13.3288	-infinity	-infinity	-13.1591	-13.1669	-13.1501	-infinity	
0.001	-13.2744	-13.1562	-13.3221	-21.6364	-15.5367	-13.1497	-13.1578	-13.1423	4.34556e-09	
0.01	-13.1319	-13.0782	-13.2647	-17.6436	-14.4528	-13.0705	-13.0801	-13.0756	3.07827e-05	
0.05	-12.6942	-12.8027	-13.0544	-14.8814	-13.4718	-12.792	-12.8053	-12.8371	0.00649857	
f_736 pai3 : f_736 a736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-11.3075	-11.508	-12.7887	-infinity	-10.9401	-11.5017	-11.5096	-11.9594	-infinity	
0.001	-11.2951	-11.5025	-12.783	-17.0457	-10.9339	-11.4961	-11.5041	-11.9543	1.77589e-06	
0.01	-11.198	-11.4569	-12.735	-14.0628	-10.8832	-11.4492	-11.4588	-11.911	0.00136534	
0.05	-10.933	-11.3144	-12.5635	-12.0434	-10.7304	-11.3037	-11.317	-11.77	0.0775565	
f_736 pai3 : f_736 b736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-11.3075	-11.508	-12.7887	-infinity	-10.9401	-11.5017	-11.5096	-11.9594	-infinity	
0.001	-11.2951	-11.5025	-12.783	-17.0457	-10.9339	-11.4961	-11.5041	-11.9543	1.77589e-06	
0.01	-11.198	-11.4569	-12.735	-14.0628	-10.8832	-11.4492	-11.4588	-11.911	0.00136534	
0.05	-10.933	-11.3144	-12.5635	-12.0434	-10.7304	-11.3037	-11.317	-11.77	0.0775565	
f_736 mae3 : f_736 a736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-10.8503	-11.9055	-13.7051	-infinity	-11.3592	-11.8497	-11.9202	-12.3826	-infinity	
0.001	-10.848	-11.904	-13.6941	-14.1062	-11.3577	-11.8483	-11.9187	-12.3808	0.000551861	
0.01	-10.828	-11.8904	-13.6001	-12.1282	-11.3435	-11.8356	-11.9049	-12.3642	0.0501039	
0.05	-10.7593	-11.8268	-13.2671	-10.8286	-11.2819	-11.7763	-11.84	-12.2831	0.852451	
f_736 mae3 : f_736 b736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-10.8503	-11.9055	-13.7051	-infinity	-11.3592	-11.8497	-11.9202	-12.3826	-infinity	
0.001	-10.848	-11.904	-13.6941	-14.1062	-11.3577	-11.8483	-11.9187	-12.3808	0.000551861	
0.01	-10.828	-11.8904	-13.6001	-12.1282	-11.3435	-11.8356	-11.9049	-12.3642	0.0501039	
0.05	-10.7593	-11.8268	-13.2671	-10.8286	-11.2819	-11.7763	-11.84	-12.2831	0.852451	
f_736 a736 : f_736 b736										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-8.27323	-10.4865	-13.1649	-6.58247	-9.61494	-10.4307	-10.5012	-11.2495	49.0636	
0.001	-8.27637	-10.4878	-13.155	-6.58594	-9.61673	-10.4321	-10.5025	-11.2501	49.0255	
0.01	-8.30458	-10.4994	-13.0704	-6.61729	-9.63244	-10.4446	-10.5139	-11.2547	48.6726	
0.05	-8.4292	-10.5408	-12.7763	-6.75815	-9.6947	-10.4904	-10.5541	-11.262	46.8865	
f_757 pai4 : f_757 mae4										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-14.9254	-14.3424	-14.0595	-infinity	-infinity	-14.3678	-14.3362	-14.1263	-infinity	
0.001	-14.9221	-14.3417	-14.0601	-30.7055	-19.2536	-14.367	-14.3354	-14.1264	1.64664e-16	
0.01	-14.8936	-14.3354	-14.0648	-24.72	-17.2684	-14.3602	-14.3293	-14.1277	1.4912e-10	
0.05	-14.7885	-14.3168	-14.0893	-20.5924	-15.9375	-14.3393	-14.3112	-14.1384	1.57079e-06	
f_757 pai4 : f_757 a757										
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)	
0	-13.1298	-13.1995	-14.7001	-infinity	-12.4695	-13.1832	-13.2045	-13.7667	-infinity	
0.001	-13.1294	-13.2007	-14.7007	-22.5918	-12.4709	-13.1844	-13.2057	-13.7678	3.44826e-10	
0.01	-13.1266	-13.212	-14.7066	-18.6128	-12.4836	-13.1958	-13.217	-13.7775	3.26383e-06	
0.05	-13.1248	-13.2654	-14.7354	-15.9125	-12.5433	-13.2497	-13.2703	-13.8239	0.00163039	

```

f_757 pai4 : f_757 b757
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -13.1298 -13.1995 -14.7001 -infinity -12.4695 -13.1832 -13.2045 -13.7667 -infinity
0.001 -13.1294 -13.2007 -14.7007 -22.5918 -12.4709 -13.1844 -13.2057 -13.7678 3.44826e-10
0.01 -13.1266 -13.212 -14.7066 -18.6128 -12.4836 -13.1958 -13.217 -13.7775 3.26383e-06
0.05 -13.1248 -13.2654 -14.7354 -15.9125 -12.5433 -13.2497 -13.2703 -13.8239 0.00163039

f_757 mae4 : f_757 a757
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -16.9631 -18.1875 -21.184 -infinity -17.3366 -18.1317 -18.1945 -18.9525 -infinity
0.001 -16.9655 -18.1883 -21.1793 -29.738 -17.3376 -18.1326 -18.1954 -18.953 1.68858e-13
0.01 -16.9866 -18.196 -21.139 -24.7627 -17.3471 -18.1406 -18.203 -18.9575 1.67453e-08
0.05 -17.0815 -18.2326 -20.983 -21.38 -17.3923 -18.1788 -18.2394 -18.9793 5.02922e-05

f_757 mae4 : f_757 b757
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -16.9631 -18.1875 -21.184 -infinity -17.3366 -18.1317 -18.1945 -18.9525 -infinity
0.001 -16.9655 -18.1883 -21.1793 -29.738 -17.3376 -18.1326 -18.1954 -18.953 1.68858e-13
0.01 -16.9866 -18.196 -21.139 -24.7627 -17.3471 -18.1406 -18.203 -18.9575 1.67453e-08
0.05 -17.0815 -18.2326 -20.983 -21.38 -17.3923 -18.1788 -18.2394 -18.9793 5.02922e-05

f_757 a757 : f_757 b757
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -13.3593 -17.7491 -21.8245 -10.9123 -16.5738 -17.6636 -17.7649 -18.8085 279.898
0.001 -13.3642 -17.7503 -21.82 -10.9175 -16.5752 -17.6648 -17.7661 -18.8092 279.688
0.01 -13.4083 -17.7609 -21.7808 -10.9646 -16.5881 -17.6759 -17.7766 -18.8163 277.78
0.05 -13.6084 -17.8105 -21.6291 -11.179 -16.6483 -17.7277 -17.8258 -18.8495 268.817

f_780 pai5 : f_780 mae5
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -16.8075 -15.9753 -15.6698 -infinity -infinity -15.9452 -15.9929 -15.6955 -infinity
0.001 -16.8006 -15.9711 -15.6673 -35.2329 -23.1081 -15.9412 -15.9886 -15.6925 3.69524e-19
0.01 -16.7398 -15.9341 -15.6449 -28.2356 -20.1097 -15.9062 -15.9505 -15.6652 3.19332e-12
0.05 -16.4969 -15.7834 -15.552 -23.3547 -18.021 -15.7632 -15.7961 -15.5531 1.38742e-07

f_780 pai5 : f_780 a780
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -13.6955 -13.4352 -14.576 -infinity -12.8238 -13.4077 -13.4396 -13.8874 -infinity
0.001 -13.6911 -13.4338 -14.5737 -22.3551 -12.8226 -13.4063 -13.4382 -13.8857 2.16799e-09
0.01 -13.6524 -13.4212 -14.5533 -18.3664 -12.8119 -13.3939 -13.4256 -13.871 1.93161e-05
0.05 -13.4977 -13.3694 -14.4668 -15.622 -12.7688 -13.3426 -13.3737 -13.809 0.00751055

f_780 pai5 : f_780 b780
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -13.6955 -13.4352 -14.576 -infinity -12.8238 -13.4077 -13.4396 -13.8874 -infinity
0.001 -13.6911 -13.4338 -14.5737 -22.3551 -12.8226 -13.4063 -13.4382 -13.8857 2.16799e-09
0.01 -13.6524 -13.4212 -14.5533 -18.3664 -12.8119 -13.3939 -13.4256 -13.871 1.93161e-05
0.05 -13.4977 -13.3694 -14.4668 -15.622 -12.7688 -13.3426 -13.3737 -13.809 0.00751055

f_780 mae5 : f_780 a780
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -12.5362 -13.3505 -15.811 -infinity -12.5257 -13.2958 -13.3587 -14.0765 -infinity
0.001 -12.5356 -13.3509 -15.8082 -18.9516 -12.5262 -13.2962 -13.359 -14.0765 3.83698e-07
0.01 -12.5303 -13.354 -15.7835 -15.9691 -12.5311 -13.2995 -13.3621 -14.0767 0.000364115
0.05 -12.5123 -13.3686 -15.6798 -13.9515 -12.5537 -13.3151 -13.3766 -14.0776 0.0363765

f_780 mae5 : f_780 b780
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -12.5362 -13.3505 -15.811 -infinity -12.5257 -13.2958 -13.3587 -14.0765 -infinity
0.001 -12.5356 -13.3509 -15.8082 -18.9516 -12.5262 -13.2962 -13.359 -14.0765 3.83698e-07
0.01 -12.5303 -13.354 -15.7835 -15.9691 -12.5311 -13.2995 -13.3621 -14.0767 0.000364115
0.05 -12.5123 -13.3686 -15.6798 -13.9515 -12.5537 -13.3151 -13.3766 -14.0776 0.0363765

f_780 a780 : f_780 b780
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -9.25577 -12.1813 -14.7172 -7.35858 -11.2873 -12.1018 -12.1963 -12.9673 78.9205
0.001 -9.25892 -12.1824 -14.7146 -7.36206 -11.2888 -12.103 -12.1974 -12.9679 78.8603
0.01 -9.2873 -12.1926 -14.6919 -7.39347 -11.3023 -12.114 -12.2074 -12.9732 78.3123
0.05 -9.41541 -12.2363 -14.5946 -7.5361 -11.3611 -12.1615 -12.2502 -12.9948 75.7361

f_819 pai6 : f_819 mae6
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -16.9876 -16.1593 -16.0215 -infinity -infinity -16.1926 -16.1587 -15.977 -infinity

```

0.001	-16.9846	-16.1585	-16.0216	-35.5932	-21.372	-16.1917	-16.1579	-15.9768	2.4624e-19
0.01	-16.9582	-16.1515	-16.0219	-28.602	-19.3719	-16.1844	-16.1508	-15.9751	2.27072e-12
0.05	-16.849	-16.123	-16.0248	-23.7491	-17.9765	-16.1543	-16.1219	-15.9691	1.25868e-07
f_819 pai6 : f_819 a819									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-15.4671	-15.1227	-16.6013	-infinity	-14.4524	-15.0966	-15.1243	-15.6545	-infinity
0.001	-15.4656	-15.1233	-16.6009	-27.6581	-14.453	-15.0971	-15.1249	-15.655	6.41905e-13
0.01	-15.4525	-15.1288	-16.5972	-22.6732	-14.4591	-15.1026	-15.1304	-15.6587	6.01522e-08
0.05	-15.4016	-15.1552	-16.5818	-19.247	-14.4889	-15.1288	-15.157	-15.6768	0.000142763
f_819 pai6 : f_819 b819									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-15.4671	-15.1227	-16.6013	-infinity	-14.4524	-15.0966	-15.1243	-15.6545	-infinity
0.001	-15.4656	-15.1233	-16.6009	-27.6581	-14.453	-15.0971	-15.1249	-15.655	6.41905e-13
0.01	-15.4525	-15.1288	-16.5972	-22.6732	-14.4591	-15.1026	-15.1304	-15.6587	6.01522e-08
0.05	-15.4016	-15.1552	-16.5818	-19.247	-14.4889	-15.1288	-15.157	-15.6768	0.000142763
f_819 mae6 : f_819 a819									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-12.6605	-13.3564	-14.9694	-infinity	-12.6295	-13.3155	-13.361	-13.9218	-infinity
0.001	-12.6618	-13.3584	-14.9707	-19.3436	-12.6317	-13.3175	-13.363	-13.9237	2.08067e-07
0.01	-12.6738	-13.3764	-14.9825	-16.3687	-12.6514	-13.3357	-13.381	-13.9402	0.000201867
0.05	-12.7301	-13.4577	-15.0354	-14.3859	-12.74	-13.4177	-13.4622	-14.0144	0.022093
f_819 mae6 : f_819 b819									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-12.6605	-13.3564	-14.9694	-infinity	-12.6295	-13.3155	-13.361	-13.9218	-infinity
0.001	-12.6618	-13.3584	-14.9707	-19.3436	-12.6317	-13.3175	-13.363	-13.9237	2.08067e-07
0.01	-12.6738	-13.3764	-14.9825	-16.3687	-12.6514	-13.3357	-13.381	-13.9402	0.000201867
0.05	-12.7301	-13.4577	-15.0354	-14.3859	-12.74	-13.4177	-13.4622	-14.0144	0.022093
f_819 a819 : f_819 b819									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-10.0444	-13.1673	-15.5492	-7.77459	-12.2001	-13.114	-13.1743	-13.9652	186.146
0.001	-10.0484	-13.1696	-15.55	-7.77893	-12.2026	-13.1163	-13.1766	-13.9672	185.972
0.01	-10.084	-13.1902	-15.5577	-7.81822	-12.2253	-13.1371	-13.1971	-13.9852	184.404
0.05	-10.2455	-13.2824	-15.5924	-7.99703	-12.327	-13.2305	-13.2892	-14.0657	177.206
f_827 mae7 : f_827 a827									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-15.7705	-16.1136	-19.2936	-infinity	-15.0132	-16.0301	-16.1275	-17.0691	-infinity
0.001	-15.7699	-16.1148	-19.2895	-25.075	-15.0148	-16.0315	-16.1286	-17.0696	4.95309e-10
0.01	-15.7647	-16.1257	-19.2537	-21.0947	-15.0302	-16.0433	-16.1393	-17.0742	4.6781e-06
0.05	-15.7522	-16.1753	-19.1065	-18.3879	-15.1006	-16.0976	-16.1881	-17.0952	0.00231353
f_827 mae7 : f_827 b827									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-15.7705	-16.1136	-19.2936	-infinity	-15.0132	-16.0301	-16.1275	-17.0691	-infinity
0.001	-15.7699	-16.1148	-19.2895	-25.075	-15.0148	-16.0315	-16.1286	-17.0696	4.95309e-10
0.01	-15.7647	-16.1257	-19.2537	-21.0947	-15.0302	-16.0433	-16.1393	-17.0742	4.6781e-06
0.05	-15.7522	-16.1753	-19.1065	-18.3879	-15.1006	-16.0976	-16.1881	-17.0952	0.00231353
f_827 a827 : f_827 b827									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-12.0369	-15.6826	-19.3094	-9.65471	-14.5033	-15.5931	-15.6979	-16.7353	241.092
0.001	-12.0408	-15.6844	-19.3063	-9.65905	-14.5055	-15.5949	-15.6996	-16.7365	240.875
0.01	-12.0766	-15.7	-19.2789	-9.69833	-14.5244	-15.6113	-15.7151	-16.747	238.904
0.05	-12.238	-15.7682	-19.1629	-9.87679	-14.6082	-15.6831	-15.7826	-16.7921	229.712
f_849 pai8 : f_849 mae8									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-18.7593	-18.0441	-18.059	-infinity	-infinity	-17.9847	-18.0501	-17.9381	-infinity
0.001	-18.7478	-18.037	-18.0543	-32.8704	-22.1135	-17.9783	-18.0429	-17.9326	7.53994e-15
0.01	-18.6487	-17.975	-18.0122	-26.8758	-20.103	-17.9222	-17.9803	-17.8847	5.92838e-09
0.05	-18.2783	-17.7346	-17.84	-22.7062	-18.662	-17.6994	-17.738	-17.6924	3.73353e-05
f_849 pai8 : f_849 a849									
error	P(full)	half	unrel	MZ	P-O	GP-GC	avunc	FC	LR(MZ/DZ)
0	-15.5243	-15.225	-16.5597	-infinity	-14.7403	-15.2361	-15.224	-15.6517	-infinity
0.001	-15.5171	-15.2222	-16.5566	-23.9216	-14.7368	-15.2332	-15.2212	-15.649	3.93974e-09
0.01	-15.4545	-15.1974	-16.5291	-19.9273	-14.7067	-15.2076	-15.1965	-15.6254	3.36693e-05
0.05	-15.2105	-15.0945	-16.4134	-17.157	-14.5844	-15.1018	-15.0938	-15.5263	0.0113114

```

f_849 pai8 : f_849 b849
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -15.5243 -15.225 -16.5597 -infinity -14.7403 -15.2361 -15.224 -15.6517 -infinity
0.001 -15.5171 -15.2222 -16.5566 -23.9216 -14.7368 -15.2332 -15.2212 -15.649 3.93974e-09
0.01 -15.4545 -15.1974 -16.5291 -19.9273 -14.7067 -15.2076 -15.1965 -15.6254 3.36693e-05
0.05 -15.2105 -15.0945 -16.4134 -17.157 -14.5844 -15.1018 -15.0938 -15.5263 0.0113114

f_849 mae8 : f_849 a849
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -17.2471 -17.8869 -20.9703 -infinity -16.9251 -17.8209 -17.8962 -18.7389 -infinity
0.001 -17.2436 -17.8861 -20.9634 -25.6043 -16.9246 -17.8201 -17.8954 -18.7375 4.35864e-09
0.01 -17.2139 -17.8788 -20.9026 -21.6246 -16.9206 -17.8133 -17.8881 -18.725 3.884e-05
0.05 -17.1057 -17.8495 -20.6525 -18.921 -16.9062 -17.7862 -17.8584 -18.6717 0.0153016

f_849 mae8 : f_849 b849
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -17.2471 -17.8869 -20.9703 -infinity -16.9251 -17.8209 -17.8962 -18.7389 -infinity
0.001 -17.2436 -17.8861 -20.9634 -25.6043 -16.9246 -17.8201 -17.8954 -18.7375 4.35864e-09
0.01 -17.2139 -17.8788 -20.9026 -21.6246 -16.9206 -17.8133 -17.8881 -18.725 3.884e-05
0.05 -17.1057 -17.8495 -20.6525 -18.921 -16.9062 -17.7862 -17.8584 -18.6717 0.0153016

f_849 a849 : f_849 b849
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -11.8763 -15.5214 -19.1566 -9.57829 -14.3895 -15.4313 -15.537 -16.5303 198.602
0.001 -11.8803 -15.5228 -19.1519 -9.58264 -14.3912 -15.4328 -15.5383 -16.531 198.434
0.01 -11.9162 -15.5347 -19.1103 -9.62191 -14.4066 -15.4454 -15.5501 -16.5377 196.906
0.05 -12.0785 -15.5863 -18.937 -9.80036 -14.4738 -15.5002 -15.6011 -16.5647 189.735

f_859 pai9 : f_859 mae9
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -12.4518 -11.8003 -11.4722 -infinity -infinity -11.7408 -11.8063 -11.5706 -infinity
0.001 -12.4481 -11.7983 -11.4715 -25.8239 -16.7754 -11.7392 -11.8043 -11.5695 4.21004e-14
0.01 -12.4161 -11.781 -11.465 -20.8272 -14.778 -11.7249 -11.7866 -11.5595 3.88033e-09
0.05 -12.2889 -11.7117 -11.4383 -17.3474 -13.3924 -11.667 -11.7161 -11.5188 8.73972e-06

f_859 pai9 : f_859 a859
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -10.4013 -10.2014 -10.9493 -infinity -9.73322 -10.1895 -10.2025 -10.5222 -infinity
0.001 -10.399 -10.2011 -10.9488 -17.49 -9.73297 -10.1892 -10.2022 -10.5219 8.10969e-08
0.01 -10.3789 -10.1983 -10.9446 -14.4964 -9.73081 -10.1865 -10.1995 -10.5186 7.62828e-05
0.05 -10.3022 -10.1885 -10.9274 -12.4288 -9.72384 -10.1768 -10.1896 -10.5061 0.00747111

f_859 pai9 : f_859 b859
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -10.4013 -10.2014 -10.9493 -infinity -9.73322 -10.1895 -10.2025 -10.5222 -infinity
0.001 -10.399 -10.2011 -10.9488 -17.49 -9.73297 -10.1892 -10.2022 -10.5219 8.10969e-08
0.01 -10.3789 -10.1983 -10.9446 -14.4964 -9.73081 -10.1865 -10.1995 -10.5186 7.62828e-05
0.05 -10.3022 -10.1885 -10.9274 -12.4288 -9.72384 -10.1768 -10.1896 -10.5061 0.00747111

f_859 mae9 : f_859 a859
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -12.5598 -13.9406 -15.9495 -infinity -13.0575 -13.8956 -13.9502 -14.6464 -infinity
0.001 -12.562 -13.9425 -15.9486 -16.2481 -13.0598 -13.8975 -13.952 -14.6478 0.000206051
0.01 -12.5822 -13.959 -15.9405 -14.2775 -13.0798 -13.9146 -13.9685 -14.6597 0.0201687
0.05 -12.6737 -14.0326 -15.907 -13.0132 -13.1693 -13.9904 -14.0414 -14.7119 0.457612

f_859 mae9 : f_859 b859
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -12.5598 -13.9406 -15.9495 -infinity -13.0575 -13.8956 -13.9502 -14.6464 -infinity
0.001 -12.562 -13.9425 -15.9486 -16.2481 -13.0598 -13.8975 -13.952 -14.6478 0.000206051
0.01 -12.5822 -13.959 -15.9405 -14.2775 -13.0798 -13.9146 -13.9685 -14.6597 0.0201687
0.05 -12.6737 -14.0326 -15.907 -13.0132 -13.1693 -13.9904 -14.0414 -14.7119 0.457612

f_859 a859 : f_859 b859
error P(full) half unrel MZ P-O GP-GC avunc FC LR(MZ/DZ)
0 -9.99313 -13.0431 -15.4266 -7.71332 -12.0405 -12.9772 -13.0548 -13.8626 190.467
0.001 -9.99706 -13.0452 -15.426 -7.71766 -12.0429 -12.9793 -13.0568 -13.8641 190.281
0.01 -10.0325 -13.0636 -15.4201 -7.75694 -12.0649 -12.9984 -13.0751 -13.878 188.595
0.05 -10.1926 -13.1456 -15.3962 -7.93548 -12.1627 -13.0832 -13.1565 -13.9392 180.785

```

## Anexo 10 – Cálculo da probabilidade pós-teste

-----														
---														
Error rate:			0			0,001			0,01			0,05		
Fam ID	Ind ID	Relation	LL-Diff	Relation	LL-Diff	Relation	LL-Diff	Relation	LL-Diff					
-----														
---														
										Erro Máximo				
f_715	a715											<b>0,1%</b>	<b>1,0%</b>	<b>5,0%</b>
f_715	b715	MZ	1,04921	MZ	1,0489	MZ	1,04599	MZ	1,03011					
			<b>91,803%</b>		<b>91,798%</b>		<b>91,747%</b>		<b>91,466%</b>	<b>&gt;91%</b>	<b>&gt;91%</b>	<b>&gt;91%</b>		
f_720	a720													
f_720	b720	MZ	1,00786	MZ	1,00769	MZ	1,00613	MZ	0,998749					
			<b>91,058%</b>		<b>91,054%</b>		<b>91,025%</b>		<b>90,885%</b>	<b>&gt;91%</b>	<b>&gt;91%</b>	<b>&gt;90%</b>		
f_736	a736													
f_736	b736	MZ	1,69076	MZ	1,69042	MZ	1,68728	MZ	1,67105					
			<b>98,003%</b>		<b>98,001%</b>		<b>97,987%</b>		<b>97,912%</b>	<b>&gt;98%</b>	<b>&gt;97%</b>	<b>&gt;97%</b>		
f_757	a757													
f_757	b757	MZ	2,47452	MZ	2,47419	MZ	2,47122	MZ	2,45691					
			<b>99,666%</b>		<b>99,666%</b>		<b>99,663%</b>		<b>99,652%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>		
f_780	a780													
f_780	b780	MZ	1,90835	MZ	1,90802	MZ	1,90506	MZ	1,89083					
			<b>98,780%</b>		<b>98,779%</b>		<b>98,771%</b>		<b>98,731%</b>	<b>&gt;98%</b>	<b>&gt;98%</b>	<b>&gt;98%</b>		
f_819	a819													
f_819	b819	MZ	2,26985	MZ	2,26945	MZ	2,26577	MZ	2,24848					
			<b>99,466%</b>		<b>99,465%</b>		<b>99,461%</b>		<b>99,439%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>		
f_827	a827													
f_827	b827	MZ	2,38218	MZ	2,38179	MZ	2,37822	MZ	2,36118					
			<b>99,587%</b>		<b>99,587%</b>		<b>99,583%</b>		<b>99,567%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>		
f_849	a849													
f_849	b849	MZ	2,29798	MZ	2,29762	MZ	2,29426	MZ	2,27815					
			<b>99,499%</b>		<b>99,499%</b>		<b>99,495%</b>		<b>99,476%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>		
f_859	a859													
f_859	b859	MZ	2,27982	MZ	2,2794	MZ	2,27553	MZ	2,25716					
			<b>99,478%</b>		<b>99,477%</b>		<b>99,473%</b>		<b>99,450%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>	<b>&gt;99%</b>		