

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**“TWIN PEAKS”: INVESTIGANDO MISTÉRIOS SOBRE A GEMELARIDADE  
NO BRASIL**

Augusto César Cardoso dos Santos

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

Orientadora: Lavínia Schuler-Faccini

Co-orientadora: Ursula Matte

Porto Alegre, Março de 2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução (Laboratório 113) do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O aluno recebeu bolsa de estudos com dedicação exclusiva concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM–UFRGS).

## Agradecimentos

Por este trabalho, eu agradeço:

À orientadora solar e exímia companheira de viagem Lavínia.

À co-orientadora de comentários sempre cirúrgicos e pertinentes Ursula.

Aos apoiadores: CNPq, INaGeMP, UFRGS e PPGBM.

Ao povo de Cândido Godói.

Aos profissionais do PPGBM que me inspiram: Nelson, Claiton, Maria Cátira, Luciane, Fernanda Vianna, Sídia, Lúcia, Elmo e ao grande professor Salzano.

À minha família tão acolhedora: Elizabete (mamãe), José de Arimatéa (papai), Abigail (irmã), Junior (irmão) e Fernanda (cunhada).

À família não-gaúcha: Renata, Camila, Raíssa e Yelena.

À família Ponteio: Sérgio, Rodrigo, Luzia e Aline.

À Renata Canalle por me apresentar à Genética Médica Populacional.

Aos amigos de LAB 113 desde o curso de inverno: Thayne, Juliano, Zuleide, Luíza, Julia, Gabriela Cardoso e Bibiane.

Aos amigos de LAB 113 do mestrado em diante: Perpétua, Mariléa, Gabriela Wacholz, Bruna, Pedro, Alejandra, Lucas e Nelson.

Aos amigos de Porto Alegre: Eliara, Graziella, Igor, Thiago, Giovanna e Lucas.

Aos amigos de GEHMED: Hygor e Giovanny.

Aos amigos de representação discente: Bragatte, Martiela, Joel, Breno e Valéria.

Aos precursores do trabalho em Cândido Godói: Roberto Giugliani, Alice, Marcelo, Mariana, Vanusa e Célia.

Ao povo gaúcho.

À cidade de clima adolescente e de ruas tão verdes, Porto Alegre.

Aos movimentos tropicalista na música e modernista na literatura.

Aos poetas Waly Salomão e Alcenor Candeira Filho.

Aos Davids Lynch e Bowie.

E a muitas outras coisas, exceto à certeza absoluta.

Finalmente, por este trabalho, eu agradeço ao Breno,

ao Breno

e ao Breno.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades</b> .....	6
<b>Resumo</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	10
<b>Capítulo I</b> .....	12
<b>1. Introdução</b> .....	13
1.1. Sobre o título.....	13
1.2. A Gemelaridade .....	13
1.3. Tipos de Gêmeos .....	14
1.4. Epidemiologia .....	15
1.5. Etiologia da Gemelaridade.....	16
1.5.1. <i>Fatores Ambientais</i> .....	16
1.5.2. <i>Fatores Genéticos</i> .....	17
1.5.2.1. <i>A rota do FSH</i> .....	18
1.5.2.2. <i>MTHFR e a rota do folato</i> .....	19
1.5.2.3 <i>Manutenção de uma gestação de sucesso</i> .....	20
1.6. Cândido Godói: a “Cidade dos Gêmeos”.....	21
<b>Capítulo II</b> .....	24
<b>2. Justificativa</b> .....	25
<b>Capítulo III</b> .....	26
<b>3. Objetivos</b> .....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos .....	27
<b>Capítulo IV</b> .....	28
<b>Artigo I – <i>Twin Peaks: a spatial and temporal study of twinning rates in Brazil</i> ....</b> <b>Erro!</b> <b>Indicador não definido.</b>	
<b>Capítulo V</b> .....	30
<b>Artigo II – <i>Genetic variants linked to folliculogenesis and successful pregnancy in mothers from a Twin’s Town</i> .....</b> <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Capítulo VI</b> .....	32
<b>6. Discussão</b> .....	33
<b>Capítulo VII</b> .....	38
<b>7. Conclusões e Perspectivas</b> .....	39
<b>Capítulo VIII</b> .....	40

<b>8. Referencias Bibliográficas</b> .....	41
<b>Capítulo IX</b> .....	47
<b>9. Artigo Anexo – <i>Lack of Association between Genetic Polymorphisms in IGF1 and IGFBP3 with Twin Births in a Brazilian Population (Cândido Godói, Rio Grande do Sul)</i></b> .....	48

### Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

<b>%</b>	Por mil
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CG</b>	Cândido Godói
<b>DZ</b>	Dizigótico
<b>ExAC</b>	<i>Exome Aggregation Consortium</i> – Consórcio de Agregação de Exomas (Acesso em: <a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a> )
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> – Hormônio Folículo Estimulante
<b>FSHB</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone Beta Subunit</i> – Subunidade Beta do Hormônio Folículo Estimulante
<b>FSHR</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i> – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
<b>GWAS</b>	<i>Genome Wide-Association Study</i> – Estudo de Associação Genômica Ampla
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano
<b>INaGeMP</b>	Instituto Nacional de Genética Médica Populacional
<b>km</b>	Quilômetro
<b>LD</b>	<i>Linkage Disequilibrium</i> – Desequilíbrio de Ligação
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i> – Hormônio Luteinizante
<b>LSP</b>	Linha São Pedro
<b>MIM</b>	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> – Herança Mendeliana no Homem (Acesso em: <a href="https://www.omim.org/">https://www.omim.org/</a> )
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> – RNA Mensageiro
<b>MTHFR</b>	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i> – Metilenotetrahidrofolato Redutase
<b>MZ</b>	Monozigótico
<b>RMA</b>	Reprodução Medicamente Assistida
<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul

<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>SIM</b>	Sistemas de Informações sobre Mortalidade
<b>SINASC</b>	Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos
<b>SMAD3</b>	<i>SMAD Family Member 3</i> – Membro 3 da Família SMAD
<b>SNPs</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> – Polimorfismos de Nucleotídeo Único
<b>TG</b>	Taxa Gemelar
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> – Fator de Necrose Tumoral
<b>TP53</b>	<i>Tumor Protein P53</i> – Proteína Tumoral 53
<b>VEGFA</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> – Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

## Resumo

O nascimento de gêmeos na espécie humana é rodeado por muitos mistérios e, há bastante tempo, desperta a curiosidade tanto leiga quanto científica. Os estudos com gêmeos vêm contribuindo para o entendimento de diversas áreas da biologia humana; porém, aspectos epidemiológicos e etiológicos relacionados aos nascimentos gemelares em si permanecem pouco elucidados. Para além de mera curiosidade, pesquisas nessa área podem ajudar a compreender mecanismos relacionados à reprodução em geral, além de serem importantes em um contexto de saúde pública, já que a gestação gemelar representa riscos adicionais à mãe e à prole. Em países industrializados observa-se um aumento acentuado nas taxas gemelares (TGs) que parece estar relacionado ao aumento da idade materna na primeira gravidez e tecnologias de Reprodução Medicamente Assistida (RMA). No Brasil, os aspectos geográficos e sociodemográficos dos nascimentos gemelares ainda não foram profundamente estudados. Assim, este estudo objetivou responder a três questões principais relacionadas aos nascimentos de gêmeos: “Quantos?” “Onde?” e “Como?”, isto é, considerando aspectos epidemiológicos e etiológicos. Para o estudo epidemiológico, desenhamos um estudo de base de dados populacional e investigamos as TGs em duas dimensões: espacial e temporal. Para isso, utilizamos dados provenientes do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) e analisamos mais de 41 milhões de nascimentos que ocorreram em todos os 5.565 municípios brasileiros entre 2001 e 2014. Encontramos uma TG nacional média de 9,41 por 1.000 nascimentos e o modelo de análise de séries temporais revelou tendência de aumento global ao longo do período estudo, mas com notáveis diferenças regionais. De fato, resultados da “Análise de Cluster e Outlier” (*Anselin Local Moran's I*) revelaram concentração de municípios com altas TGs em uma área que vai do sul do Nordeste brasileiro até o Rio Grande do Sul (Global Moran Index = 0.062,  $P < 0.001$ ). Além disso, encontramos correlação positiva entre o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) local e as TGs em diferentes cenários, sugerindo que o IDH pode ser um importante indicador de RMA no Brasil. Nossas análises também revelaram aumento de 26.42% na TG entre as mulheres com mais de 44 anos durante o período estudado. A tendência de aumento temporal encontrada para algumas regiões do país está de acordo com o que é observado em outros países industrializados, enquanto que a análise geográfica revelou duas situações bem distintas dentro do Brasil. Por sua vez, os



estudos acerca da etiologia dos nascimentos de gêmeos foram concentrados em investigar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em mães de Cândido Godói (CG), uma pequena cidade do Sul do Brasil conhecida como a “Cidade dos Gêmeos”. Este título é devido à alta TG observada no município e à recorrência do traço nas famílias locais, com forte descendência europeia. Nós desenhamos um estudo caso-controle e genotipamos sete SNPs relacionados à foliculogênese (rs6166:C>T em *FSHR*, rs11031006:G>A próximo a *FSHB*, e rs17293443:T>C in *SMAD3*) ou a gestações de sucesso (rs1801131:T>G e rs1801133:G>A em *MTHFR*, rs2010963:C>G em *VEGFA*, e rs1800629:G>A em *TNF*) em 44 mães de gêmeos (casos) e 102 mães de filhos únicos (controles), todas residentes de CG. Para todos os SNPs, a distribuição das frequências alélicas e genotípicas foi similar entre casos e controles. Diferentes combinações de alelos de risco e análises haplotípicas também foram homoganeamente distribuídas entre ambos os grupos. Assim, estes resultados sugerem uma ausência de associação entre os nascimentos gemelares em CG e sete SNPs relacionados à foliculogênese ou a gestações de sucesso, mas é possível que outras variantes genéticas ligadas a ambos os processos possam estar envolvidas neste fenômeno que possui uma base genética subjacente.

**Palavras-chave:** gêmeos; taxas gemelares; polimorfismos genéticos; foliculogênese; gravidez de sucesso.

## Abstract

The birth of twins in human species is surrounded by many mysteries and it has long aroused both lay and scientific curiosity. Studies with twins have contributed to the understanding of several areas of human biology; however, the epidemiological and etiological aspects related to twin births by themselves remain unclear. Beyond mere curiosity, research in this field may help us to understand the mechanisms related to reproduction in general, and it is important in a public health context since a twin pregnancy represents additional risks to the mother and offspring. Some countries have reported a striking increase in twinning rates (TRs), which seems to be related mainly to delayed childbearing and to Medically-Assisted Reproduction (MAR) technologies. In Brazil, the epidemiological scenario of twin births has not been studied while considering its territorial and sociodemographic magnitude. Therefore, this study aimed to answer three main questions related to twin births: "How many?", "Where" and "How?", that is, we investigated twinning in light of epidemiology and etiology. For the epidemiological study, we carried out a population-based study, investigating twin births in two dimensions: spatial and temporal. For that, we used data from Brazil's Live Birth Information System (SINASC), and we analyzed over 41 million births that occurred in all 5,565 Brazilian municipalities between 2001 and 2014. We found an average TR of 9.41 per 1,000, and a first-order autoregressive model of time-series analysis revealed a global upward trend over time, but with important regional differences. In fact, a Cluster and Outlier Analysis (Anselin Local Moran's  $I$ ) was performed and identified clusters of high TR in an area stretching from the south of Brazil's Northeast Region to the South Region (Global Moran Index = 0.062,  $P < 0.001$ ). Furthermore, we found a positive correlation between the local Human Development Index (HDI) and TRs in different scenarios, suggesting that the HDI may be an important proxy indicator of MAR in Brazil. We also found a sharp increase (26.42%) in TR in women aged over 44 years. The upward temporal trend in TRs is in line with recent observations from other countries, whereas the spatial analysis revealed two very different realities within our country. In turn, studies on the etiology of twin births were focused on single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mothers from Cândido Godói (CG), a small southern Brazilian city known as the "Twin's Town". This title is due to the high TR attributed to the municipality and to the recurrence of the twin trait through the

local families, who have a strong European descent. We performed a case-control study and genotyped seven SNPs related to folliculogenesis (rs6166:C>T in *FSHR*, rs11031006:G>A near *FSHB*, and rs17293443:T>C in *SMAD3*) and to a successful pregnancy (rs1801131:T>G and rs1801133:G>A in *MTHFR*, rs2010963:C>G in *VEGFA*, and rs1800629:G>A in *TNF*) in 44 mothers of twins (cases) and 102 mothers of singletons (controls), all of them from CG. For all SNPs, the distributions of the genotypic and allelic frequencies were similar between the cases and controls. Different combinations of risk alleles and haplotypic analyses were also homogeneously distributed between both groups. Thus, these results suggest a lack of association between twin births in CG and seven SNPs related to folliculogenesis or successful pregnancies, but it is possible that other genetic variants linked to both processes may be involved in this phenomenon, which has an underlying genetic basis.

**Keywords:** twins; twinning rates; genetic polymorphisms; folliculogenesis; successful pregnancy.

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sobre o título

“Twin Peaks” é uma famosa série estadunidense de televisão criada na década de 1990 por David Lynch e Mark Frost. À época, esta série revolucionou a linguagem televisiva por conta de, dentre outros, seus personagens idiossincráticos, pela fuga de lugares-comuns presentes em outras obras da época e, sobretudo, pelas altas doses de mistério características do seu roteiro (Lavery 1995; Poniewozik 2007).

Decidimos batizar este trabalho de “Twin Peaks” porque estudamos um fenômeno que é rodeado por semelhante clima de mistério: o nascimento dos gêmeos na espécie humana. Ainda, além de possuir “twin” no nome (do inglês, *gêmeo*), a trama da série desdobra-se seguindo a investigação do fictício agente de investigações Dale Cooper. Em termos gerais, o ofício do cientista em um laboratório pode ser comparado ao do detetive investigativo, e o eminente cientista do século XX, Albert Einstein, fez comparação equivalente em seu livro *The evolution of Physics* (Einstein and Infeld 1938).

Por fim, acreditamos que um trabalho científico pode ser mais atrativo quando situado em contextos além dos jargões e que, quando possível, a Ciência deve ser misturada às outras áreas de produção do conhecimento, incluindo a Cultura Popular. Afinal, antes de serem separadas por pastas acadêmicas, todas elas são derivadas da comum e eterna tentativa humana de entender-se a si mesma e ao mundo.

### 1.2. A Gemelaridade

A simbologia do zodíaco astrológico, o mito da fundação de Roma, a tradicional rejeição em algumas tribos indígenas, o nascimento de duas crianças dividindo o mesmo corpo e as experimentações nazistas em uma pequena cidade do sul do Brasil. Esta miscelânea de fatos históricos e ficcionais reflete o fascínio dos seres humanos pela gemelaridade ao longo dos séculos. Além de despertar curiosidade, os gêmeos fornecem um caminho para o entendimento de eventos ligados à embriogênese humana e a diversos processos patológicos (Hall 2003).

Nas últimas décadas, tem havido um aumento significativo nas taxas de gemelaridade principalmente nos países desenvolvidos e a busca por explicações para este

fenômeno nunca fora tão latente, sobretudo porque gestações gemelares aumentam o risco de complicações para a gestante e a prole, além de acarretarem custos hospitalares adicionais (Delbaere et al. 2008; Laskov et al. 2013; Dawson et al. 2016). Todavia, dados da epidemiologia dos nascimentos gemelares são pouco estudados em países em desenvolvimento, e no Brasil o cenário é semelhante (Geraldo et al. 2008; Smits and Monden 2011; Otta et al. 2016).

Apesar dos esforços tanto leigos quanto científicos, pouco é conhecido sobre os processos etiológicos ligados ao nascimento de gêmeos. Na literatura especializada, acumulam-se associações entre variáveis genéticas, epigenéticas e ambientais ao fenômeno característico de caráter multifatorial (McNamara et al. 2016). Mesmo assim, nem sempre os resultados são concordantes e é notório que ainda há muito a esclarecer.

### **1.3. Tipos de Gêmeos**

De acordo com sua origem, os gêmeos podem ser classificados como monozigóticos (MZ), que surgem a partir da divisão de um óvulo fecundado, ou dizigóticos (DZ), que ocorrem a partir da liberação de mais de um óvulo e subsequente fecundação por diferentes espermatozoides. Embora tal dicotomia clássica tenha sido questionada na literatura científica, a divisão em MZ e DZ continua sendo elucidativa em estudos especializados (Shur 2009; Herranz 2015).

Em linhas gerais, a gemelaridade MZ (*Mendelian Inheritance in Man* – MIM: 276410) é considerada um evento pós-fertilização resultante da divisão do precoce embrião ao longo das duas primeiras semanas de desenvolvimento. O período no qual tal fracionamento ocorre estabelece a corionicidade e a amniocidade das gestações (Benirschke 2013; Herranz 2015). Outrora considerados “idênticos”, atualmente acumulam-se evidências de que o DNA dos gêmeos MZ apresenta uma miríade de diferenças no tocante a mutações somáticas e mitocondriais, diferenças no controle epigenético, anomalias cromossômicas, dentre outros (Hall 2003; Shur 2009; Benirschke 2013).

Por sua vez, a gemelaridade DZ (MIM: 276400) está relacionada à seleção dos folículos em desenvolvimento contidos no ovário, onde, ao invés de um, dois folículos são maturados e ambos os ovócitos são liberados prontos para a fecundação por diferentes espermatozoides. Logo, os gêmeos DZ apresentam o mesmo nível de identidade genética

que irmãos de gestação única, isto é, compartilham entre si aproximadamente 50% dos seus genes e, evidentemente, podem ser do mesmo sexo ou de sexos opostos (Hoekstra et al. 2007).

#### **1.4. Epidemiologia**

A taxa de gemelaridade (TG) é definida como o número de gestações gemelares por 1000 (‰) nascimentos em um determinado ano. Notavelmente, esta taxa varia de acordo com espaço e tempo observados, a qual, sobretudo em países desenvolvidos, apresentou um acentuado declínio por volta de 1900 e, em contraste, passou a aumentar constantemente a partir de 1970 (Hoekstra et al. 2007; Smits and Monden 2011).

Nos Estados Unidos, por exemplo, a TG passou de 9,5‰ em 1975 para 16,9‰ em 2011, representando um aumento de aproximadamente 75%. Durante o mesmo período, também aumentou em outros países industrializados como Inglaterra e País de Gales (de 9,9 a 16,1‰), Alemanha (de 9,2 a 17,2‰), Dinamarca (de 9,6 a 21,2‰) e Coreia do Sul (5,0 a 14,6‰) (Burt and Klump 2012; Pison et al. 2015; Dawson et al. 2016).

O aumento da idade materna na época do nascimento e o uso de técnicas ligadas à Reprodução Medicamente Assistida (RMA) são tidos como possíveis responsáveis dos modernos aumentos na taxa de nascimentos gemelares (Shur 2009; Boothroyd 2016; Dawson et al. 2016). Pison et al. (2015) ressaltaram que a prática da RMA ocuparia um protagonismo no aumento da TG, levantando uma importante questão de saúde, visto que nascimentos gemelares estão ligados a complicações tanto para a mãe quanto para os bebês.

O continente africano e, em especial, a África Central representa uma vasta zona onde são encontradas as maiores taxas de nascimentos gemelares, com países como Guiné Equatorial e República Democrática do Congo apresentando taxas acima de 18,0‰. O maior índice mundial foi observado em Benin, com 27,9 nascimentos gemelares a cada 1.000 nascimentos (Nylander 1969; Smits and Monden 2011). Nestas situações reforça-se a importância de outras causas que a não a RMA nos nascimentos gemelares, como predisposição genética ou fatores ambientais particulares. Em geral, países da Ásia e América do Sul apresentam índices menores (de abaixo de 9,0 a 12,0‰) (Aisien et al.; Smits and Monden 2011).

O trabalho de Smits and Mondem (2011) refere uma TG para o Brasil de 8,8%. Embora muito informativo, o estudo é baseado em dados de 1996 e não considera a diversidade territorial e sociodemográfica do Brasil. Outros poucos estudos têm focado neste tema e os dados disponíveis são geralmente restritos a estados como São Paulo e Rio Grande do Sul, com resultados discordantes e prevalências maiores em São Paulo (Colletto and Beiguelman 2001; Colletto 2003; Geraldo et al. 2008; Otta et al. 2016).

Até pouco tempo, considerava-se que as diferenças na TG entre os países e ao longo do tempo fossem devidas à variação na gemelaridade DZ, pois a epidemiologia de gêmeos MZ mantinha-se constante ao redor do mundo (aproximadamente 4,0‰) (Hall 2003; Hoekstra et al. 2007). Todavia, observou-se que a prática da RMA também pode influenciar os índices de gemelaridade MZ (Parazzini et al. 2016; Sobek et al. 2016; Dawson et al. 2016).

## **1.5. Etiologia da Gemelaridade**

Não há, na literatura especializada, uma causa *sui generis* para a gemelaridade. Atualmente, conhece-se um conjunto de fatores genéticos e ambientais que, embora não consensuais, se somam e podem tornar determinada pessoa (em especial mulheres), famílias ou ainda populações inteiras mais suscetíveis aos nascimentos gemelares. A distribuição destes fatores não é homogênea entre gêmeos MZ e DZ, e a maior parte das explicações pode ser aplicada apenas à gemelaridade DZ.

### *1.5.1. Fatores Ambientais*

Como já mencionado, existe uma forte correlação entre procedimentos ligados à RMA e a TG em países desenvolvidos. Tal associação é devida às estratégias relacionadas ao próprio método, como indução da ovulação e implantação de múltiplos embriões, potencializando as taxas de gemelaridade DZ e MZ, de modo que o nascimento de gêmeos é considerado o evento adverso mais comum relacionado à RMA (Nakasuji et al. 2014; Boudjenah et al. 2014; Sobek et al. 2016).

Outro fator que parece influenciar a gemelaridade (sobretudo DZ) é a idade materna avançada (Lambalk et al. 1998; Dawson et al. 2016). A notável diminuição da TG no início do século XX reflete, dentre outros fatores, a diminuição da idade materna média,



enquanto que seu aumento a partir de 1970 também tem sido associado a uma idade materna elevada ao nascimento (Hall 2003; Helle 2008). O mecanismo subjacente proposto seria a presença de distúrbios em decorrência da idade avançada no mecanismo de retroalimentação responsável pela liberação do FSH, mas o assunto ainda permanece alvo de debate (Simoni and Casarini 2014).

Demais fatores maternos associados à gemelaridade DZ seriam maior paridade, etnia, status socioeconômico, taxa de ovulação, composição corporal, variação sazonal, tabagismo e influência dietética (Hankins and Saade 2005; Steinman 2006; Morales-Suárez-Varela et al. 2007; Hoekstra et al. 2007; Shur 2009; Steinman 2009; Dawson et al. 2016). Uma possível associação com o ácido fólico permanece controversa (Haggarty et al. 2006; Muggli and Halliday 2007; Enciso et al. 2016).

Entretanto, fatores ambientais não são suficientes para explicar por completo a ocorrência de gemelaridade, sobretudo porque têm sido relatadas comunidades livres da influência dos fatores ambientais mais comumente associados (como metodologias ligadas à RMA), além de que, em alguns casos, o fenótipo “ter gêmeos” é claramente prevalente em determinados núcleos familiares (Matte et al. 1996; Hoekstra et al. 2008; Shur 2009).

### 1.5.2. *Fatores Genéticos*

A ligação entre caracteres genéticos e nascimentos gemelares tem sido explorada pela comunidade científica há tempos, em grande parte através de estudos familiares onde foi possível identificar forte predisposição intrafamiliar ao nascimento de gêmeos DZ (Hall 2003). Outrora considerada um traço passado exclusivamente pela mãe, a gemelaridade DZ hoje em dia é compreendida como sendo transmitida tanto via materna quanto paterna, com expressão limitada ao sexo feminino (Hoekstra et al. 2007; Shur 2009).

Em linhas gerais, a gemelaridade DZ parece ser influenciada por muitos genes e não demonstra ser um simples fenótipo dominante ou recessivo (Derom et al. 2006; Hoekstra et al. 2007). Além disso, é possível que fatores epigenéticos também possam estar relacionados (Burt and Klump 2012; McNamara et al. 2016). Por sua vez, a genética da gemelaridade MZ permanece ainda mais enigmática e não existem componentes definitivamente implicados, muito embora a participação de um componente genético seja considerada “indubitável” (Shur 2009; Herranz 2015; Mbarek et al. 2016).

Tem sido possível a caracterização de genes ou variantes genéticas associadas ao nascimento de gêmeos DZ, seja por abordagem gene-candidato (Al-Hendy et al. 2000; Palmer et al. 2006; Tagliani-Ribeiro et al. 2011; Sirugo et al. 2012; Huang et al. 2015) ou por estudos livres de hipótese (Derom et al. 2006; Palmer et al. 2006; Painter et al. 2010; Mbarek et al. 2016). Porém, os resultados nem sempre são concordantes e não tem sido possível a identificação de genes maiores de predisposição.

Extensamente relacionada ao mecanismo de poliovulação, a genética da gemelaridade DZ tem sido implicada, embora não exclusivamente, à rota do hormônio folículo estimulante (FSH) (Al-Hendy et al. 2000; Hoekstra et al. 2007; Simoni and Casarini 2014; Mbarek et al. 2016). Em consonância, a incidência da gemelaridade DZ espontânea tem sido também proposta como um potencial marcador para fecundidade (Derom et al. 2011).

Além da rota do FSH, alguns outros candidatos foram implicados nos nascimentos gemelares, como o *PPARG* (Busjahn et al. 2000), *PTX3* (Sirugo et al. 2012), *GDF9* (Palmer et al. 2006) e *FIGLA* (Palmer et al. 2006), cuja investigação destes genes não foi incluída neste trabalho. Ao invés disso, decidimos investigar variantes genéticas relacionadas a uma gestação de sucesso (tanto em *MTHFR*, quanto em *VEGFA* e *TNF*), pois, independentemente dos fatores precoces ligados à fecundação em si, é preciso que haja um organismo preparado para manter uma gestação gemelar.

#### 1.5.2.1. A rota do FSH

A múltipla ovulação tem sido considerada o fenômeno biológico fundamental da gemelaridade, porém, é flagrante que suas bases genética e molecular permanecem pobremente compreendidas (Sirugo et al. 2012). De fato, a gemelaridade DZ espontânea tem-se mostrado associada a um aumento na concentração de FSH na mãe, dada a sua relevante função de estimular o crescimento e a maturação do folículo ovariano (Lambalk et al. 1998; Hoekstra et al. 2007; Bernard et al. 2010).

O FSH é uma gonadotrofina sintetizada e liberada pela glândula pituitária anterior após estímulo hipotalâmico que induz o crescimento folicular e a maturação dos ovários, bem como a síntese de estradiol. O hormônio consiste de uma subunidade  $\alpha$  e subunidades  $\beta$  (FSHB), e se liga não-covalentemente a um receptor presente nas células gonadais (FSHR) (Bernard et al. 2010).

O metabolismo do FSH está contido em um contexto de retroalimentação que envolve outra importante gonadotrofina de origem pituitária, o hormônio luteinizante (LH) (Bernard et al. 2010; Simoni and Casarini 2014). Falhas neste mecanismo de *feedback* decorrentes da idade avançada podem levar ao desenvolvimento folicular múltiplo e, na presença de dois ovócitos de qualidade, uma gestação gemelar pode ocorrer (Beemsterboer et al. 2006; Van der Stroom et al. 2013).

Pesquisas nas duas últimas décadas revelaram o papel de variantes nos genes que codificam FSHR e FSHB na determinação dos níveis hormonais séricos e na resposta a órgãos-alvo (Simoni and Casarini 2014). Tão logo, variantes em *FSHR* e *FSHB* associadas à gemelaridade DZ foram descritas. Como exemplo, Al-Hendy et al. (2000) identificaram uma associação entre a gemelaridade e duas variantes em desequilíbrio de ligação (LD) no éxon 10 de *FSHR*, rs6166:C>T e rs6165:C>T, sugerindo que a homozigosidade para ambas estaria associada com gemelaridade DZ repetida, por meio da produção de um FSHR mais sensível. Todavia, tais resultados foram recebidos com certo criticismo (Derom et al. 2001; Gromoll and Simoni 2001; Lambalk 2001).

Mbarek et al. 2016, por meio de um robusto estudo de associação genômica (GWAS – *genome wide association study*) em mães de gêmeos DZ e mulheres-controle de ancestralidade europeia, identificaram dois polimorfismos genéticos (rs11031006:G>A, próximo a *FSHB* e rs17293443:T>C, em *SMAD3*) como variantes de risco para a gemelaridade, ambos relacionados a diversos aspectos da capacidade reprodutiva e saúde. Ainda no mesmo estudo, os achados foram replicados em uma grande coorte na Islândia e foram, inclusive, associados a demais aspectos relacionados à fertilidade feminina.

Foi sugerido que mulheres carregando o alelo rs11031006-G, próximo a *FSHB*, teriam maior depleção do *pool* folicular ovariano. Este polimorfismo mostrou-se importante para diversos aspectos reprodutivos femininos, como idade mais precoce no desenvolvimento das mamas, menarca, menopausa, dentre outros. Por sua vez, *SMAD3* codifica um membro de uma família de proteínas transdutoras de sinais e moduladores transcricionais, sendo altamente expresso no ovário humano, onde participa no mecanismo de resposta ao FSH, e o alelo rs7293443-C parece aumentar as chances de gemelaridade DZ (Mbarek et al. 2016)

#### 1.5.2.2. *MTHFR e a rota do folato*

O metabolismo do folato está intimamente relacionado à síntese e ao reparo do DNA, controle da expressão gênica e muitos outros processos biológicos de fundamental importância para a divisão celular e o desenvolvimento do embrião (Enciso et al. 2016). Variantes em genes envolvidos na rota do folato e no ciclo da homocisteína/metionina têm sido implicados não só em malformações e patologias no curso gestacional, mas também em diversos aspectos da reprodução, incluindo a gemelaridade, muito embora os resultados não sejam absolutamente concordantes (Haggarty et al. 2006; Hoekstra et al. 2007; Huang et al. 2015).

Em termos de prevalência e impacto, variações no *MTHFR*, o qual codifica a enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase, estão entre as mais importantes biologicamente. Dentre elas, destacam-se os SNPs nas posições 677 (rs1801133:G>A) e 1298 (1801131:T>G) do mRNA, cujos alelos A e G, respectivamente, diminuem a atividade da enzima MTHFR e, conseqüentemente, influenciam nos níveis séricos de homocisteína e demais metabólitos envolvidos (Forges et al. 2007).

Há uma série de evidências revisadas por Forges et al. (2007) que mostram que a atividade reduzida de MTHFR e a subsequente redução de SAM (S-adenosilmetionina, doador universal do grupamento metil para reações de metilação) podem influenciar em diversos aspectos da reprodução humana, inclusive no nascimento de gêmeos. Tal associação parece ser mantida tanto em um cenário de RMA, quanto no caso de gestações naturalmente concebidas (Hasbargen et al. 2000; Haggarty et al. 2006; Huang et al. 2015). Adicionalmente, foi mostrado recentemente que ambos os polimorfismos anteriormente citados podem influenciar no sucesso reprodutivo em níveis distintos, desde a implantação do embrião até a sua viabilidade (Enciso et al. 2016).

### 1.5.2.3 *Manutenção de uma gestação de sucesso*

O processo de implantação (ou nidação) requer a interação direta entre o blastocisto e o endométrio materno, o qual precisa ser receptivo. A receptividade do endométrio é um processo ativo, limitado no tempo e que envolve a regulação da expressão de centenas de genes, onde alguns componentes maternos representam uma ameaça para o feto, enquanto outros são tão úteis quanto necessários (Hoozemans et al. 2004).

Certas citocinas inflamatórias são fundamentais na relação materno-fetal e, conseqüentemente, importantes para o processo de implantação. Especificamente, o TNF

(fator de necrose tumoral) é importante durante os períodos de pré e peri-implantação e consideráveis desbalanços nos níveis de TNF estão associados com perdas gestacionais (Hoozemans et al. 2004; Chaouat et al. 2007). Sabe-se que polimorfismos genéticos podem impactar nos níveis de TNF e influenciar na taxa de implantação do embrião e de gestações múltiplas (Vialard et al. 2013).

Além disso, o desenvolvimento saudável do embrião não seria possível sem um adequado suprimento sanguíneo materno. O VEGFA (fator de crescimento endotelial vascular) é expresso durante a pré e peri-implantação no estroma uterino, possuindo o papel crítico de regulador da angiogênese, a qual, por sua vez, é importante para o crescimento folicular, qualidade do ovócito, vascularização endometrial e taxas de implantação (Chaouat et al. 2007; Boudjenah et al. 2014).

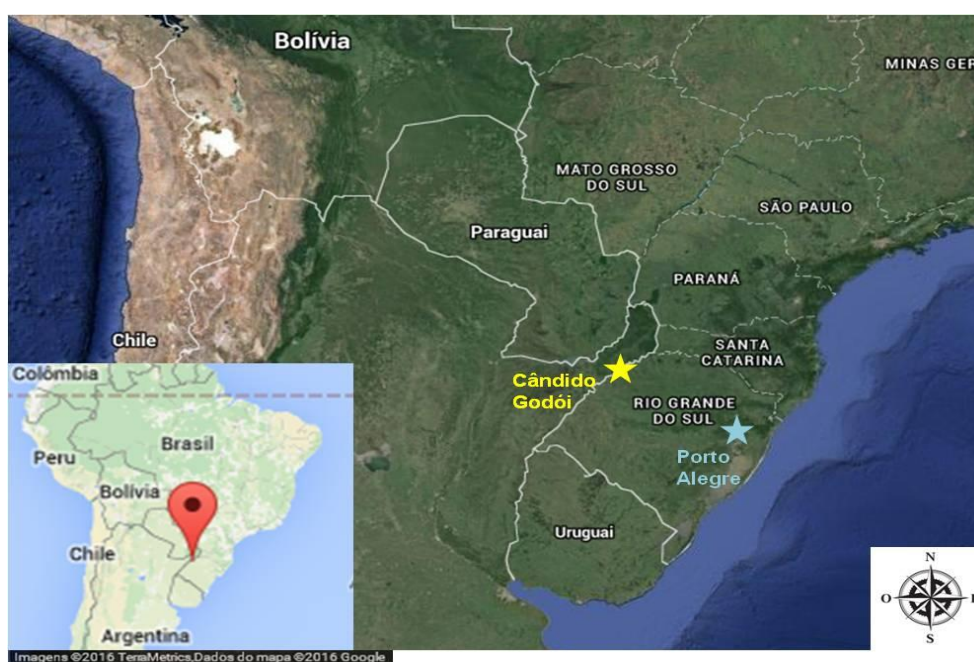
De fato, em um cenário de RMA, Boudjenah et al. 2014 investigaram 13 SNPs possivelmente associados com o risco de falha de implantação recorrente em mulheres sem fatores de infertilidade, dos quais dois SNPs individuais nos genes rs2010963:C>G em *VEGFA* e rs1800629:G>A *TNF* mostraram-se significativamente associados com a taxa de implantação e/ou as taxas de gestação, além de mostrarem que a combinação de ambos pode modificar o potencial de implantação.

## 1.6. Cândido Godói: a “Cidade dos Gêmeos”

O município de Cândido Godói (CG, 27°57'07''S; 54°45'07''O) está localizado na região noroeste do estado brasileiro do Rio Grande do Sul, a 524 km da capital Porto Alegre (Figura 1). A cidade possui mais de 6500 habitantes, a maioria pertencendo à zona rural (IBGE 2010) e cuja população é majoritariamente descendente de alemães e poloneses (Matte et al. 1996).

Dividida em 24 seções ou distritos chamados “linhas”, cuja intercomunicação geralmente é complicada, CG é conhecida como “a cidade dos gêmeos”, por apresentar uma TG duas vezes superior à nacional (estimada em 1%), sendo que em uma das seções da cidade, Linha São Pedro, a TG varia entre 7% e 10% (Matte et al. 1996; Tagliani-Ribeiro et al. 2011). Ao que nos consta, são poucos os relatos na literatura que descrevem uma alta prevalência de gemelaridade natural a uma região geográfica restrita livre da influência das metodologias de RMA (Nylander 1969; Hamamy et al. 2004; Sahab Khan and Skandhan 2011; Sunde et al. 2013).

Os estudos da gemelaridade em CG datam a partir de 1996, quando Matte et al. confirmam a alta TG na cidade, especialmente na LSP, atribuindo a principal causa a fatores genéticos devido, sobretudo, à ausência dos principais fatores ambientais comumente relacionados aos nascimentos gemelares (como metodologias ligadas à RMA) e à alta recorrência familiar, além das características intrínsecas à formação da cidade. Assim, foi sugerido que teria ocorrido uma concentração de genes que predispunham à gemelaridade em uma população fundadora, a qual teria permanecido relativamente isolada com um alto grau de endocruzamento (Matte et al. 1996).



**Figura 1:** Localização geográfica do município de Cândido Godói. **Fonte:** Adaptado de *Google Maps* 2018 (<https://maps.google.com>)

De fato, mais de 10 anos depois dos estudos iniciais, a hipótese do efeito genético do fundador é confirmada por meio da análise de registros de batismo e de isonímia, em contraste a hipóteses alternativas que também buscavam explicar o fenômeno da gemelaridade em CG, como experimentações nazistas e demais mitos locais (Tagliani-Ribeiro et al. 2011; De Oliveira et al. 2013).

Além disso, Tagliani-Ribeiro et al. (2012) realizaram um estudo caso-controle em mães de gêmeos DZ (casos) e mãe de filhos únicos (controles) originárias do município. Considerando que a via p53 desempenha um importante papel nas gestações através de

implantação do blastocisto e da sobrevivência do embrião, os autores analisaram cinco SNPs e identificaram o alelo P72 de *TP53* (rs1042522) como um forte fator de risco para a gemelaridade local.

Embora estes resultados contribuam para o esclarecimento do fenômeno, é notável o caráter multigênico da gemelaridade e é bem provável que outras variantes genéticas estejam ligadas à alta recorrência gemelar (Palmer et al. 2006; Hoekstra et al. 2007; Huang et al. 2015). Além disso, novos estudos fornecem novas pistas para o entendimento das bases biológicas subjacentes aos nascimentos de gêmeos em Cândido Godói, um município onde a taxa de gemelaridade natural ainda pode ser observada, isto é, onde a alta incidência gemelar não demonstra ser alterada pela influência de RMA.

## **CAPÍTULO II**

---

### **JUSTIFICATIVA**



## 2. JUSTIFICATIVA

A despeito de despertar a curiosidade na espécie humana há séculos, a gemelaridade é uma característica multifatorial ainda pouco compreendida. O estudo com gêmeos tem contribuído para o entendimento de diversas áreas da biologia humana, mas principalmente aspectos etiológicos e epidemiológicos relacionados aos nascimentos gemelares permanecem pouco conhecidos (Hall 2003; McNamara et al. 2016).

Comparado ao nascimento de filhos únicos, o nascimento de gêmeos está associado a diversas complicações para a mãe e para a prole, acarretando cuidados e custos hospitalares adicionais (Corsello and Piro 2010; Dawson et al. 2016). Ultimamente, diversos países têm relatado tendência ascendente na incidência de nascimentos de gêmeos, o que tem gerado preocupações principalmente no campo da RMA, onde a gemelaridade é considerada o principal fator iatrogênico associado (Pison et al. 2015; Fellman 2016; Dawson et al. 2016). No Brasil, o cenário epidemiológico dos nascimentos gemelares ainda não foi estudado considerando a sua magnitude territorial e sociodemográfica.

Do ponto de vista etiológico, alguns estudos apontam variantes genéticas específicas aumentando a chance de uma mulher portadora ter filhos gêmeos (Al-Hendy et al. 2000; Hasbargen et al. 2000; Palmer et al. 2006; Painter et al. 2010; Huang et al. 2015; Mbarek et al. 2016). Porém, além dos resultados nem sempre concordarem, não parece haver uma única via biológica que leve ao nascimento de gêmeos. Pesquisas nessa área podem, além de aprofundar o entendimento sobre a reprodução humana, contribuir para o desenvolvimento de estratégias que tratem pessoas com infertilidade (Lambalk, 2001).

Resultados importantes sobre a etiologia dos nascimentos gemelares foram obtidos a partir de estudos em alguns poucos locais conhecidos como “cidades dos gêmeos”, como a pequena cidade de CG localizada no Sul do Brasil. Nesta cidade, a gemelaridade ocorre a uma taxa naturalmente alta e o traço gemelar corre entre as famílias locais, o que tem levado à elaboração de teorias com significado nem sempre comprovadas pelo método científico (Tagliani-Ribeiro et al. 2011). Assim, estudos em CG podem contribuir não apenas para uma melhor compreensão sobre uma questão local, mas também para o estudo de questões ainda mais profundas sobre a reprodução humana.

## **CAPÍTULO III**

---

### **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar aspectos relacionados à epidemiologia da gemelaridade no Brasil e investigar a associação de variantes genéticas relacionadas à foliculogênese e à manutenção da gestação na população de Cândido Godói (RS).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Estudo epidemiológico:*

- Caracterizar as taxas gemelares brasileiras de acordo com geografia (país, regiões, estados e municípios) e tempo (2001 a 2014);
- Entender possíveis tendências e variações, além de identificar fatores epidemiológicos potencialmente implicados;
- Contextualizar os resultados encontrados no Brasil com outros países.

*Estudo molecular:*

- Estudar a associação dos SNPs rs11031006:G>A próximo a *FSHB*, rs17293443:T>C em *SMAD3*, rs1801131:T>G em *MTHFR*, rs2010963:C>G em *VEGFA*, e rs1800629:G>A em *TNF* com os nascimentos gemelares em CG;
- Integrar os resultados encontrados com as genotipagens de outros dois SNPs (rs6166:C>T em *FSHR*, e rs1801133:G>A em *MTHFR*) já realizados no laboratório (Tagliani-Ribeiro 2011);
- Comparar as frequências encontradas com outras populações já estudadas e relacionar estes achados com os nascimentos gemelares na população em questão.

## CAPÍTULO IV

---

### ARTIGO I

*Twin Peaks: a spatial and temporal study of twinning rates in Brazil*

Artigo submetido à revista *PLOS ONE*



## CAPÍTULO V

---

### ARTIGO II

*Genetic variants linked to folliculogenesis and successful pregnancy in mothers from a  
Twin's Town*

Artigo em preparação para posterior submissão na revista *Reproduction*



## **CAPÍTULO VI**

---

### **DISCUSSÃO**



## 6. DISCUSSÃO

Além de despertar fascínio e de ser fonte de especulação tanto leiga quanto científica ao longo dos anos, a gemelaridade tem fornecido um caminho para o entendimento da nossa própria biologia. A Ciência e, em especial, a Genética vem utilizando este experimento biológico natural para investigar o comportamento, a fisiologia, o desenvolvimento e outras peculiaridades dos seres humanos. Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido no tocante à gemelaridade *per se*.

“Quantos gêmeos nascem?” e “Como os gêmeos nascem?” são duas questões ainda em aberto. Respondê-las não se trata meramente de resolver curiosidades científicas, mas também de uma importante questão de saúde, visto que uma gestação gemelar representa riscos adicionais à mãe e à prole (Corsello and Piro 2010; Caserta et al. 2014). Ainda, o nascimento de gêmeos é atualmente considerado o principal efeito iatrogênico relacionado RMA, o qual, juntamente com outros componentes ambientais como o atraso à maternidade, tem contribuído para o aumento contemporâneo global no número de gêmeos (muito embora este dado seja escasso em países em desenvolvimento) (Ananth and Chauhan 2012; Pison et al. 2015; Dawson et al. 2016).

Neste trabalho, investigamos os nascimentos gemelares conforme duas perspectivas principais: epidemiológica e etiológica. Do ponto de vista epidemiológico, investigamos as taxas gemelares no Brasil entre 2001 e 2014 em duas dimensões – espacial e temporal. Para os estudos etiológicos, testamos algumas variantes genéticas relacionadas à foliculogênese e a gestações de sucesso em mães de Cândido Godói, uma pequena cidade localizada no sul do Brasil e popularmente conhecida como a “Cidade dos Gêmeos”.

Epidemiologicamente, a TG é um indicador de saúde definido como o número de nascimentos gemelares por 1.000 (‰) nascimentos em uma determinada localidade. No Brasil, estudos nessa área são concentrados principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo, cujos dados são altamente discordantes (Colletto and Beiguelman 2001; Colletto 2003; Geraldo et al. 2008; Otta et al. 2016). Ao que nos consta, existe apenas um estudo que atribui uma TG para o Brasil como um todo e, embora seja muito informativo, ele não considera a diversidade territorial e sociodemográfica do Brasil, além de apresentar dados de 1996 que podem não refletir a realidade de maneira fidedigna (Smits and Monden 2011).

Nós estudamos as TGs no Brasil a partir de dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC), braço do Ministério da Saúde que cobre todo o território nacional. De acordo com nossos resultados, a TG brasileira aumentou de 8.65‰ em 2001 para 10.15‰ em 2014 e este aumento foi ainda mais acentuado em mulheres acima de 45 anos. Embora seja similar à TG antes reportada para todo o Brasil (8.8‰; Smits and Monden 2011), nós detectamos, a partir da nossa análise de séries temporais, uma tendência ascendente para o país como um todo e apenas para estados das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, além de Bahia e Paraíba. Ao introduzirmos a idade acima de 30 anos como covariável no modelo de séries temporais, detectamos uma relação positiva entre idade materna e TG para o Brasil e para todos os estados, exceto Piauí e Maranhão.

A TG brasileira encontrada neste estudo está próxima das TGs atribuídas para outros países da América do Sul e alguns países asiáticos (9,0 a 12,0‰), e é consideravelmente menor que aquelas atribuídas para países da África Central, onde são registradas as maiores incidências de gemelaridade ao redor do mundo (que atinge até 27,9 nascimentos gemelares a cada 1000 nascimentos) (Bulmer 1970; Hoekstra et al. 2007; Smits and Monden 2011). Altas taxas de nascimentos gemelares também são recentemente encontradas em países industrializados, como Estados Unidos, França, Inglaterra e Noruega, porém, nesses países a tendência de aumento é associada a dois fatores principais: maternidade atrasada e/ou RMA (Pison et al. 2015; Fellman 2016; Dawson et al. 2016).

A partir dos resultados das nossas análises espaciais, nós somos levados a acreditar que algo semelhante deve estar acontecendo no Brasil, embora de maneira heterogênea. Isto porque um claro padrão de distribuição espacial também foi detectado, com as maiores TGs concentradas na região Sudeste e Sul, e as menores localizadas nas regiões Norte e Nordeste, o que foi corroborado pela análise de Cluster and Outlier (*Anselin Local Moran's Index*). Com dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), nós concluímos que altas TGs são significativamente concentradas em municípios com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e as mais baixas TGs em municípios com um baixo IDH.

No Brasil, o alto custo associado à RMA e o acesso limitado a estes procedimentos, tanto dentro da rede de saúde pública quanto de planos privados de saúde, representam uma importante barreira econômica para o uso de tecnologias reprodutivas (Makuch and

Bahamondes 2012; Corrêa and Loyola 2015; Tavares et al. 2016). Embora o período de 14 anos seja curto, muitas mudanças econômicas e sociais ocorreram neste país, e tais mudanças afetam a vida dos brasileiros de muitas maneiras, inclusive na vida reprodutiva (Madalozzo 2012; United Nations Development Programme 2013; Tejada et al. 2017).

Assim, nós hipotetizamos que a tendência de aumento nas TGs dentro do Brasil vista principalmente em mulheres com idade mais avançada é devida a uma combinação de cinco fatores principais: 1) atraso na maternidade, que tem ocorrido principalmente entre as mulheres de alta renda (Makuch and Bahamondes 2012; Tejada et al. 2017); 2) o fato da infertilidade aumentar com a idade materna e atingir altas taxas em países em desenvolvimento (Ombelet 2009; Makuch et al. 2011); 3) o recente e desigual melhoramento no desenvolvimento humano na população brasileira (Madalozzo 2012; United Nations Development Programme 2013); 4) o aumento na disponibilidade de serviços de RMA em alguns lugares do país (Makuch and Bahamondes 2012; Anvisa 2014), e 5) fraca fiscalização dos procedimentos ligados à MAR (como o fato da transferência de não mais que dois embriões nestes procedimentos ser apenas uma recomendação, ao invés de uma lei ou de uma obrigação estrita) (Corrêa and Loyola 2015).

Para o estudo acerca da etiologia dos nascimentos gemelares, nós revisitamos as pesquisas em Cândido Godói, uma pequena cidade localizada no Noroeste do Rio Grande do Sul, no sul do Brasil. Nós desenhamos um estudo caso-controle e genotipamos sete SNPs relacionados à foliculogênese (rs6166:C>T em *FSHR*, rs11031006:G>A próximo a *FSHB*, e rs17293443:T>C in *SMAD3*) ou a uma gestação de sucesso (rs1801131:T>G e rs1801133:G>A em *MTHFR*, rs2010963:C>G em *VEGFA*, e rs1800629:G>A em *TNF*). Para cada SNP, os alelos de risco para a gemelaridade foram apontados tendo como base estudos anteriores que avaliaram a influência dos mesmos com diferentes contextos da reprodução humana (Al-Hendy et al. 2000; Hasbargen et al. 2000; Boudjenah et al. 2014; Mbarek et al. 2016; Enciso et al. 2016).

Entre casos e controles, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as distribuições alélicas e genotípicas para os sete SNPs estudados. Embora a frequência do alelo rs1800629-A em *TNF* tenha sido estatisticamente maior nos casos que na população europeia saudável de acordo com o Projeto 1.000 Genomas Fase 3 (*1,000 Genomes Project Phase 3*; Auton et al. 2015), tal diferença não foi mantida quando

a frequência nos casos foi comparada a dados mais robustos obtidos no ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) para a população europeia não-finlandesa (Lek et al. 2016).

O alelo rs1800629-A em *TNF* já foi associado com alta taxa de implantação e gestações múltiplas após fertilização *in vitro* em mulheres sem algum fator conhecido de fertilidade (Vialard et al. 2013). Além disso, Boudjenah et al. (2014), em uma amostra dentro do contexto de RMA, identificaram uma associação entre gestações múltiplas e rs1800629:G>A em *TNF* e rs2010963:G>C em *VEGF* (sozinhos ou em combinação), mas nossos resultados não confirmam o envolvimento de ambos os polimorfismos com os nascimentos gemelares em CG.

Os outros dois SNPs possivelmente associados a uma gravidez de sucesso (rs1801131:T>G e rs1801133:G>A em *MTHFR*) também não foram estatisticamente associados à gemelaridade neste estudo, muito embora tanto o alelo quanto o haplótipo de risco tenham sido majoritariamente representado no grupo de casos quando comparado aos controles. Embora ambos os polimorfismos diminuam a atividade catalítica de *MTHFR* e resultem em níveis mais baixos de ácido fólico circulante, a associação de ambos com os nascimentos gemelares permanece controversa (Hasbargen et al. 2000; Haggarty et al. 2006; Montgomery et al. 2014; Thaler 2014; Enciso et al. 2016). Ao contrário do encontrado por Hasbargen et al. (2000) e Enciso et al. (2016), este resultado está de acordo com o relatado por Montgomery et al. (2001), o qual estudou ambos os polimorfismos em mães de gêmeos DZ e não encontrou nenhuma associação entre os genótipos em *MTHFR* e a gemelaridade. Para além dos genótipos, a associação entre os níveis de ácido fólico materno e os nascimentos gemelares foi questionada devido a possíveis fatores de confusão e a questão permanece matéria de debate (Vollset et al. 2005; Muggli and Halliday 2007).

Além disso, nossos resultados não fornecem suporte para uma associação entre os SNPs relacionados à foliculogênese com a gemelaridade (total ou apenas DZ) em CG. Em consonância, outros estudos também não têm replicado essa hipótese (Liao et al. 2001; Montgomery et al. 2001; Derom et al. 2006). Muito embora a rota do FSH seja uma via classicamente relacionada à gemelaridade DZ humana (Lambalk 2001; Hoekstra et al. 2007), é importante considerar que o nascimento de gêmeos é um fenótipo complexo e não é razoável considerar que exista apenas uma via pela qual este fenômeno ocorre em nossa espécie.

Este estudo possuiu algumas limitações. Por exemplo, seria interessante avaliar dosagens de FSH, reserva ovariana e/ou os níveis de ácido fólico em nossa amostra. Todavia, este é um estudo de base populacional e muitas participantes já não se encontravam em sua idade reprodutiva e, assim, nós consideramos que este dado no momento presente não seria muito informativo. Além disso, o tamanho amostral pode ter sido outra limitação, principalmente no que tange a variantes de pequeno efeito, mas os casos amostrados neste estudo representam 40% de todas as mães de gêmeos nascidos em CG após 1995.

Em conclusão, este estudo sugere uma ausência de associação entre os nascimentos gemelares em CG e sete SNPs relacionados à foliculogênese e a gestações de sucesso. Finalmente, é importante considerar que CG tem uma história de fundação muito particular e é possível que outras variantes genéticas ligadas a ambos os processos relacionados à reprodução ajudem a explicar a alta TG encontrada na região.

## **CAPÍTULO VII**

---

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na primeira parte deste trabalho, nós retratamos um desenho detalhado sobre a epidemiologia dos nascimentos gemelares no Brasil e encontramos que a TG brasileira se distribuiu de maneira heterogênea ao longo do país, com alta incidência e tendência ascendente em regiões com um alto IDH. Altas taxas de nascimentos gemelares foram encontradas principalmente em mulheres com idade mais avançada. Em conjunto, este cenário pode ser explicado por uma cadeia de fatores que iniciam no atraso da maternidade, passam pela desigualdade no acesso à RMA e terminam na fraca legislação no tocante às tecnologias reprodutivas. Nossos resultados podem fomentar o atual debate sobre a democratização do acesso à RMA no Brasil, e acreditamos que nossa abordagem de utilizar o IDH como “proxy” para RMA pode ser utilizado em demais países com características sociodemográficas semelhantes às do Brasil.

Ainda utilizando o próprio SINASC, pretendemos aplicar uma metodologia semelhante à utilizada neste trabalho para elucidar diferenças sociais e epidemiológicas relacionadas aos nascimentos gemelares, utilizando variáveis como Cor/raça do RN, Apgar, Peso e Anomalia congênita. Além disso, podemos utilizar outro banco de dados público, o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), para traçar um perfil epidemiológico no Brasil sobre as causas de morte em gêmeos *versus* em únicos.

Na segunda parte deste trabalho, nós focamos na etiologia da gemelaridade, estudando alguns SNPs relacionados à foliculogênese ou a uma gestação de sucesso na população de CG, a “Cidade dos Gêmeos”. As variantes foram escolhidas a partir de estudos hipótese-dependente ou de varredura genômica e nossos resultados sugerem uma ausência de associação entre as sete variantes genéticas e o fenótipo de estudo. Pesquisas adicionais sobre o papel destas variantes no contexto reprodutivo, bem como a sua investigação em demais populações com características similares a CG podem ajudar a elucidar a etiologia dos nascimentos gemelares na espécie humana.

## CAPÍTULO VIII

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisien AO, Olarewaju RS and Imade GE Twins in Jos Nigeria: a seven-year retrospective study. *Med Sci Monit* 6:945–50.
- Al-Hendy A, Moshynska O, Saxena A and Feyles V (2000) Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* (London, England) 356:914.
- Ananth C V. and Chauhan SP (2012) Epidemiology of Twinning in Developed Countries. *Semin Perinatol* 36:156–161.
- Anvisa (2014) SisEmbrio - 7º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões. Brasília.
- Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, Donnelly P, Eichler EE et al. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526:68–74. doi: 10.1038/nature15393
- Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PGA and Lambalk CB (2006) The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod* 21:1531–2. doi: 10.1093/humrep/del009
- Benirschke K (2013) Monozygotic Twinning. *Surg Pathol Clin* 6:27–32. doi: 10.1016/j.path.2012.11.006
- Bernard DJ, Fortin J, Wang Y and Lamba P (2010) Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril* 93:2465–85. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.034
- Boothroyd C (2016) Twinning: Double, double, toil and trouble? *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 56:445–446. doi: 10.1111/ajo.12526
- Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Boitrelle F, Taieb S, Dos Santos E, Wainer R, de Mazancourt P, Selva J and Vialard F (2014) Associations between Individual and Combined Polymorphisms of the TNF and VEGF Genes and the Embryo Implantation Rate in Patients Undergoing In Vitro Fertilization (IVF) Programs. *PLoS One* 9:e108287. doi: 10.1371/journal.pone.0108287
- Bulmer MG (1970) *The Biology of the Twinning in Man*. Oxford Clarendon Press Oxford, Oxford, UK
- Burt SA and Klump KL (2012) How does the inclusion of twins conceived via fertility treatments influence the results of twin studies? *Twin Res Hum Genet* 15:746–52. doi: 10.1017/thg.2012.53
- Busjahn A, Knoblauch H, Faulhaber HD, Aydin A, Uhlmann R, Tuomilehto J, Kaprio J, Jedrusik P, Januszewicz A, Strelau J et al. (2000) A region on chromosome 3 is linked to dizygotic twinning. *Nat Genet* 26:398–9. doi: 10.1038/82515
- Caserta D, Bordi G, Stegagno M, Filippini F, Podagrosi M, Roselli D and Moscarini M (2014) Maternal and perinatal outcomes in spontaneous versus assisted conception twin pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 174:64–69. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.12.011
- Chaouat G, Dubanchet S and Ledée N (2007) Cytokines: Important for implantation? *J Assist Reprod Genet* 24:491–505. doi: 10.1007/s10815-007-9142-9
- Colletto GMDD (2003) Twinning rate trend in a population sample from the city of São Paulo, Brazil. *Genet Mol Biol* 26:245–248. doi: 10.1590/S1415-47572003000300005
- Colletto SCAM and Beiguelman B (2001) Twinning rate in a sample from a Brazilian hospital with a high standard of reproductive care. *Sao Paulo Med J* 119:216–219. doi: 10.1590/S1516-31802001000600007

- Corrêa MCD V. and Loyola MA (2015) Tecnologias de reprodução assistida no Brasil: opções para ampliar o acesso. *Physis Rev Saúde Coletiva* 25:753–777. doi: 10.1590/S0103-73312015000300005
- Corsello G and Piro E (2010) The world of twins: an update. *J Matern Neonatal Med* 23:59–62. doi: 10.3109/14767058.2010.508218
- Dawson AL, Tinker SC, Jamieson DJ, Hobbs CA, Berry RJ, Rasmussen SA, Anderka M, Keppler-Noreuil KM, Lin AE and Reefhuis J (2016) Twinning and major birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997–2007. *J Epidemiol Community Health* 70:1114–1121. doi: 10.1136/jech-2015-206302
- De Oliveira MZ, Schüler-Faccini L, Demarchi DA, Alfaro EL, Dipierri JE, Veronez MR, Colling Cassel M, Tagliani-Ribeiro A, Silveira Matte U and Ramallo V (2013) So Close, So Far Away: Analysis of Surnames in a Town of Twins (Cândido Godói, Brazil). *Ann Hum Genet* 77:125–136. doi: 10.1111/ahg.12001
- Delbaere I, Verstraelen H, Goetgeluk S, Martens G, Derom C, De Bacquer D, De Backer G and Temmerman M (2008) Perinatal outcome of twin pregnancies in women of advanced age. *Hum Reprod* 23:2145–2150. doi: 10.1093/humrep/den134
- Derom C, Gielen M, Peeters H, Frijns J-P and Zeegers MPA (2011) Time trends in the natural dizygotic twinning rate. *Hum Reprod* 26:2247–52. doi: 10.1093/humrep/der180
- Derom C, Groenen P and Vlietinck R (2001) Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet* 357:230–231. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71330-1
- Derom C, Jawaheer D, Chen W V, McBride KL, Xiao X, Amos C, Gregersen PK and Vlietinck R (2006) Genome-wide linkage scan for spontaneous DZ twinning. *Eur J Hum Genet* 14:117–122. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201522
- Einstein A and Infeld L (1938) *The Evolution of Physics*. Cambridge University Press, London, p 319
- Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, Bristow S, Bowles M, Fragouli E, Delhanty J and Wells D (2016) Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Hum Genet* 135:555–568. doi: 10.1007/s00439-016-1652-z
- Fellman J (2016) Temporal and Spatial Variations in the Twinning Rate in Norway. *Twin Res Hum Genet* 19:359–366. doi: 10.1017/thg.2016.49
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL and Guéant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13:225–238. doi: 10.1093/humupd/dml063
- Geraldo CF, Garcia G de L and Roth M da GM (2008) Prevalência de nascimentos gemelares em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil Prevalence of twin births in Pelotas, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Saúde Matern Infant, Recife* 8:411–417.
- Gromoll J and Simoni M (2001) Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet* 357:230. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71328-3
- Haggarty P, McCallum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, Templeton A, Haites N, Campbell D and Bhattacharya S (2006) Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 367:1513–1519. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68651-0
- Hall JG (2003) Twinning. *Lancet* 362:735–743. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14237-7
- Hamamy HA, Ajlouni HK and Ajlouni KM (2004) Familial monozygotic twinning: report of an extended multi-generation family. *Twin Res* 7:219–22.

- Hankins GVD and Saade GR (2005) Factors influencing twins and zygosity. *Paediatr Perinat Epidemiol* 19:8–9. doi: 10.1111/j.1365-3016.2005.00609.x
- Hasbargen U, Lohse P and Thaler CJ (2000) The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C->T mutation. *Hum Reprod* 15:2659–62.
- Helle S (2008) Why twin pregnancies are more successful at advanced than young maternal age? A potential role of “terminal reproductive investment”. *Hum Reprod* 23:2387–9. doi: 10.1093/humrep/den305
- Herranz G (2015) The timing of monozygotic twinning: a criticism of the common model. *Zygote* 23:27–40. doi: 10.1017/S0967199413000257
- Hoekstra C, Willemsen G, van Beijsterveldt TCEM, Montgomery GW and Boomsma DI (2008) Familial twinning and fertility in Dutch mothers of twins. *Am J Med Genet Part A* 146A:3147–3156. doi: 10.1002/ajmg.a.32585
- Hoekstra C, Zhao ZZ, Lambalk CB, Willemsen G, Martin NG, Boomsma DI and Montgomery GW (2007) Dizygotic twinning. *Hum Reprod Update* 14:37–47. doi: 10.1093/humupd/dmm036
- Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R and Hompes PG (2004) Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 9:692–715. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61781-6
- Huang H, Clancy KBH, Burhance C, Zhu Y and Madrigal L (2015) Women who deliver twins are more likely to smoke and have high frequencies of specific SNPs: Results from a sample of African-American women who delivered preterm, low birth weight babies. *Am J Hum Biol* 27:605–12. doi: 10.1002/ajhb.22723
- IBGE IB de G e E (2010) Censo Demográfico 2010. In: Rio Janeiro. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/>. Accessed 14 Apr 2017
- Lambalk CB (2001) Is there a role for follicle-stimulating-hormone receptor in familial dizygotic twinning? *Lancet* 357:735–736. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04178-7
- Lambalk CB, Boomsma DI, De Boer L, De Koning CH, Schoute E, Popp-Snijders C and Schoemaker J (1998) Increased levels and pulsatility of follicle-stimulating hormone in mothers of hereditary dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 83:481–6. doi: 10.1210/jcem.83.2.4552
- Laskov I, Michaan N, Cohen A, Tsafir Z, Maslovitz S, Kupferminc M, Lessing J and Many A (2013) Outcome of Twin pregnancy in women  $\geq 45$  years old: a retrospective cohort study. *J Matern Neonatal Med* 26:669–672. doi: 10.3109/14767058.2012.746298
- Lavery D (1995) *Full of secrets: critical approaches to Twin Peaks*. Wayne State University Press
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, O’Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB et al. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536:285–291. doi: 10.1038/nature19057
- Liao WX, Roy AC and Ng SC (2001) Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet* 357:230. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71329-5
- Madalozzo R (2012) Transitions in Fertility for Brazilian Women: An Analysis of Impact Factors. *PLoS One* 7:e40756. doi: 10.1371/journal.pone.0040756
- Makuch MY and Bahamondes L (2012) Barriers to access to infertility care and assisted reproductive technology within the public health sector in Brazil. *Facts, views Vis ObGyn* 4:221–6.

- Makuch MY, Padua KS, Petta CA, Osis MJD and Bahamondes L (2011) Inequitable access to assisted reproductive technology for the low-income Brazilian population: a qualitative study. *Hum Reprod* 26:2054–60. doi: 10.1093/humrep/der158
- Matte U, Le Roux MG, Bénichou B, Moisan JP and Giugliani R (1996) Study on possible increase in twinning rate at a small village in south Brazil. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 45:431–7.
- Mbarek H, Steinberg S, Nyholt DR, Gordon SD, Miller MB, McRae AF, Hottenga JJ, Day FR, Willemsen G, de Geus EJ et al. (2016) Identification of Common Genetic Variants Influencing Spontaneous Dizygotic Twinning and Female Fertility. *Am J Hum Genet* 98:898–908. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.03.008
- McNamara HC, Kane SC, Craig JM, Short R V and Umstad MP (2016) A review of the mechanisms and evidence for typical and atypical twinning. *Am J Obstet Gynecol* 214:172–191. doi: 10.1016/j.ajog.2015.10.930
- Montgomery GW, Duffy DL, Hall J, Kudo M, Martin NG and Hsueh AJ (2001) Mutations in the follicle-stimulating hormone receptor and familial dizygotic twinning. *Lancet* 357:773–774. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04164-7
- Montgomery GW, Zondervan KT and Nyholt DR (2014) The future for genetic studies in reproduction. *Mol Hum Reprod* 20:1–14. doi: 10.1093/molehr/gat058
- Morales-Suárez-Varela MM, Bech BH, Christensen K and Olsen J (2007) Coffee and smoking as risk factors of twin pregnancies: the Danish National Birth Cohort. *Twin Res Hum Genet* 10:597–603. doi: 10.1375/twin.10.4.597
- Muggli EE and Halliday JL (2007) Folic acid and risk of twinning: a systematic review of the recent literature, July 1994 to July 2006. *Med J Aust* 186:243–8.
- Nakasuji T, Saito H, Araki R, Nakaza A, Nakashima A, Kuwahara A, Ishihara O, Irahara M, Kubota T, Yoshimura Y et al. (2014) The incidence of monozygotic twinning in assisted reproductive technology: analysis based on results from the 2010 Japanese ART national registry. *J Assist Reprod Genet* 31:803–7. doi: 10.1007/s10815-014-0225-0
- Nylander PP (1969) The frequency of twinning in a rural community in Western Nigeria. *Ann Hum Genet* 33:41–4.
- Ombelet W (2009) Reproductive healthcare systems should include accessible infertility diagnosis and treatment: An important challenge for resource-poor countries. *Int J Gynecol Obstet* 106:168–171. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.03.033
- Otta E, Fernandes E de S, Acquaviva TG, Lucci TK, Kiehl LC, Varella MAC, Segal NL and Valentova J V. (2016) Twinning and Multiple Birth Rates According to Maternal Age in the City of São Paulo, Brazil: 2003–2014. *Twin Res Hum Genet* 19:679–686. doi: 10.1017/thg.2016.75
- Painter JN, Willemsen G, Nyholt D, Hoekstra C, Duffy DL, Henders AK, Wallace L, Healey S, Cannon-Albright LA, Skolnick M et al. (2010) A genome wide linkage scan for dizygotic twinning in 525 families of mothers of dizygotic twins. *Hum Reprod* 25:1569–80. doi: 10.1093/humrep/deq084
- Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL and Montgomery GW (2006) Novel Variants in Growth Differentiation Factor 9 in Mothers of Dizygotic Twins. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4713–4716. doi: 10.1210/jc.2006-0970
- Parazzini F, Cipriani S, Bianchi S, Bulfoni C, Bortolus R and Somigliana E (2016) Risk of Monozygotic Twins After Assisted Reproduction: A Population-Based Approach. *Twin Res Hum Genet* 19:72–6. doi: 10.1017/thg.2015.96

- Pison G, Monden C and Smits J (2015) Twinning Rates in Developed Countries: Trends and Explanations. *Popul Dev Rev* 41:629–649. doi: 10.1111/j.1728-4457.2015.00088.x
- Poniewozik J (2007) The 100 Best TV Shows of All-TIME. In: *Time*. <http://time.com/3103860/twin-peaks/>. Accessed 22 Feb 2018
- Sahab Khan P and Skandhan KP (2011) Kodinji village puzzles medical science. *J Obstet Gynaecol Res* 37:375–6. doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01455.x
- Shur N (2009) The genetics of twinning: from splitting eggs to breaking paradigms. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:105–9. doi: 10.1002/ajmg.c.30204
- Simoni M and Casarini L (2014) Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol* 170:R91-107. doi: 10.1530/EJE-13-0624
- Sirugo G, Edwards DRV, Ryckman KK, Bisseye C, White MJ, Kebbeh B, Morris GAJ, Adegbola RA, Tacconelli A, Predazzi IM et al. (2012) PTX3 genetic variation and dizygotic twinning in the Gambia: could pleiotropy with innate immunity explain common dizygotic twinning in Africa? *Ann Hum Genet* 76:454–63. doi: 10.1111/j.1469-1809.2012.00723.x
- Smits J and Monden C (2011) Twinning across the Developing World. *PLoS One* 6:e25239. doi: 10.1371/journal.pone.0025239
- Sobek A, Prochazka M, Klaskova E, Lubusky M and Pilka R (2016) High incidence of monozygotic twinning in infertility treatment. *Biomed Pap*. doi: 10.5507/bp.2016.016
- Steinman G (2006) Can the chance of having twins be modified by diet? *Lancet* (London, England) 367:1461–2. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68623-6
- Steinman G (2009) Why the twinning rate is higher in Africa than elsewhere: an analysis of selected factors. *J Reprod Med* 54:609–16.
- Sunde J, Boric M, Urlic N and Urlic L (2013) COMPARISON OF TWINNING RATES FOR VILLAGES IN MAKARSKA REGION, CROATIA. *J Biosoc Sci* 45:841–852. doi: 10.1017/S0021932013000011
- Tagliani-Ribeiro A (2011) Análise genética e epidemiológica na cidade de Cândido Godói - RS, a “Terra dos Gêmeos.” Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Tagliani-Ribeiro A, Oliveira M, Sassi AK, Rodrigues MR, Zagonel-Oliveira M, Steinman G, Matte U, Fagundes NJR and Schuler-Faccini L (2011) Twin Town in South Brazil: A Nazi’s Experiment or a Genetic Founder Effect? *PLoS One* 6:e20328. doi: 10.1371/journal.pone.0020328
- Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJR, Schuler-Faccini L et al. (2012) High twinning rate in Cândido Godói: a new role for p53 in human fertility. *Hum Reprod* 27:2866–71. doi: 10.1093/humrep/des217
- Tavares R, Cunha G, Aguiar L, Duarte SC, Cardinot N, Bastos E and Coelho F (2016) Socioeconomic profile of couples seeking the public healthcare system (SUS) for infertility treatment. *JBRA Assist Reprod* 20:112–7. doi: 10.5935/1518-0557.20160026
- Tejada CAO, Triaca LM, da Costa FK and Hellwig F (2017) The sociodemographic, behavioral, reproductive, and health factors associated with fertility in Brazil. *PLoS One* 12:e0171888. doi: 10.1371/journal.pone.0171888
- Thaler C (2014) Folate Metabolism and Human Reproduction. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 74:845–851. doi: 10.1055/s-0034-1383058
- United Nations Development Programme (2013) O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal Brasileiro. Brasília

- Van der Stroom EMC, König TE, Vink JM, Boomsma DI and Lambalk CB (2013) Ovarian reserve and anti-Mullerian hormone (AMH) in mothers of dizygotic twins. *Twin Res Hum Genet* 16:634–8. doi: 10.1017/thg.2013.4
- Vialard F, El Sirkasi M, Tronchon V, Boudjenah R, Molina-Gomes D, Bergere M, Mauduit C, Wainer R, Selva J and Benahmed M (2013) Tumor necrosis factor-308 polymorphism increases the embryo implantation rate in women undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod* 28:2774–83. doi: 10.1093/humrep/det264
- Vollset SE, Gjessing HK, Tandberg A, Rønning T, Irgens LM, Baste V, Nilsen RM and Daltveit AK (2005) Folate supplementation and twin pregnancies. *Epidemiology* 16:201–5.

## **CAPÍTULO IX**

---

Anexo

**9. ARTIGO ANEXO – *Lack of Association between Genetic Polymorphisms in IGF1 and IGFBP3 with Twin Births in a Brazilian Population (Cândido Godói, Rio Grande do Sul)***

Artigo aceito para publicação na revista *Genetics and Molecular Biology*

Neste trabalho, nós hipotetizamos que o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), que é classicamente envolvido na reprodução e desenvolvimento de mamíferos, pode estar associado aos nascimentos gemelares em CG. Assim, nós investigamos dois polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo do IGF-1 (*IGF1* (CA)<sub>n</sub> and *IGFBP3* rs2854744) em 39 mães de gêmeos e 214 mães de não-gêmeos (97 delas morando em CG e 117 morando em Porto Alegre). Nós não identificamos diferenças estatisticamente significativas entre ambos os polimorfismos e os nascimentos gemelares em CG. As limitações foram as mesmas deste presente trabalho.