

# **O ESTUDO DE GÊMEOS**

**Bernardo Beiguelman**

**Professor Titular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Aposentado)**

**Professor Visitante do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

**Pesquisador 1-A do CNPq**

**Este livro é dedicado à memória do  
Dr. Luciano Heitor Beiguelman,  
meu amado filho.**

### **Agradecimentos**

**Para a preparação deste livro recebi o apoio irrestrito dos Professores Henrique Krieger e Erney Plessmann de Camargo, que me proporcionaram um ambiente de grande estímulo intelectual na Unidade de Epidemiologia Genética do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Sua edição eletrônica não teria sido possível sem a colaboração técnica despreendida e generosa do Sr. Cassiano Pereira Nunes, da Dra. Rubiani de Cassia Pagotto e do Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira .**

# ÍNDICE

## INTRODUÇÃO

### CAPÍTULO 1. BIOLOGIA DA GEMELARIDADE

- Ovogênese e ovulação
- A fecundação do ovócito
- A formação do embrião
- A formação de gêmeos
- A formação de teratópagos
- Gêmeos monozigóticos discordantes quanto ao sexo
- Superfecundação heteropaternal
- A razão de sexo dos gêmeos
- Fatores que influenciam o nascimento de gêmeos
- O quimerismo nos gêmeos dizigóticos
- Duração da gestação
- Peso e estatura ao nascer
- Índice de Apgar
- Mortalidade perinatal

### CAPÍTULO 2. O DIAGNÓSTICO DA ZIGOSIDADE

- Emprego de caracteres monogênicos
  - O genótipo dos gêmeos e de seus pais é conhecido
  - O genótipo dos pais é conhecido, mas não o dos gêmeos
  - Somente se conhece o fenótipo dos pais e dos gêmeos
  - Não se conhece o genótipo ou o fenótipo dos genitores dos gêmeos
- Impressões dígito-palmares e diagnóstico da zigosidade
- O método diferencial de Weinberg
- A organização de um cadastro de gêmeos

### CAPÍTULO 3. O ESTUDO DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM GÊMEOS

- O coeficiente de correlação intraclasse
- A comparação de caracteres quantitativos em gêmeos
- A investigação da herdabilidade de caracteres quantitativos em gêmeos

### CAPÍTULO 4. O ESTUDO DE CARACTERES QUALITATIVOS EM GÊMEOS

## INTRODUÇÃO

Vinte e cinco anos antes da redescoberta dos trabalhos do pai da Genética (Gregor Johann Mendel, 1822-1884), Francis Galton (1822-1911), que lançou as bases da Biometria, já participara à *Anthropological Society of London* que os gêmeos podem ser estudados com a finalidade de avaliar a contribuição do que ele chamou de *natura* e *nurtura* na determinação dos caracteres quantitativos (Galton, 1876). Esse binômio passou, mais tarde, a ser designado por *genótipo* e *ambiente*, mas o princípio lógico estabelecido por Galton para o estudo de gêmeos com a finalidade de investigar a participação do genótipo na variação fenotípica permaneceu, basicamente, o mesmo.

De acordo com esse princípio, os fatores do ambiente que afetam as diferenças intrapar dos gêmeos monozigóticos, oriundos de um único zigoto, seriam comparáveis aos que afetam as diferenças intrapar dos gêmeos dizigóticos, os quais, do mesmo modo que os pares de irmãos nascidos sucessivamente, são oriundos de dois zigotos. Ainda de acordo com ele, o valor das diferenças intrapar nos dois tipos de gêmeos poderiam servir para estimar a importância relativa do genótipo e do ambiente na determinação dos caracteres.

A partir do trabalho inicial de Galton, o estudo de gêmeos cresceu muito e passou a constituir uma especialidade, geralmente denominada **Gemelologia** (do latim, *gemellus* = gêmeo; *logus* = estudo). Ela é, também, chamada de Didimologia por alguns autores de língua inglesa, mas esse termo tem pouca adesão, talvez porque, em grego, *dídimos* é usado, indiferentemente, com o significado de gêmeos e de testículos.

Até o presente, o objetivo da maior parte dos trabalhos de pesquisa a respeito de gêmeos continua sendo o estabelecido por Galton. Menor número de pesquisadores dedicaram-se ao estudo da própria natureza dos nascimentos gemelares, isto é, à biologia da gemelaridade, trazendo, desse modo, contribuições importantes inclusive para a compreensão da biologia da reprodução humana. Nas páginas seguintes procurar-se-á abordar esses dois campos de estudo dos gêmeos.

# CAPÍTULO 1. BIOLOGIA DA GEMELARIDADE

## OVOGÊNESE E OVULAÇÃO

A gametogênese feminina, isto é, a ovogênese, é muito precoce na espécie humana, quando comparada à época de início da gametogênese masculina, pois ela se dá no período fetal, enquanto a espermatogênese somente se inicia na puberdade. Assim, por volta do sétimo mês de gestação, as células sexuais femininas estão no final da prófase I do processo meiótico, isto é, são todas *ovócitos de primeira ordem* (Ohno *et al.*, 1962). Cada um dos ovócitos se apresenta rodeado por *células foliculares*, as quais produzem um polipeptídeo de baixo peso molecular, que tem a capacidade de inibir a meiose (Tsafiriri *et al.*, 1976).

É por isso que se os ovócitos de primeira ordem não estiverem rodeados completamente por células foliculares, eles não sofrerão a inibição da meiose, terminarão a prófase I e alcançarão a metáfase I. Isso, entretanto, os levará à degenerescência, em decorrência da prematuridade desse processo (Jirásek, 1976). A continuação da meiose na ovogênese, isto é, a *maturação do ovócito*, somente terá condições de ocorrer em ovócitos de folículos ovarianos maduros, pouco tempo antes de eles sofrerem ruptura. Tais folículos são denominados *folículos de Graaf*, em homenagem ao médico holandês Regnier de Graaf (1641-1673), que os descreveu pela primeira vez em 1672, pensando que eles eram os óvulos. Foi somente em 1827 que, graças à sua miopia, Karl Ernst von Baer (1792-1876), um naturalista estoniano, conseguiu visualizar, a olho nu, o ovócito dentro do folículo, onde ele é encontrado rodeado por células foliculares, as quais constituem a chamada *corona radiata*. Essas células também costumam ser designadas por células do *cumulus*, por fazerem parte do *cumulus oophorus* que é a estrutura que mantém o ovócito no interior do folículo ovariano (Fig.1.1).

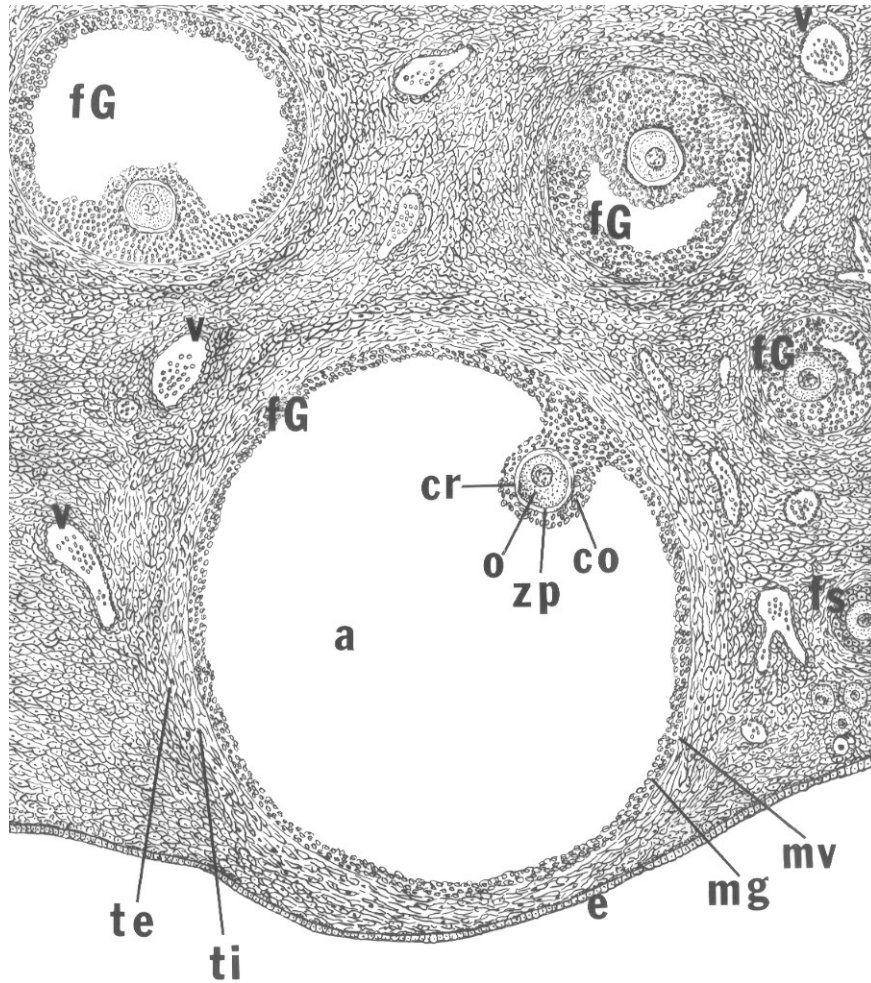


Fig. 1.1 Secção histológica de um ovário humano. (Desenho esquemático adaptado de Huettner, 1957).

*a*-antro; *co*-cumulus oophorus; *cr*-corona radiata; *e*-epitélio; *fG*-folículo de Graaf; *fs*-folículo secundário; *mg*-membrana granulosa; *mv*-membrana vítrea; *o*-ovócito de primeira ordem; *te*-teca externa; *ti*-teca interna; *v* = vaso sanguíneo; *zp*-zona pelúcida.

Durante o intervalo entre o término de uma menstruação e o início de outra (*ciclo menstrual*) é normal que somente um dos folículos de Graaf de um dos ovários atinja grau de maturidade maior do que os outros. O ovócito de primeira ordem desse folículo passa, então à fase de maturação, isto é, termina a prófase I, passando, sucessivamente, pela metáfase I, anáfase I e telófase I. Por estar com o núcleo muito deslocado para a periferia, tem-se que, durante a telófase I, o citoplasma do ovócito de primeira ordem divide-se desigualmente, com a geração de duas células de tamanho bem diferente, o *ovócito de*

*segunda ordem*, com tamanho semelhante à célula original (cerca de 0,14 mm), e uma célula pequena, a ele aderida (*primeiro polócito* ou *primeiro corpúsculo polar*).

O ovócito de segunda ordem se apresenta envolvido por uma camada extracelular, denominada *zona pelúcida* (do latim, *pellucida* = transparente), a qual inclui três glicoproteínas importantes, designadas por ZP1, ZP2 e ZP3 (Rankin e Dean, 2000).. Durante o crescimento folicular, a zona pelúcida, que é uma barreira para impedir a entrada de espermatozóides de um animal de outra espécie (Rudak *et al.*, 1978), é atravessada por finas projeções emanadas das células do *cumulus*. Esse complexo *cumulus*-ovócito serve de comunicação entre o ovócito e o *cumulus oophorus*, para a passagem de íons e pequenas moléculas (Gilula *et al.*, 1978).

O ovócito de segunda ordem inicia, então, a meiose II, enquanto se rompe o folículo de Graaf maduro que o contém, sendo esse ovócito em metáfase II, juntamente com o primeiro polócito e a *corona radiata*, expelido para o pavilhão de uma das trompas uterinas. Essas trompas também são chamadas de *trompas de Falópio*, em homenagem a Gabriele Fallopio (1523-1562), anatomista e cirurgião italiano, que foi o primeiro a descrever os ovidutos humanos. Esse fenômeno da expulsão do óvulo para uma das trompas, denominado *ovulação*, tem a duração de alguns minutos e não decorre de um aumento da pressão hidrostática dentro do folículo, mas da ação de enzimas proteolíticas, que fluem do antro para as tecas do folículo (Channing e Tsafiriri, 1977).

A supressão da ação do inibidor meiótico produzido pelas células foliculares está associada à regulação hormonal do ciclo menstrual. Ao ter início um novo ciclo menstrual, isto é, logo depois que termina uma menstruação, aumenta o nível de *hormônio folículo-estimulante* (FSH) produzido pela hipófise. Em resposta ao FSH, um grupo de folículos de Graaf intensifica seu crescimento e aumenta, gradativamente, a produção de *estrógenos*. Antes da ovulação, porém, o aumento da produção de estrógenos deixa de ser gradativo, para atingir um pico.

Por existir um mecanismo de retroalimentação negativo entre os níveis de estrógeno e o FSH, tem-se que, à medida que aumenta o nível de estrógenos diminui o nível de FSH. Um outro hormônio produzido pela hipófise, o *hormônio luteinizante* (LH) tem, ao contrário do FSH, uma retroalimentação positiva com os estrógenos, de modo que, à medida que aumenta o nível de estrógenos também aumenta o nível de LH e é o aumento

acentuado do nível de LH durante o período pré-ovulatório que elimina o estímulo inibitório da meiose, por determinar a ruptura do complexo ovócito-*cumulus* e diminuir no ovócito a concentração do fosfato de adenosina, também chamado de ácido 5- adenílico ou AMP cíclico (Shoham *et al.*, 1993). Se, entretanto, o ovócito for retirado do folículo, juntamente com o *cumulus oophorus*, a sua maturação ocorrerá, apesar da ausência de LH, porque o processo inibitório da meiose cessa quando o ovócito está fora do ambiente folicular (Gómez *et al.*, 1993).

### **A FECUNDAÇÃO DO OVÓCITO**

Se o ovócito de segunda ordem, liberado para o pavilhão de uma das trompas, não for fecundado, ele degenerará, juntamente com o primeiro polócito (Whittingham, 1979). Durante muito tempo acreditou-se que o ovócito permanecia fecundável por um período de apenas 10 a 12 horas, após as quais perdia essa capacidade. Entretanto, as técnicas de fertilização *in vitro* permitiram constatar que os ovócitos podem ser mantidos por até 36 horas sem perder a capacidade de serem fecundados (Dandekar *et al.*, 1991).

No caso de ocorrer a fecundação, a penetração do espermatozóide no ovócito se dará enquanto ele está na trompa. Em todos os mamíferos estudados são bem poucos os espermatozóides que, em condições naturais, estão próximos ao ovócito no momento da fertilização *in vivo* (Yanagimachi, 1994). Por isso, não é mais aceita a explicação de que, para os espermatozóides atravessarem a *corona radiata*, seria necessário um número elevado deles, a fim haver grande liberação de enzimas proteolíticas, que propiciariam o afastamento das células que rodeiam o ovócito. O que se sabe, ao certo, é que os espermatozóides devem estar íntegros e *capacitados* para atravessar os espaços intercelulares da *corona radiata*, a fim de que um deles consiga penetrar no ovócito de segunda ordem.

Até o presente não se conhecem as bases moleculares da capacitação dos espermatozóides, isto é, das alterações funcionais que os tornam candidatos a fecundar um ovócito. Sabe-se, entretanto, que ela resulta da remoção ou da alteração de proteínas que revestem os espermatozóides, e que são oriundas do epidídimo e do fluido seminal. A capacitação dos espermatozóides, que tem como principal consequência o aumento da sua motilidade, ocorre naturalmente no interior dos dutos femininos, por influência do muco



ovócito. O núcleo do espermatozóide aumenta de volume, passando a ser denominado *pronúcleo masculino* e seus cromossomos se duplicam, cada qual formando duas cromátides. O núcleo do ovócito, por sua vez, que está deslocado para a periferia, completa a meiose II. Essa localização assimétrica faz com que da meiose II resulte um *óvulo* e uma célula com pouco citoplasma, que fica entre a zona pelúcida e o óvulo, a qual é denominada *segundo polócito* ou *segundo corpúsculo polar*, porque o primeiro polócito é resultado da meiose I. (Fig.3.1). O núcleo do óvulo passa, então, a ser denominado pronúcleo feminino.

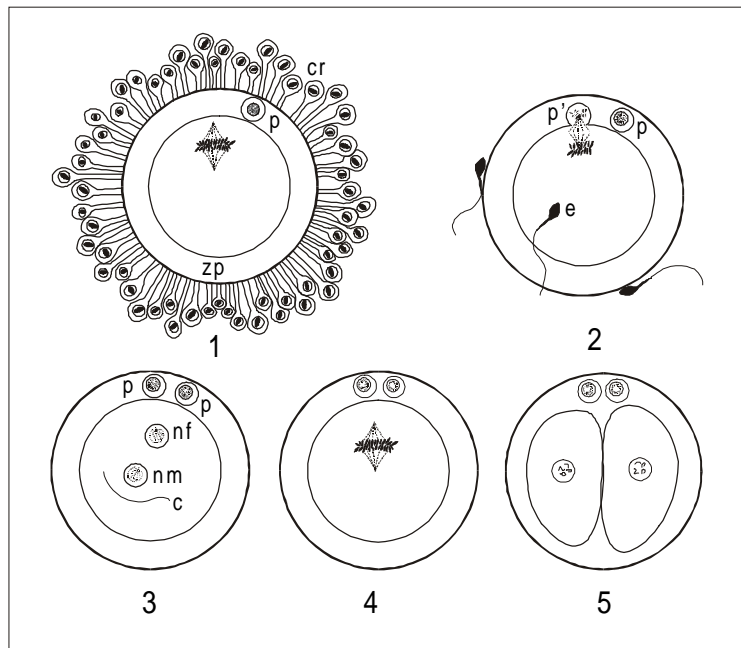


Fig.3.1 A fecundação do ovócito na espécie humana.

1. ovócito de segunda ordem em metáfase II, no momento em que é expelido do folículo, com primeiro polócito (*p*), zona pelúcida (*zp*) e rodeado de células foliculares da *corona radiata* (*cr*), que desaparecem uma dois dias depois da ovulação; 2. entrada de um espermatozóide (*e*) no ovócito de segunda ordem e formação do segundo polócito (*p'*); 3. óvulo com o pronúcleo feminino (*nf*), o pronúcleo masculino (*nm*) e a cauda do espermatozóide (*c*) em seu citoplasma; 4. zigoto em metáfase; 5. os dois primeiros blastômeros.

A *singamia*, isto é, a união do material dos pronúcleos masculinos se faz pela migração desses núcleos para o centro do óvulo e, no caso da espécie humana, pela dissolução das membranas nucleares, sem que elas formem lóbulos e os pronúcleos se interpenetrem, como em outras espécies de mamíferos. Na espécie humana as membranas simplesmente desagregam (Yanagisawa, 1994), os dois conjuntos haplóides (paterno e materno) de cromossomos duplicados e condensados se prendem ao fuso formado entre os

centríolos, sendo importante assinalar que as fibras do fuso começam a irradiar a partir do centríolo introduzido no ovócito pelo espermatozóide. Aqui parece interessante lembrar que, ao descrever, em 1876, a formação que irradiava da região do pronúcleo masculino no momento em que ele ia se unir com o pronúcleo feminino, Oscar Hertwig (1849-1922) mencionou que, naquela ocasião, “surgira, para completar o fenômeno, um sol dentro do ovo”, indicando, assim, de uma forma poética, o aparecimento de uma força natural maior que a simples soma de duas células (Weidling, 1991).

A prática de fertilização assistida, com injeção intracitoplasmática do espermatozóide, permitiu demonstrar que a capacidade fecundante do espermatozóide depende, também, da condensação do seu material nuclear, porque a integridade do DNA está associada à condensação. De fato, nos espermatozóides com material nuclear bem condensado, a proporção daqueles com DNA fragmentado é significativamente mais alta (25%) do que naqueles em que o DNA está descondensado (6%) (Lopes *et al.*, 1998), sendo interessante assinalar que a compactação do DNA dos espermatozóides difere da observada nas células somáticas. Assim, nos espermatozóides o DNA não se apresenta rodeando as histonas e formando solenóides, porque, durante a espermatogênese, as histonas são substituídas por protaminas, ricas em arginina, serina e cisteína, e, em vez de solenóides, o DNA dos espermatozóides se apresenta compactado como se fosse uma rosquinha. Essa compactação se dá à custa da oxidação dos grupos sulfidríla das protaminas (os grupos -SH passam a -S-S-) durante o período de maturação dos espermatozóides no epidídimo. Depois de fertilizar o ovócito, a descompactação do DNA se faz pelo efeito redutor do glutatião sobre os grupos sulfidríla oxidados (Ward, 1993).

## **A FORMAÇÃO DO EMBRIÃO**

Na espécie humana a singamia não produz um novo núcleo, pois o material cromossômico do zigoto entra diretamente na metáfase da divisão mitótica, da qual resultam duas células denominadas *blastômeros* (do grego, *blastós* = broto; *meros* = parte), que continuam a se dividir por mitoses sucessivas. Até o estágio de dezesseis células o processo de celularização ou clivagem do zigoto tem continuidade numa das trompas de Falópio e é considerado *holoblástico* (do grego, *hólos* = completo) porque, além de os

blastômeros se dividirem completamente, as células resultantes são, aproximadamente, do mesmo tamanho (Fig. 4.1 a-d). Tanto o estágio de oito quanto o de dezesseis blastômeros são denominados *mórula* (do latim, *morum* = amora; *ula* é um diminutivo) e é à custa dos movimentos peristálticos das trompas de Falópio e dos batimentos ciliares do epitélio que forra esses dutos que a *mórula* é levada em direção ao útero.

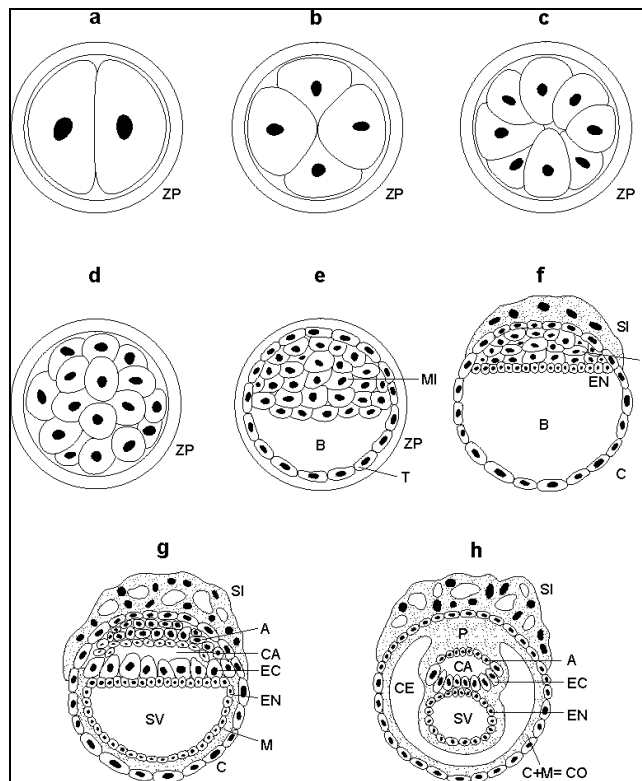


Fig. 4.1 Primeiros estágios da segmentação do zigoto e desenvolvimento do blastocisto. *a-d* – segmentação, durante os quatro primeiros dias, para a produção da *mórula*; *e* – blastocisto livre, no quinto dia; *f* – blastocisto no início de sua implantação, no oitavo dia; *g, h* - principais alterações ocorridas no blastocisto a partir da segunda semana. A-âmnio; B- blastocele; C- citotrofoblasto; CA- cavidade amniótica; CE- celoma extra-embriônico; CO- córion; EC- ectoderme primitiva ou epiblasto; EN- endoderme primitiva ou hipoblasto; M- mesoderme; MI- massa celular interna; N- nódulo embrionário; P- pedículo embrionário; SI- sinciciotrofoblasto; SV- saco vitelino; T- trofoblasto; ZP- zona pelúcida;

As observações feitas em *mórulas* de camundongos e de seres humanos revelam que, normalmente, o DNA dos mitocôndrios paternos podem ser detectados, no máximo, até a fase de oito células, sendo, pois, essa a razão pela qual os mamíferos herdam somente os mitocôndrios maternos. Na espécie humana, a persistência do DNA mitocondrial paterno está associada a alterações que provocam aborto espontâneo ou óbito precoce (Houshmand

*et al.*, 1997; Cummins *et al.*, 1998; St John *et al.*, 2000). É curioso que, em cruzamentos interespecíficos de camundongos (*Mus musculus* × *Mus spretus*) o DNA mitocondrial paterno não é destruído, sendo detectado em todos os recém-nascidos. Isso sugere que no citoplasma dos ovócitos existe um mecanismo espécie-específico que reconhece e elimina os mitocôndrios do espermatozóide (Kaneda *et al.*, 1995). É também durante a mórula de oito blastômeros que os produtos gênicos maternos desaparecem do citoplasma dessas células. Em outras palavras, desse momento em diante é o genoma do zigoto que é ativado e passa a controlar o desenvolvimento do futuro ser.

Quando a mórula está prestes a chegar ao útero, suas células começam a se diferenciar numa camada periférica, a *trophoderme* ou *trofoblasto* (do grego, *trofé* = nutrição), a qual rodeia o conjunto de blastômeros do interior, a *massa celular interna*. Por volta do quinto ao sexto dia, desenvolve-se no interior da massa celular interna uma cavidade cheia de um líquido aquoso denominada *blastocèle* (do grego, *cóilos* = oco). Na espécie humana e em outros mamíferos esse estágio do desenvolvimento do zigoto recebe o nome de *blastocisto* (Fig. 4.1 e). Quando o blastocisto chega ao útero, o que acontece entre o quinto e o sétimo dia após a fertilização, ele se liberta da zona pelúcida, que desaparece, e começa a aumentar de volume. Até essa eclosão do blastocisto o zigoto celularizado só havia sofrido aumento de superfície, mas não de volume, em razão das clivagens sucessivas que determinam a produção de blastômeros.

Por volta do oitavo ou nono dia após a fertilização do ovócito tem início o fenômeno da *nidação* do blastocisto na mucosa uterina, a partir de sua aderência. à superfície do endométrio, rica em uma secreção viscosa produzida sob o estímulo da progesterona. Essa aderência é seguida da proliferação intensa da trofoderme em contato com a mucosa uterina. Produz-se, assim, um sincício, denominado *sinciciotrofoblasto*, com grande atividade citolítica sobre as células do endométrio, resultando dessa atividade o afundamento do blastocisto na mucosa uterina. Ao redor do blastocisto forma-se um meio que lhe serve de nutrição, o *embriótrofo*, o qual é rico em detritos celulares, restos de capilares e fibrina.

O processo de nidação termina quando o epitélio da mucosa uterina cicatriza sobre o blastocisto e, nessa ocasião, o sinciciotrofoblasto já não é mais apenas uma formação localizada em um dos polos do blastocisto, mas um grande sincício lacunoso, que envolve

toda trofocotoderme celularizada que lhe deu origem, a qual passa a ser denominada *citotrofocotoderme* ou *citotrofoblasto* (Fig. 4.1 f-h). O sinciciotrofoblasto é o precursor da placenta, a qual fica bem delimitada somente a partir do terceiro mês de gestação. O esquema da circulação placentária é esboçado pelo sinciciotrofoblasto quando este, graças à sua atividade proteolítica destrói os capilares da mucosa uterina, que passam a se abrir em suas lacunas (Fig. 5.1-1,2). Na Fig. 5.1 também fica claro que, na placenta, as correntes sangüíneas materna e fetal são distintas e feitas em vias circulatórias diferentes, de sorte que parece lógico falar em circulação placentária materna e circulação placentária fetal. Ao invadir a mucosa uterina, o sinciciotrofoblasto estabelece, pois, entre o ser em gestação e sua mãe uma conexão de algum modo semelhante à de um enxerto heterólogo em um receptor, com a diferença que, durante a gestação, existe uma separação entre a circulação fetal e materna.

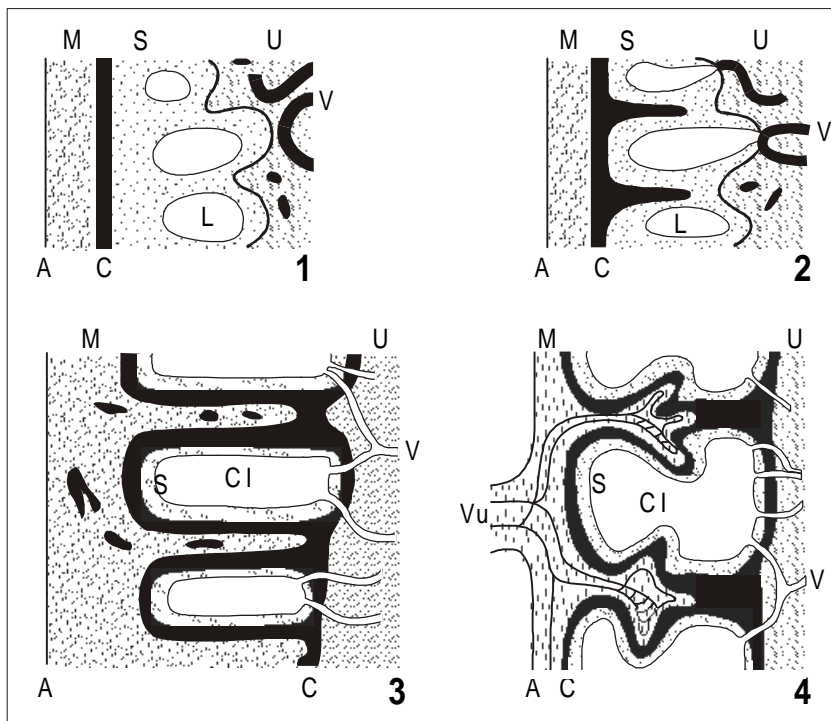


Fig.5.1 Diversos estágios evolutivos das vilosidades placentárias.

A-âmnio; C-citotrofoblasto; CI-câmara intervilosa; L-lacuna; M-mesênquima; S-sinciotrofoblasto; U-mucosa uterina; V-capilares da mucosa uterina; VU- capilares umbílico-alantoideanos.

A nidação do blastocisto é feita, normalmente, na área mediana ou superior do útero, mas existem situações de exceção, as quais, dependendo das complicações que, eventualmente, causam, podem requerer a interrupção da gravidez, pois podem provocar

óbito materno (Maruri e Azziz, 1993). Quando a nidação do blastocisto se dá fora da cavidade uterina, ela é denominada *gravidez ectópica* e, dependendo do local de implantação do blastocisto, ela será dita *tubária*, na maioria dos casos (98%) ou *abdominal*, *uterina inferior*, *pélvica* ou *ovariana*, nos casos restantes (Fig. 6.1). A frequência de implantações por gravidez ectópica é da ordem de 1% nos Estados Unidos e da ordem de 2% em São Paulo, mas ela tende a diminuir em consequência da vulgarização do uso de aparelhos de ultra-sonografia de boa resolução, que permitem o diagnóstico precoce dessa alteração (Franchi-Pinto, 1996).

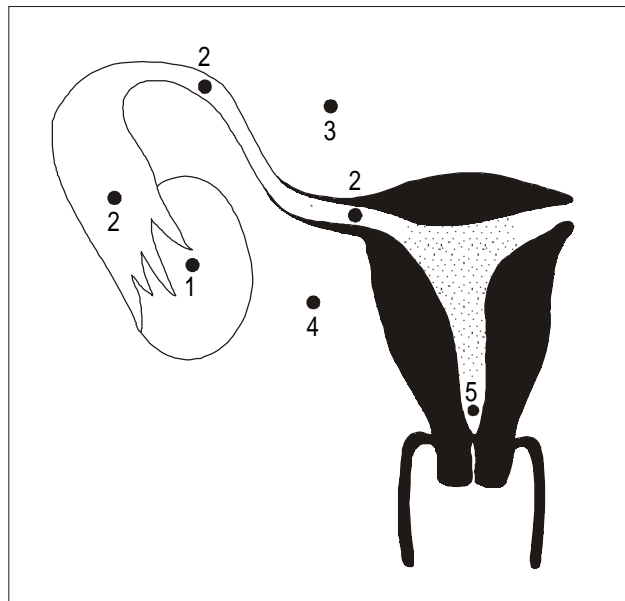


Fig.6.1 Áreas de nidação do blastocisto. Em pontilhado assinalou-se a área normal. As áreas de nidação anômala foram numeradas de 1 a 5. 1-ovárica; 2-tubária; 3-abdominal; 4-pélvica; 5-uterina inferior, que pode produzir placenta prévia.

No oitavo ou nono dia após a fertilização, o blastocisto apresenta a massa celular interna concentrada em um de seus polos, sendo ela, por isso, também denominada *nódulo embrionário* (do grego, *embriéin* = inchar dentro). Nessa ocasião, as células da massa celular interna que limitam a blastocele se diferenciam, sendo essa camada denominada *hipoblasto* ou *endoderme primitiva* (Fig. 4.1 f). Enquanto a nidação prossegue, a massa celular interna sofre maiores alterações ao aparecer em seu interior uma cavidade, a *cavidade amniótica*, cujo assoalho é constituído por células altas que formam a camada denominada *epiblasto* ou *ectoderme primitiva*. A abóbada dessa cavidade tem nome especial (*âmnio*), mas também é de origem ectodérmica. O hipoblasto e o epiblasto formam

uma placa circular achatada, que é chamada, por isso, de *disco embrionário*(Fig. 4.1 g).

O hipoblasto, por sua vez, prolifera formando uma camada que forra a blastocele, a qual passa a se denominar *saco vitelino primitivo* que, ao contrário do que ocorre nos vertebrados inferiores, não contém vitelo. Além disso, essa endoderme primitiva produz uma camada de tecido conjuntivo frouxo, um mesênquima, denominado *mesoderme ou mesoblasto extra-embrionário*, que acaba por envolver o saco vitelino e o âmnio. As lacunas formadas nesse mesênquima, depois de unidas constituem o *celoma extra-embrionário*, cuja continuidade é interrompida pelo *pedículo embrionário*, que é o local onde a mesoderme extra-embrionária não sofre separação em duas camadas (Fig. 4.1 h). A parte do mesênquima que fica aderida ao citotrofoblasto constitui, junto com ele, o *córion*.

No início da terceira semana de gestação o epiblasto se diferencia, então, em três *folhetos embrionários*, denominadas *ectoderme*, *mesoderme* e *endoderme*. É nessa ocasião que o disco embrionário passa a constituir o embrião propriamente dito, a partir do qual se desenvolverá o futuro ser humano, e a tendência atual é denominar de *gástrula* a esse estágio de desenvolvimento.

## **A FORMAÇÃO DE GÊMEOS**

Se no momento da ovulação forem expelidos dois ovócitos, ao invés de um, e se ambos forem fecundados, os zigotos resultantes darão origem a gêmeos dizigóticos (DZ). Esses gêmeos, 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 gêmeos fraternos (do latim, *frater* = irmão).

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). Nem sempre, porém, os pares DZ apresentam duas placentas distintas, pois, em decorrência de uma eventual proximidade excessiva dos locais de implantação dos blastocistos que dão origem aos gêmeos DZ, as placentas podem, aparentemente, fundir-se em uma única. Quando isso acontece, somente o exame microscópico na 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

córios será possível observar a presença do trofoblasto e vilosidades coriônicas atrofiadas (Benirschke, 1994).

Um outro tipo de gêmeos, os pares monozigóticos (MZ), é formado no período entre um e 14 dias depois da fertilização, quando um único zigoto sofre desenvolvimento irregular, dando origem a dois indivíduos que são considerados idênticos do ponto de vista genético, pois possuem o mesmo patrimônio genético, visto que são oriundos de uma única célula-ovo ou zigoto. Os gêmeos MZ são do mesmo sexo, isto é  $MZ_{MM}$  ou  $MZ_{FF}$ , e, freqüentemente são denominados *gêmeos idênticos*, apesar de essa denominação não ser muito apropriada, visto que a identidade, aqui, se refere ao genótipo e não ao fenótipo, havendo casos em que os pares MZ apresentam grandes diferenças fenotípicas.

Segundo Benirschke (1994), cerca de 30% dos pares MZ se originam da separação dos blastômeros num período muito precoce, 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 gêmeos resultantes mostrarão, ao nascer, dois córios, dois âmnios (diamnióticos dicoriônicos) e, dependendo da proximidade dos locais em que estavam implantados no útero, duas placentas bem separadas ou unidas (Fig. 7.1- 1).

Os outros 70% de pares MZ são o resultado de alterações que ocorrem entre o quarto até o 14<sup>o</sup> dia após a fecundação do ovócito. Essas alterações podem provocar a divisão da massa celular interna (Fig. 7.1-2), o que propicia o nascimento de gêmeos com dois âmnios e um córion (diamnióticos monocoriônicos) e uma placenta. No caso de essas alterações serem mais tardias, elas provocam a divisão do disco embrionário (Fig. 7.1-3), disso resultando o nascimento de gêmeos com um único âmnio e um único córion (monoamnióticos monocoriônicos) e placenta única. Essas alterações tardias também podem provocar uma repartição desigual do material embrionário e, por conseguinte, a produção de maiores diferenças entre os pares MZ.

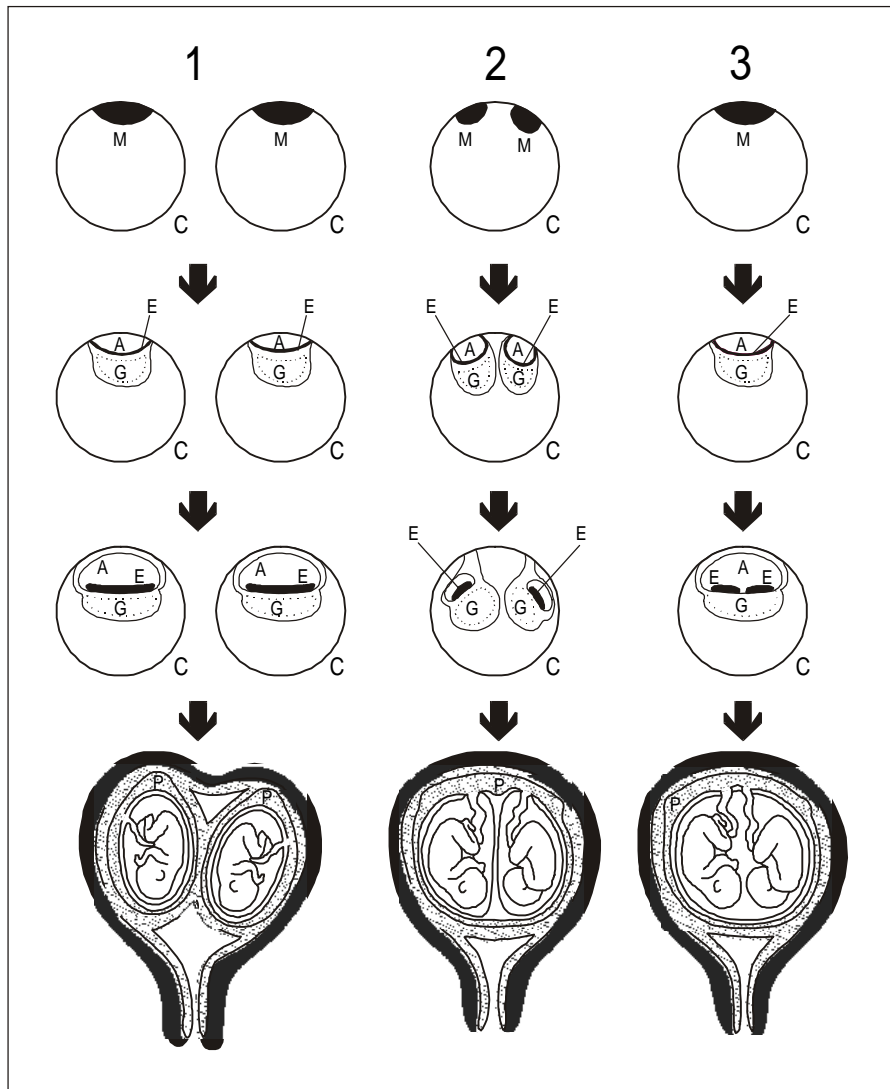


Fig.7.1 Formação de gêmeos monozigóticos: 1. por produção de dois blastocistos, em consequência da separação precoce dos blastômeros; 2. por divisão da massa celular interna; 3. por divisão do disco embrionário.  
A-cavidade amniótica; C-córion; E-disco embrionário; G-saco vitelino; M-massa celular interna; P-placenta.

As maiores diferenças entre os elementos de um par MZ, ocorrem naqueles que são monocoriônicos, porque neles é mais provável a manifestação da *síndrome da transfusão entre gêmeos idênticos*, em consequência de anastomoses placentárias artério-venosas, que podem permitir o estabelecimento de um fluxo sanguíneo preferencial de um gêmeo para outro. O feto receptor passa a ser hipervolêmico e a produzir um excesso de fluido amniótico, enquanto o doador, ao contrário, se torna hipovolêmico e com pouca quantidade de fluido amniótico. Se a síndrome da transfusão entre os gêmeos MZ se iniciar antes de 26

semanas de gestação haverá alto risco de mortalidade fetal. Atualmente o melhor recurso para enfrentar essa situação é a interrupção da comunicação circulatória placentária pela utilização de laser durante fetoscopia (Ville *et al.*, 1992).

Estima-se que cerca de 22% dos pares MZ mostram uma diferença de 35% ou mais de hemoglobina. Se o gêmeo que recebe menos hemoglobina nascer com uma diferença de peso igual ou superior a 300 g em relação ao gêmeo mais pesado, ele, freqüentemente, terá quociente de inteligência (QI) inferior ao que nasceu com mais peso (Munsinger, 1977). A hipótese de que a síndrome da transfusão entre gêmeos idênticos é a responsável pela diferença de QI entre os pares MZ encontra apoio no fato de tal diferença não ocorrer entre os gêmeos DZ, mesmo quando o peso ao nascer desses gêmeos diferiu em 300 g ou mais, porque nesses gêmeos as circulações fetais quase nunca estão conectadas.

Dos comentários feitos a respeito da placenta pode-se concluir que ela tem pouco valor para o diagnóstico da zigosidade ao nascimento, pois as placentas dos gêmeos DZ podem se apresentar aparentemente unidas, além do que, os pares MZ diamnióticos dicoriônicos (cerca de 30%) apresentam duas placentas. Já a presença de um único âmnio ou de um único córion serve para rejeitar a hipótese de dizigosidade, apesar de a presença de dois córions ou de dois âmnios não servirem para excluir a hipótese de monozigosidade.

Dentre os partos múltiplos, os de trigêmeos são menos freqüentes que os de gêmeos, sendo mais raros, ainda, os de quadrigêmeos e de quádruplos. Muito esporadicamente assinala-se o nascimento de um número de gêmeos superior a cinco, mas não há registro confiável de que tenham sobrevivido. A exemplo do que ocorre com os pares de gêmeos, tem-se que a origem dos trigêmeos, tetragêmeos e quádruplos pode ser monozigótica ou resultar de mais de uma célula-ovo. Assim, por exemplo, no caso de trigêmeos, eles podem ser trizigóticos, dizigóticos ou monozigóticos se oriundos, respectivamente, de três zigotos, dois zigotos ou de um único zigoto. A Fig. 8.1 mostra, esquematicamente, os vários tipos de trigêmeos e tetragêmeos quanto à sua zigosidade.

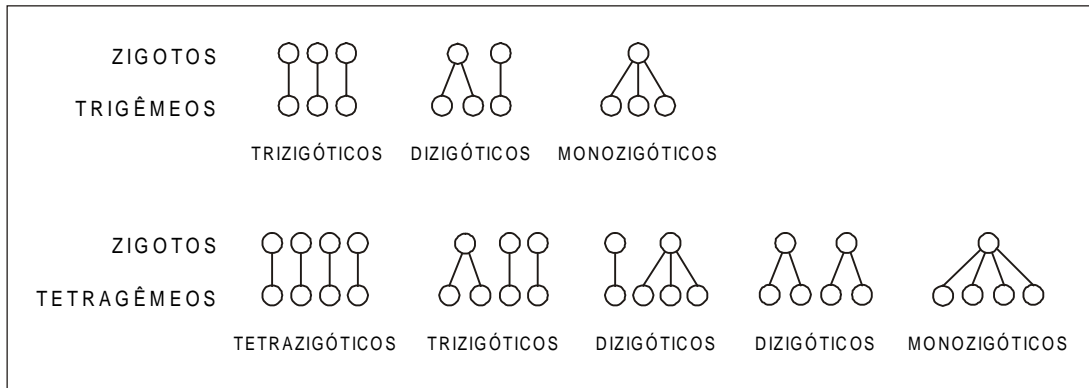


Fig.8.1 Representação esquemática dos vários tipos possíveis de trigêmeos e tetragêmeos quanto à sua zigosidade.

### A FORMAÇÃO DE TERATÓPAGOS

Se a separação do material embrionário for incompleta durante a formação de um par MZ, os gêmeos resultantes poderão apresentar-se ligados por intermédio de uma estrutura comum, que permitirá a comunicação de seus sistemas circulatórios. Tais tipos de gêmeos são denominados *teratópagos*, o que não é um termo muito apropriado pois, em grego, *téras* = monstro; *pagos* = unido, mas é a designação mais freqüentemente utilizada para indicar a união física de gêmeos, que já foi notada inclusive em trigêmeos e em quadrigêmeos (Schinzel *et al.*, 1979).

Dentre os fatores associados à formação de teratópagos, destaca-se a história de tireoideopatia e de tratamento para infertilidade das gestantes. Na Hungria notou-se também uma associação entre o nascimento de teratópagos e o uso freqüente de esteróides sexuais no início da gestação (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1991).

Na imprensa leiga os teratópagos são, geralmente, chamados de *irmãos siameses*, em alusão a um caso que ganhou repercussão mundial no século dezenove, e que dizia respeito a um par de gêmeos ligados entre si por uma ponte que ia da cartilagem ensiforme até o umbigo comum a ambos. Esses gêmeos nasceram no Sião (atual Tailândia), em 1811, e faleceram nos Estados Unidos da América do Norte, em 1874, onde residiram a partir de 1829. O óbito de um desses gêmeos (Chang) foi consequência de pneumonia. O outro (Eng), de acordo com o relato de parentes, faleceu vítima de violento terror, algumas horas depois da morte do irmão, enquanto aguardava a vinda do médico que deveria proceder a separação cirúrgica dos corpos. A autópsia desses irmãos revelou que a ligação entre eles

continha tecido hepático, que unia o fígado de Chang ao de Eng.

Na literatura sobre gêmeos que nascem unidos existem abundantes exemplos de pares ligados por outras partes do corpo, com duplicação total ou parcial dos órgãos. Tais gêmeos são classificados em três grandes grupos, conforme a ligação entre eles seja feita pela parte inferior do corpo (*teratópagos catadídimos*, do grego, *cata* = para baixo), por uma parte superior (*teratópagos anadídimos*, do grego, *ana* = para cima), ou apenas por uma região mediana do corpo (*teratópagos anacatadídimos*) (Fig. 9.1). Nem sempre, porém, os gêmeos teratópagos constituem um par com o mesmo desenvolvimento, pois um dos gêmeos pode apresentar desenvolvimento rudimentar. Nesse caso, o menos desenvolvido recebe a denominação de *parasitário*.

Cada um desses grupos admite subclassificações, de acordo com o tipo de união dos gêmeos. Assim, dentre os teratópagos catadídimos, aqueles que apresentam duas faces em uma cabeça ligada a um único corpo são denominados *diprósopos* (do grego, *prósopon* = rosto) ou com *cabeça de Janus*, em alusão à divindade romana simbolizada em portões e arcos por uma cabeça com duas faces, uma das quais, geralmente, barbada e a outra glabra.

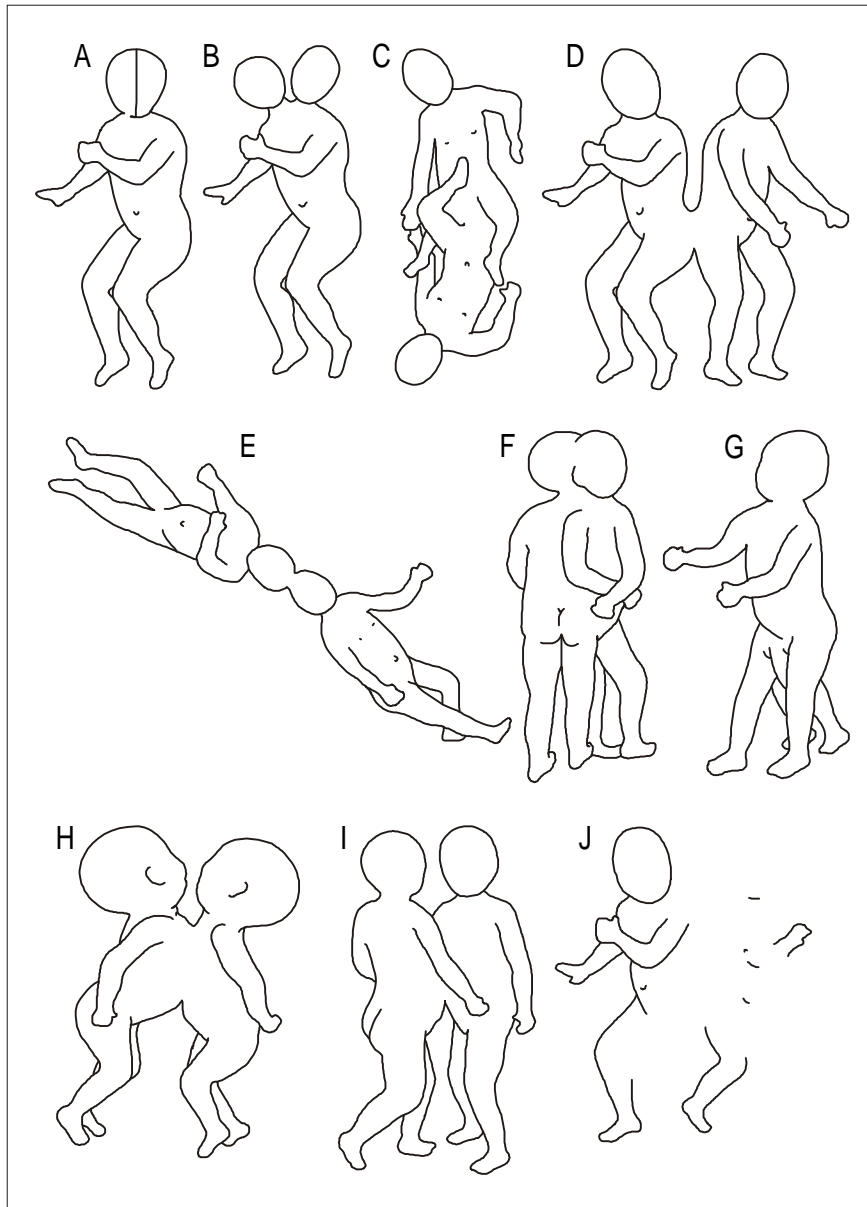


Fig. 9.1 Teratópagos catadídimos (A-D), anadídimos (E-G) e anacatadídimos (H-J). A-diprósopos; B-dicéfalos; C-isquiópagos; D-pigópagos; E-craniópagos; F-sincéfalos; G-dípigos; H-teratópagos; I-onfalópagos; J-raquípagos.

Os que apresentam duas cabeças ligadas a um único corpo são denominados *dicéfalos* (do grego, *kefalé* = cabeça). Atualmente, porém existe a tendência de não considerar os dicéfalos como resultantes de separação incompleta de gêmeos MZ, mas de uma divisão da região que forma a cabeça do embrião, o que daria origem a dois pólos cefálicos em um único corpo (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1991). Os *isquiópagos* (do grego, *ísquion* = quadril), por sua vez, são os gêmeos ligados pelas margens inferiores da região sacrococcigeana, mantendo as colunas vertebrais em sentidos

opostos, segundo um mesmo eixo. Quando os gêmeos estão ligados pela superfície pósterolateral da região sacro-coccigeana, eles são denominados *pigópagos* (do grego, *pigé* = nádega).(Fig. 9.1 A-D).

Os teratópagos anadídimos congregam os *craniópagos*, que são ligados por uma região da abóbada craniana, os *sincéfalos*, ligados pela face, e os *dípigos*, que apresentam duas cinturas pélvicas e quatro membros inferiores ligados a um tronco e cabeça únicos (Fig. 9.1 E-G).

Finalmente, os teratópagos anacatadídimos incluem os gêmeos *toracópagos*, que apresentam parte da região torácica em comum, os *onfalópagos* (do grego, *onfalós* = umbigo) que, como os irmãos siameses Cheng e Eng, mencionados acima, são unidos por uma ponte de tecido que vai desde o umbigo até a cartilagem xifóide, e os *raquípagos*, que são unidos pela coluna vertebral em qualquer área acima da região sacro-coccigena. (Fig. 9.1 H-J). Os toracópagos e os onfalópagos são, também, freqüentemente denominados de *irmãos xifópagos* em alusão ao esterno e apêndice xifóide (do grego, *xífos* = espada).

As estatísticas internacionais a respeito dos teratópagos mostram que 51% desses gêmeos são do tipo anacatadídimo, a maioria (72%) toracópagos. Os teratópagos catadídimos correspondem a 32% e mostram maioria de dicéfalos (61%), enquanto os anadídimos constuem 12% dos casos, sendo os 5% restantes parasitários (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1991). Esses levantamentos mostram, ainda, que a natimortalidade é bastante alta entre os teratópagos (47%), mas é importante assinalar, aqui, que a definição de natimorto é, infelizmente, muito variável, pois nem todos os países consideram como natimortos os óbitos de recém-nascidos com mais de 500g, o que corresponde a uma idade gestacional entre 20 e 22 semanas. Assim, por exemplo, na Noruega já são considerados como natimortos os conceptos cujo óbito ocorreu após a 16<sup>a</sup> semana. Muitos desses óbitos, portanto, seriam classificados como abortos no Brasil.

Na América Latina, a incidência de teratópagos foram obtidas por Castilla e colaboradores (1988), com base em observações feitas a respeito de 1.714.952 recém-nascidos no período entre 1967 a 1986 em 95 maternidades de 11 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela). De acordo com esses autores, a incidência de teratópagos nas populações latinomaericanas pode ser estimada em 1:75.000, já que, entre os recém-nascidos

estudados, eles detectaram 23 desses gêmeos (1 diprósopo, 3 dicéfalos, 1 isquiópago, 5 pigópagos, 3 sincéfalos, 9 toracópagos e 1 onfalópago).

A separação cirúrgica dos toracópagos, que são os teratópagos mais freqüentes e melhor estudados do ponto de vista clínico-cirúrgico e radiológico, tem suscitado grandes debates entre médicos e teólogos de diversas religiões, tendo em vista os problemas éticos implicados em grande número de casos. De fato, uma alta proporção desses gêmeos apresenta um coração muito complexo (62%) ou apenas duplicação dos ventrículos (13%). Em conseqüência disso, somente nos casos em que há dois corações independentes (25%), uma intervenção cirúrgica para separar os toracópagos pode dar esperança de sobrevivência aos dois elementos do par. Nos casos restantes, tal intervenção significa, obrigatoriamente, a morte de um desses gêmeos para que o outro, eventualmente, se salve.

### **GÊMEOS MONOZIGÓTICOS DISCORDANTES QUANTO AO SEXO**

Os gêmeos MZ são sempre do mesmo sexo, mas existem casos muito excepcionais que, por isso, mereceram registro na literatura pertinente. Assim, Turpin *et al.* (1961) e Dallapiccola *et al.* (1985) descreveram gêmeos MZ *heterocarióticos*, isto é, gêmeos MZ com cariótipos diferentes, que eram discordantes quanto ao sexo, porque 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 conseqüência de perda de um cromossomo Y no início do desenvolvimento embrionário. Também já foram descritos pares MZ heterocarióticos discordantes quanto ao sexo, em que o gêmeo do sexo masculino tinha cariótipo normal 46,XY, ao passo que o do sexo feminino era um mosaico 45,X/46,XY (Schmidt *et al.*, 1976; Arizawa *et al.*, 1988). O caso mais curioso foi relatado por Edwards *et al.* (1966) a respeito de um par MZ heterocariótico em que o gêmeo do sexo feminino era um mosaico 45,X/46,XY e o masculino tinha cariótipo 45,X. Sabendo-se, entretanto, que, para o desenvolvimento de testículos, é essencial a presença de um cromossomo Y no carótipo, pode-se supor que, na realidade, pelo menos no início de seu desenvolvimento, o gêmeo do sexo masculino teria sido, igualmente, mosaico 45,X/46,XY.

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, Karp *et al.* (1975) e Reindollar *et al.* (1987) descreveram 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 em um par MZ com mosaicismo 45,X/47,XY. Nesses casos, a explicação mais plausível para a discordância quanto ao sexo é a de distribuição desigual na linhagem germinativa de células com cariótipo 45,X e daquelas exibindo pelo menos um cromossomo Y, indutor do desenvolvimento de testículos.

### **SUPERFECUNDAÇÃO HETEROPATERNA**

Um parto múltiplo pode ser o resultado da fertilização de dois ou mais ovócitos expelidos simultaneamente, mas pode resultar, também, 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, que a superfecundação existe, em decorrência de observações sobre *superfecundação heteropaterna*, isto é, casos de mulheres com mais de um parceiro sexual, as quais geraram gêmeos com pais diferentes, isto é, gêmeos dizigóticos que eram, de fato, meio-irmãos. Apesar de esses casos serem pouco mencionados na literatura pertinente (Sorgo, 1973; Terasaki *et al.*, 1978; Spielmann & Kühnl, 1980; Phelan *et al.*, 1982; Wenk *et al.*, 1986, 1992), é possível que sua frequência esteja em ascensão nas sociedades modernas, que propiciam aumento da frequência de parceria sexual múltipla e concomitante, com conseqüente aumento da frequência de coitos, que parecem induzir ovulação secundária (James, 1984; Forrest e Singh, 1990).

### **A RAZÃO DE SEXO DOS GÊMEOS**

As observações de alguns autores favoreceram a conclusão de que a razão de sexo dos gêmeos é menor do que a dos recém-nascidos de parto único, isto é, nasceriam menos gêmeos do sexo masculino (Stocks, 1952; Barr e Stevenson, 1961; Susanne e Corbisier, 1969; Czeizel, 1974; Araujo e Salzano, 1975; James, 1975; Bertranpetit e Marin, 1988; Beiguelman e Villarroel-Herrera, 1992). Essa conclusão não é, entretanto, apoiada por dados de outros autores (Pedreira *et al.*, 1959; Rola-Janicki, 1974).

Um amplo estudo a respeito da razão de sexo em gêmeos, realizado por Beiguelman, Franchi-Pinto, Dal Colletto e Krieger (1995), levando em conta 1385 pares nascidos durante o período entre 1984 a 1993, além de mostrar que a diferença entre a razão de sexo dos gêmeos (101,7 meninos: 100 meninas) e a observada nos recém-nascidos de parto único (104,5 meninos: 100 meninas) foi pequena, serviu para realçar um aspecto bastante curioso a respeito da variação anual da razão de sexo.

De fato, esse estudo conseguiu demonstrar que, ao contrário da pequena variação anual da razão de sexo dos recém-nascidos de parto único, a variação observada nos gêmeos foi muito grande, talvez por causa da proporção variável de pares MZ. Por causa de sua identidade genética, que lhes confere o mesmo sexo, os pares MZ poderiam distorcer os resultados em pequenas amostras de gêmeos, já que uma variação aleatória poderia provocar um excesso de meninos ou, ao contrário, de meninas. Esses resultados sugerem, pois, que os estudos sobre a razão de sexo de gêmeos, mormente os que se referem a amostras pequenas, levem sempre em conta a possibilidade de os dados estarem distorcidos por causa dos gêmeos MZ.

## **FATORES QUE INFLUENCIAM O NASCIMENTO DE GÊMEOS**

O nascimento de gêmeos DZ depende, evidentemente, da ocorrência de poliovulação, a qual, por sua vez, depende do nível de hormônio folículo-estimulante (FSH). O nível de FSH, por sua vez, depende de causas genéticas, sendo mais alto em mulheres negróides do que em caucasóides, além do que as mães de gêmeos possuem, em média, nível mais elevado de FSH do que as de parto único (Nylander, 1981). A produção de FSH está, ainda, correlacionada ao tamanho da hipófise, cujo peso máximo é atingido aos 40 anos de idade (Milham, 1964).

Essas informações explicam, pois, o fato de o nascimento de gêmeos DZ ser influenciado pela raça, sendo as mulheres negróides as mais predispostas ao nascimento de DZ, seguidas das caucasóides e das mongolóides, nessa ordem. Também deve ser, por isso, que o nascimento de gêmeos DZ depende da idade materna 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 gêmeos DZ por uma questão probabilística, isto é, não era porque o maior número de filhos aumentava a probabilidade

de nascimento de gêmeos, e sim porque a poliovuulação está associada a maior fecundidade. Nessa época, as mães de gêmeos DZ mostravam vantagem reprodutiva em relação às outras mães por necessitarem menos tempo de acasalamento para a concepção do que as outras mulheres (Allen e Schachter, 1971). Antes do uso de anovulatórios orais, essas mulheres seriam responsáveis pelo aumento da incidência de gêmeos em períodos de aumento da frequência de coitos, como foram os períodos de pós-guerra (Jeanneret e MacMahon, 1962; Elwood, 1973; Brackenridge, 1977; Parisi e Caperna, 1982).

Por estar a idade materna correlacionada ao número de filhos, poder-se-ia supor que a correlação entre a incidência de gêmeos DZ e a paridade fosse, na realidade, consequência da correlação entre a incidência desses gêmeos e a idade materna. Entretanto, já se demonstrou que a incidência de gêmeos DZ está correlacionada positivamente com a paridade, *independentemente* da idade das mães (Bulmer, 1959; Nylander, 1981; Chen *et al.*, 1987; Picard *et al.*, 1989; Allen e Parisi, 1990).

Em um estudo feito por Franchi-Pinto (1996), que incluiu 763 mães de gêmeos nascidos no período entre 1984 e 1993, em Campinas, SP, foi possível constatar que a proporção de pares DZ gerados por aquelas que tinham paridade inferior a 4 (52,1%), isto é, mulheres que antes do parto tiveram 0, 1, 2 ou 3 filhos era significativamente menor do que a de pares DZ gerados por mães de gêmeos com paridade igual ou superior a 4 (68,4%). A Tabela 1.1, por sua vez, demonstra que a incidência de pares DZ aumenta com a idade materna e que nas mulheres negróides essa incidência é maior do que nas caucasóides, qualquer que seja o grupo etário tomado para comparação.

Tabela 1.1 Incidência do total de gêmeos e dos pares DZ por mil partos e segundo o grupo etário entre os filhos de 25.932 parturientes caucasóides e 4.962 negróides atendidas na Maternidade de Campinas (Campinas, SP).

Grupo etário	C a u c a s ó i d e s			N e g r ó i d e s		
	Partos	Gêmeos	DZ	Partos	Gêmeos	DZ
<20	2.689	5,9	0,7	838	10,8	4,8
20-25	8.360	8,6	4,3	1.634	13,4	11,0
25-30	7.526	11,5	8,2	1.304	17,6	10,7
≥30	7.357	18,1	13,3	1.186	23,6	18,5

É por isso que a diminuição da idade materna e da paridade, em consequência do amplo uso de métodos anticoncepcionais eficientes na limitação da prole, bem como a diminuição da proporção de mães negróides em certas populações, têm sido usadas para explicar a queda da incidência de gêmeos DZ (Moraes, Beiguelman e Krieger, 1989; Beiguelman e Villarroel-Herera, 1993; Beiguelman, Franchi-Pinto, Krieger e Magna, 1996). Em Campinas, SP, por exemplo, a idade média das mães, que era estimada em 26,4 anos no período de 1925 a 1949, baixou para 24,9 anos no período de 1984 a 1993. Nesses mesmos períodos o número médio de partos decresceu de 3,02 para 1,94. No concernente à composição étnica da população, constatou-se que, nessa cidade, a proporção de mães negróides diminuiu bastante no período entre 1925 e 1965, ao passar de 24% para 9,6%. Sabendo-se que, em Campinas, a incidência de pares DZ, era estimada em 15,2 por mil partos no período entre 1925 e 1929, sendo reduzida a um valor quase quatro vezes inferior (4,1 por mil partos) nos anos de 1990 a 1994, é, pois, bastante plausível atribuir essa redução à ação conjunta da diminuição da idade materna, da paridade e da proporção de mães negróides na população.

Parisi e Caperna (1982) sugeriram 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 fenômeno, aliado aos distúrbios da ovulação sofrido pelas mulheres, também por causa desse *stress*, poderia ser, pois, incluído entre os fatores capazes de diminuir a incidência de gêmeos DZ.

As sugestões de que também existiriam fatores genéticos capazes de influenciar o nascimento de gêmeos DZ são antigas (Lewis *et al.*, 1996). Assim, já em 1909, Weinberg havia sugerido que a tendência hereditária à gestação de gêmeos DZ é transmitida por

intermédio das mães e que ela seria provavelmente recessiva. Um estudo genealógico feito em mórmons falou a favor da hipótese de transmissão recessiva (Wyshak e White, 1965), enquanto que, em oposição, o estudo de ocorrência espontânea de gêmeos DZ em genealogias feito por Meulemans *et al.* (1996) falou a favor de herança dominante monogênica.

O trabalho de Busjahn *et al.* (2000), entretanto, foi contrário à possibilidade de existência de efeito materno e, segundo esses autores, a dizigosidade dependeria de um gene do cromossomo 3 (PPARG), que codifica o receptor ativado do proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), o qual influencia efeitos relacionados à insulina, ao metabolismo de lipídios e à massa corporal, que são importantes para o processo de crescimento. De acordo com Busjan *et al.* (2000) esse gene contribuiria para a sobrevivência intrauterina dos gêmeos DZ, entre os quais a perda fetal é sabidamente alta. De fato, estima-se que cerca de 40% das gestações de gêmeos DZ resultam em parto único (Landy e Keith, 1998) e, em casos de fertilização assistida, cerca de 30% das implantações múltiplas de embriões resultam em parto único (Kelly *et al.*, 1991).

Outra demonstração da participação de fatores genéticos no nascimento de gêmeos DZ foi dada por Hasbargen *et al.* (2000), os quais demonstraram que as mulheres que possuem o alelo determinante da deficiência de redutase de metilenotetra-hidrofolato (MTHFR) têm menor probabilidade de gerar gêmeos DZ. Nas gestações gemelares a demanda de ácido fólico fica muito aumentada. Por ser a deficiência de MTHFR responsável pela pouca produção de 5-metiltetra-hidrofolato e elevação da concentração plasmática de homocisteína, o alelo que a 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 gêmeos essa frequência foi, praticamente, a metade (16%).

O emprego de técnicas de fertilização assistida, para ajudar casais com problemas de esterilidade, tem aumentado a frequência de nascimento de gêmeos DZ porque, essas técnicas incluem tratamento que estimula a súper-ovulação. Considerando que, regra geral, no Brasil, somente as camadas economicamente mais favorecidas da população têm acesso à fertilização assistida, a qual ainda é muito cara, é evidente que a frequência de partos gemelares na população não sofre muita influência dessa prática. Entretanto, em

maternidades que atendem a mulheres daquelas camadas sociais mais favorecidas, a frequência de nascimento de pares DZ é altíssima, chegando nos últimos anos à notável incidência de 19,5 por mil partos, quando na maior parte da população ela não ultrapassa 5,5 por mil. Do mesmo modo, a incidência de trigêmeos nessas maternidades (2,13 por mil partos) é extraordinariamente alta, quando se sabe que, em geral, essa incidência não ultrapassa 0,2 por mil partos (Colleto, Segre e Beiguelman, 2001).

Bem mais difícil do que detectar os fatores que determinam a poliovulação, que é a condição *sine qua non* para o nascimento de gêmeos DZ, é o reconhecimento de fatores que influenciam a gestação de pares MZ. 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 fatores capazes de retardar a implantação do embrião na mucosa uterina. De fato, o retardamento experimental da ovulação em coelhos, entre os quais não ocorre monozigiosidade, foi capaz de induzi-la (Bomsel-Helmreich e Papiernik-Berkhauer, 1976). Além disso, as fêmeas dos tatus da família *Dasypodidae*, nas quais o retardamento da implantação do embrião é uma característica constitucional, sempre dão origem, em cada ninhada, de 4 a 6 pares de gêmeos do mesmo sexo, por serem todos MZ. A popularidade dessa observação foi, inclusive, registrada pelo grande zoólogo brasileiro Rodolfo von Ihering (1953), ao recolher a seguinte quadra originária do Rio Grande do Sul:

“O tatu mais a mulita  
É a lei da sua criação:  
Sendo macho não pode ter irmã,  
Quando fêmea não pode ter irmão.”

Essa hipótese para justificar o nascimento de gêmeos MZ também encontra apoio numa observação epidemiológica a respeito da incidência desses gêmeos, que era constante em todas populações, variando entre 3 e 4 por mil, e que passou a aumentar naquelas em que o uso de anovulatórios orais foi vulgarizado (Bressers *et al.*, 1987; Beiguelman, Franchi-Pinto, Krieger e Magna, 1996). As indicações que permitem supor serem os anovulatórios orais os responsáveis pelo aumento da incidência de pares MZ decorrem do conhecimento de que a depressão da motilidade tubária, bem como as alterações das mucosas do endométrio e tubária, estão incluídas entre os efeitos residuais do uso desses

anticoncepcionais (Bressers *et al.*, 1987). Por outro lado, também é freqüente o retardamento da ovulação no primeiro ciclo menstrual após a suspensão do uso de anovulatórios orais (Pinkerton, 1976). O uso desses anticoncepcionais poderia, pois, ser responsabilizado pelo aumento da incidência de pares MZ, pois eles contribuiriam para o retardamento da implantação do embrião, o que, como foi demonstrado experimentalmente, é um fator importante da monozigosidade. A predominância de pares MZ entre as mães muito jovens que dão à luz gêmeos (Tabelas 1.1 e 2.1) encontraria uma explicação na irregularidade do ciclo menstrual entre elas.

Tabela 2.1 Porcentagem de pares MZ em 1306 partos gemelares segundo o grupo etário das mães (Beiguelman, Franchi-Pinto, Dal Colletto & Krieger, 1995).

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

No concernente a influências genéticas na indução de predisposição ao nascimento de gêmeos MZ, existem evidências de que mulheres gêmeas MZ têm maior probabilidade de gerar esse tipo gêmeos, mas a investigação de um efeito paterno semelhante em favor do nascimento desses gêmeos mostrou resultado negativo (Lichtenstein *et al.*, 1998). Em outras palavras, se existir um componente genético que favorece a divisão do embrião para a produção de gêmeos MZ, esse componente se expressa apenas nas mães e não nos zigotos.

A fertilização assistida também tem favorecido o aumento da incidência de gêmeos MZ por razões que ainda não são claras. Esse fenômeno foi atribuído principalmente à delgadeza e(ou) micromanipulação da zona pelúcida (Alikani *et al.*, 1994). Entretanto, Sills *et al.* (2000) não observaram diferença na proporção de gêmeos MZ nascidos de fertilização *in vitro* sem o emprego e com o emprego dessa manipulação. Além disso, deve-se lembrar que Derom *et al.* (1987) já haviam notado aumento da taxa de nascimento de gêmeos MZ por simples indução da ovulação.

## O QUIMERISMO NOS GÊMEOS DIZIGÓTICOS

Durante a vida intra-uterina dos pares DZ é possível a ocorrência de anastomoses placentárias devido à proximidade das placentas, e, assim, haver trocas de células circulatórias nucleadas entre os gêmeos. Por ser essa troca de células feita antes do desenvolvimento da imunocompetência, cria-se entre os gêmeos um estado de tolerância imunológica permanente, de modo que eles se desenvolvem como *quimeras*, isto é, como indivíduos nos quais coexistem populações celulares geneticamente diferentes, pois são originárias de zigotos distintos. Em consequência dessa tolerância imunológica, em tais tipos de gêmeos não ocorrerá rejeição de enxertos recíprocos eventualmente feitos neles. Em macacos bugios que, freqüentemente, dão origem a gêmeos DZ, demonstrou-se tolerância de enxertos recíprocos de pele por mais de um ano (Porter, 1968), em decorrência de seu quimerismo. Em gêmeos DZ bovinos a tolerância desses enxertos também é a regra (Rogers e Allen, 1955). Essas observações abalaram profundamente a idéia, divulgada por muito tempo, de que a aceitação de enxerto recíproco de pele em gêmeos humanos serviria para rejeitar a hipótese de que eles seriam DZ.

A existência de quimerismo em gêmeos DZ já vinha sendo demonstrada desde a década de 50, com a constatação, em alguns deles, de uma heterogeneidade na população de hemácias quanto aos grupos sanguíneos (Race e Sanger, 1975). Assim, verificou-se a existência de casos em que um dos indivíduos do par, ou ambos, apresentavam uma população de hemácias do grupo O e outra do grupo A ou B, ou ainda, populações diferentes de hemácias quanto aos grupos sanguíneos do sistema Rh. Entretanto, a demonstração citogenética da existência desse fenômeno foi feita, pela primeira vez, em 1963, por Chown e colaboradores, que constataram nas culturas de leucócitos de um par DZ em que os gêmeos eram discordantes quanto ao sexo, que 30% das células da menina apresentavam cariótipo masculino (46,XY), enquanto que 22% das células do menino mostravam cariótipo feminino (46,XX).

Até o presente não existe uma explicação para o fato de que, tanto nos humanos quanto nos macacos bugios, os gêmeos DZ discordantes quanto ao sexo e com placenta aparentemente única e, portanto, com possibilidade de trocas celulares durante a vida intra-uterina, não apresentam um fenômeno semelhante ao que se observa no gado bovino, em

carneiros, cabras e porcos, isto é, que as gêmeas de machos possam desenvolver-se como *fêmeas maninhas* (do latim ibérico, *manan* = estéril). Tais fêmeas que, em inglês, são denominadas *freemartins*, possuem genitais externos femininos, mas são estéreis por possuírem ovários atrofiados, sem córtex, além do que, o útero e as trompas são pouco desenvolvidos.

Durante muitos anos, a maninhez foi interpretada como sendo uma conseqüência de influências hormonais do feto masculino sobre o feminino. Entretanto, tal explicação foi derrubada pela demonstração de que a testosterona injetada nos fetos é incapaz de reduzir os derivados dos dutos de Müller, que dão origem às trompas, útero e parte superior da vagina, e não afeta o desenvolvimento dos ovários (Jost *et al.*, 1963). Passou-se, por isso, a pensar que a mistura de células masculinas e femininas pudesse condicionar o efeito que era atribuído, anteriormente, aos hormônios (Goodfellow *et al.*, 1965; Herschler e Fechheimer, 1967). Essa hipótese, contudo, também teve que ser rejeitada quando se verificou não ser possível demonstrar, de modo regular, o encontro de células com cromossomos sexuais XY nem nas gônadas, nem em outros tecidos sólidos de fêmeas maninhas. Além disso, essa hipótese não explica o fato de, nos seres humanos e nos bugios, as células com cromossomos XY não terem atuação nas gêmeas que apresentam quimerismo.

Outra hipótese que teve de ser afastada foi a de que, nos seres humanos e nos bugios, a fusão das vilosidades coriônicas nos gêmeos dizigóticos com placenta aparentemente única poderia ocorrer mais tardiamente do que no gado bovino, o que livraria os primeiros da atuação precoce de agentes exteriores sobre suas gônadas. Entretanto, de acordo com Benirschke (1972), a fusão das vilosidades nos bugios ocorre antes da angiogênese e, à época da diferenciação genital, as anastomoses interplacentárias já estão bem estabelecidas. O problema, portanto, continua sem solução.

## **DURAÇÃO DA GESTAÇÃO**

Os gêmeos nascem com menos semanas de gestação que os recém-nascidos de parto único. Num estudo feito em Campinas, SP, com 640 pares de gêmeos (504 nascidos de mães caucasóides e 136 de mães negróides) e 1119 recém-nascidos de parto único (924 de mães caucasóides e 195 de mães negróides) Beiguelman, Franchi-Pinto e Magna (1997)

verificaram que o grupo racial das mães não teve influência sobre a idade gestacional dos recém-nascidos, o que também já havia sido observado por Luke *et al.* (1991) nos Estados Unidos. Essa similaridade permitiu estudar os gêmeos e os nascidos de parto único sem distinção de raça e constatar que, em média, os gêmeos tiveram idade gestacional de 36,6 semanas, ao passo que a idade gestacional dos nascidos de parto único foi de 39,5 semanas, o que dá uma diferença média de três semanas a menos para os partos gemelares. Esses valores são muito semelhantes às estimativas obtidas na Europa em diferentes épocas e países (McKewon e Record, 1952; Powers, 1973; Gedda *et al.*, 1981; Bonnelykke *et al.*, 1987).

A duração das gestações únicas é considerada normal quando o nascimento se dá no período entre 37 e 42 semanas completas de amenorréia, isto é, de ausência de menstruação (*recém-nascidos a termo*). Quando esse tempo de gestação é inferior a 37 semanas completas de amenorréia, os recém-nascidos são considerados *prematuros* ou *recém-nascidos pré-termo*. Se a duração da gestação for igual ou superior a 42 semanas completas de amenorréia, o recém-nascido será dito *pós-termo*.

Se esse critério, consagrado para os partos únicos, for estendido aos partos gemelares, a proporção de gêmeos classificados como prematuros passa a ser altíssima. De fato, nos gêmeos brasileiros a proporção de partos gemelares com menos de 37 semanas completas de amenorréia foi de 45%, enquanto que nos partos únicos a proporção de prematuros não atingiu 10%. Nos gêmeos brasileiros a proporção de partos a termo (37 a 42 semanas) foi de 53%, enquanto entre os partos únicos essa proporção atingiu 81%. A proporção de pós-maturidade (42 semanas ou mais) entre os gêmeos foi de apenas 2%, enquanto entre os partos únicos foi de 9,5%. Aqui é interessante assinalar que essas proporções são muito semelhantes às observadas nos Estados Unidos (Keith, 1994) e na Grã Bretanha (Buckler e Buckler, 1987).

Papiernik *et al.* (1985), conseguiu diminuir a proporção de gêmeos pré-termo para 34%, após submeter as gestantes a um programa especial de cuidados pré-natais. Entretanto, não são poucos os que consideram que a prematuridade dos gêmeos não é um fenômeno patológico, mas mera consequência mecânica da distensão excessiva e eretismo da musculatura uterina, e do aumento da mobilidade fetal (Benirschke e Kim, 1973; Gedda *et al.*, 1981). Gedda *et al.* (1981) consideraram provável que as gestações gemelares

estejam associados com o aumento da produção fetal de proteínas com efeito oxitócicomimético.

Um trabalho realizado por Beiguelman, Dal Colletto, Franchi-Pinto e Krieger (1998), levando em conta o desenvolvimento intra-uterino de 1.158 pares de gêmeos nascidos em três maternidades brasileiras, mostrou que, em comparação com a taxa de crescimento de fetos únicos, a taxa de crescimento fetal dos gêmeos é retardada, independentemente do nível sócio-econômico da população examinada. Entretanto, a idade gestacional em que começa esse atraso parece estar relacionada ao nível econômico das mães, pois entre as mais pobres o atraso do crescimento fetal começa mais cedo. Em qualquer situação, porém, depois de 28 semanas de gestação, o crescimento dos fetos femininos foi levemente, mas consistentemente, inferior aos dos fetos masculinos.

## **PESO E ESTATURA AO NASCER**

Em decorrência do menor tempo médio de gestação, os gêmeos apresentam menor peso e menos estatura ao nascer que os recém-nascidos de parto único. Assim, por exemplo, um estudo feito em Campinas, SP, por Beiguelman e Franchi-Pinto (2000) permitiu constatar em recém-nascidos vivos do sexo masculino, que 711 gêmeos mostraram peso médio de  $2331 \pm 616$  g, enquanto 750 nascidos de parto único pesaram, em média,  $3212 \pm 527$ . Entre os recém-nascidos do sexo feminino a diferença foi da mesma ordem de grandeza, pois 728 gêmeas pesaram, em média,  $2246 \pm 611$  g, enquanto as nascidas de parto único tiveram peso médio de  $3127 \pm 477$  g. Quando esses recém-nascidos foram distribuídos em apenas duas classes de peso (menos de 2500 g, o que é considerado *peso baixo ao nascer*, e com 2500 g ou mais), constatou-se que a proporção de crianças com menos de 2500 g foi impressionantemente mais alta nos gêmeos (61%) do que nos recém-nascidos de parto único (7,9%). Ao promover a distribuição dos recém-nascidos em uma classe inferior a 1500 g (*peso muito baixo ao nascer*) e com 1500 g ou mais, praticamente 10% dos gêmeos foram classificados na primeira classe, enquanto que, praticamente, apenas 1% dos recém-nascidos de parto único foram incluídos entre os recém-nascidos de peso muito baixo.

Em outro estudo, também realizado em Campinas, SP (Beiguelman, Franchi-Pinto e Magna, 1997), pôde-se observar que a estatura média entre os recém-nascidos do sexo

masculino foi de  $45,1 \pm 3,3$  cm para os 671 gêmeos analisados e  $48,6 \pm 2,2$  cm para os 750 nascidos de parto único. Entre os do sexo feminino, verificou-se que 712 gêmeas mediram  $44,6 \pm 3,2$  cm, ao passo que as 765 nascidas de parto único tiveram  $47,9 \pm 2,4$  cm de estatura. Ao serem distribuídos em duas classes de estatura (menos de 44 cm e com 44 cm ou mais), a proporção de crianças com menos de 44 cm também foi significativamente mais alta nos gêmeos (28%) do que nos recém-nascidos de parto único (3%).

Os dados a respeito do peso de recém-nascidos em Campinas, SP, são semelhantes aos verificados em outras populações brasileiras (Araújo e Salzano, 1975) ou na África do Sul (Essel e Opai-Tetteh, 1994). Entretanto, tanto o peso quanto a estatura dos recém-nascidos brasileiros, gêmeos ou não, foram menores do que os constatados em recém-nascidos da Europa, Estados Unidos e Israel (Armitage *et al.*, 1967; Gedda *et al.*, 1981; Alfieri *et al.*, 1987; Ramos-Arroyo *et al.*, 1988; Blickstein e Weissman, 1990; Voorhorst *et al.*, 1993).

De acordo com Luke (1996), o menor peso ao nascer associado à menor idade gestacional dos gêmeos resulta em efeito benéfico para eles. Assim, nos Estados Unidos, a menor taxa de óbitos fetais em gêmeos foi observada naqueles com 2500 a 2800 g ao nascimento e idade gestacional de 36 a 37 semanas, enquanto a menor taxa de óbito entre os recém-nascidos de parto único ocorreu entre aqueles que apresentaram 3700 a 4000 g ao nascimento e idade gestacional de 40 a 41 semanas. As observações de Luke (1996) concordam com as anteriores de Gedda *et al.* (1981), que afirmaram ser o peso baixo de gêmeos ao nascer uma entidade distinta do peso de recém-nascidos de parto único, por afetarem diferentemente o crescimento e a sobrevivência das crianças. Gedda *et al.* (1981) também recomendaram que, na análise da relação entre o peso ao nascer e a mortalidade perinatal, os dados a respeito dos gêmeos e dos nascidos de parto único deveriam ser avaliados separadamente e não em conjunto, como, geralmente, se faz.

## **ÍNDICE DE APGAR**

Em 1953, Virginia Apgar propôs um método para avaliar o estado clínico dos recém-nascidos por intermédio de um índice, que representa a soma de vários achados. Esse método foi idealizado, originalmente, para ser empregado um minuto após o

nascimento (Apgar de 1 min.). Posteriormente, porém, passou-se a empregá-lo pelo menos mais uma vez, cinco minutos após o nascimento (Apgar de 5 min.).

O índice de Apgar leva em conta cinco sinais que podem ser facilmente determinados e que não interferem com os cuidados que o recém-nascido necessita (frequência cardíaca, esforço respiratório, irritabilidade reflexa, tônus muscular e cor da pele). Cada um desses sinais é subclassificado em três resultados que recebem nota zero, um ou dois, de modo que a soma dessas notas dá um total (índice de Apgar), que pode variar de zero a 10. As notas são as seguintes:

- 1) *Frequência cardíaca*: 0 = nenhum batimento pode ser visto, sentido ou ouvido; 1 = menos de 100 batimentos por minuto; 2 = mais de 100 batimentos por minuto.
- 2) *Esforço respiratório*: 0 = apnéia após o nascimento; 1 = todos os tipos de esforços respiratórios; 2 = choro forte.
- 3) *Irritabilidade reflexa* : 0 = ausência de resposta; 1 = movimentos faciais; 2 = caretas, tosse e espirro.
- 4) *Tônus muscular*: 0 = flacidez muscular completa; 1 = alguns movimentos de flexão de membros; 2 = movimentação ativa dos membros e resistência à extensão.
- 5) *Cor da pele*: 0 = cianose; 1 = cianose somente das extremidades; 2 = cor da pele rosada.

O índice 10 indica que o estado clínico do recém-nascido é considerado excelente, mas os índices de Apgar de 7 a 9 também são aceitos como bom prognóstico de baixo risco de complicações respiratórias ou do desenvolvimento neuropsicomotor. Índices de 4 a 6 indicam asfixia moderada, o que requer algum tipo de ressuscitação para o recém-nascido. Índices entre 3 e zero indicam estado grave e estão associados a alto risco de óbito e paralisia cerebral (Fonaroff e Martin, 1992).

Se o índice de Apgar de 5 min for menor do que 7, o recém-nascido passa a ser reavaliado em intervalos de 5 minutos até que haja normalização clínica (Fonaroff e Martin, 1992), porque a correlação entre o desenvolvimento neurológico e o índice de Apgar aumenta à medida que aumenta o tempo decorrido entre o nascimento e o exame do recém-nascido (Grothe e Rütgers, 1985; Committee on Fetus and Newborn, 1986).

Um estudo feito em Campinas, SP, por Franchi-Pinto, Dal Colletto, Krieger e Beiguelman (1999) a respeito do índice de Apgar de 604 pares de gêmeos mostrou que

aqueles que nascem em primeiro lugar apresentam, em média, melhor estado clínico do que os gêmeos que nascem em segundo lugar. De fato, entre os primeiros a proporção de índices de Apgar de 1 min inferiores a 7 (17,5%) foi significativamente menor do que aquela observada entre os gêmeos nascidos em segundo lugar (29,8%). Em qualquer caso, a proporção de índices de Apgar de 1 min. inferior a 7 foi significativamente maior nos gêmeos do que em 1522 conceptos únicos nascidos na mesma maternidade (9,2%).

## **MORTALIDADE PERINATAL**

Os óbitos *perinatais* incluem os *natimortos*, isto é, os conceptos com peso superior a 500 g ou com mais de 22 semanas completas de gestação que, ao nascimento, não manifestam qualquer sinal vital, e os *óbitos neonatais precoces*, isto é, os conceptos que nascem com vida, mas que vão a óbito na primeira semana após o nascimento (Belitzky *et al.*, 1978). Em decorrência dos avanços terapêuticos, as causas de natimortalidade de origem materna, como diabetes mellitus, pré-eclâmpsia e isoimunização, tendem a ser menos freqüentes, dando lugar ao predomínio da natimortalidade de origem fetal, geralmente decorrente da prematuridade.

Em todas as populações humanas estudadas, a taxa de mortalidade perinatal de gêmeos é maior do que a de nascidos de parto único (Lumme e Saarikoski, 1988; Chen *et al.*, 1992; Keith, 1994). No Brasil, essa situação não é diferente. De fato, ao analisar dados a respeito de 116.699 partos (1.062 gemelares e 115.637 únicos) ocorridos no período entre 1984 e 1996 na maior maternidade da cidade de Campinas, SP, Beiguelman e Franchi-Pinto (2000) constataram que, a despeito da baixa incidência de nascimentos gemelares (9 por mil partos), as taxas de óbitos neonatais precoces (55 por mil recém-nascidos) e de natimortos (19 por mil recém-nascidos) entre os gêmeos foram responsáveis por 10,7% dos óbitos neonatais precoces e 3,5% dos natimortos. Em relação aos recém-nascidos de parto único (8,4 óbitos neonatais precoces e 10 natimortos por mil nascimentos), as probabilidades de mortalidade neonatal precoce e de natimortalidade foram, respectivamente, 6,5 e 1,9 vezes maior. A taxa de óbitos perinatais dos recém-nascidos do sexo masculino foi mais alta do que a dos recém-nascidos do sexo feminino tanto entre os gêmeos quanto entre os nascidos de parto único.

No concernente ao período crítico para os óbitos perinatais precoces, os dados desse trabalho contradisseram observações feitas em outras populações, nas quais se considera que esse período está limitado ao primeiro dia após o nascimento (Barr e Stevenson, 1961; Doherty, 1988), visto que, em Campinas, tal período crítico abrangeu os três primeiros dias após o nascimento tanto no caso dos gêmeos quanto no dos recém-nascidos de parto único (Beiguelman e Franchi-Pinto, 2000). Além disso, ficou claro que a mortalidade perinatal incidiu mais freqüentemente nos pares masculinos (MM), os quais foram seguidos pelos pares femininos (FF), sendo menos freqüentes nos pares discordantes quanto ao sexo (MF).

Não é fácil explicar essa distribuição. Assim, se a maior vulnerabilidade dos conceitos masculinos fosse a causa do maior número de óbitos nos gêmeos MM, dever-se-ia esperar que os pares MF tivessem mais óbitos do que os FF, o que não ocorreu. Por outro lado, se os pares MZ, que são, reconhecidamente, mais vulneráveis do que os DZ (Chen *et al.*, 1992), fossem a causa de maior mortalidade, dever-se-ia esperar equivalência da taxa de óbitos entre os pares MM e FF, o que também não ocorreu. Em vista disso, parece plausível supor que o gradiente de óbitos perinatais na seqüência MM>FF>MF decorra de uma associação de três fatores, a saber: maior vulnerabilidade dos conceitos masculinos, monozigosidade e concordância de óbitos perinatais, isto é, o óbito de um dos elementos do par poderia facilitar a ocorrência do óbito do outro elemento.

Outra constatação feita nesse trabalho é que a taxa de óbitos perinatais vem decrescendo em Campinas, tanto nos gêmeos quanto nos nascidos de parto único, podendo essa tendência ser atribuída à melhoria da assistência pré- e perinatal nessa cidade, que conta com duas Faculdades de Medicina de alto nível. É curioso, porém, que o decréscimo de óbitos perinatais está sendo feito de modo mais acentuado nos recém-nascidos do sexo feminino.

## REFERÊNCIAS

- Alfieri, A., Gatti, I. & Alfieri, A.C. Weight and height growth in twins and children born in the last decade. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 36: 209-211, 1987.
- Alikani, M., Noyes, N., Cohen, J. & Rosenwaks, Z. Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Human Reprod.* 9: 1318-1321, 1994.
- Allen, G. & Schechter, J. Ease of conception in mothers of twins. *Soc. Biol.* 18: 18-27, 1971.
- Allen, G. & Parisi, P. Trends in monozygotic twinning rates by maternal age and parity. Further analysis of Italian data, 1949-1985, and rediscussion of US data, 1964-1985. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 39: 317-328, 1990.
- Apgar, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Anesth. Analg.* 32: 260-267, 1953.
- Araujo, A.M. & Salzano, F.M. Parental characteristics and birth weight in a Brazilian population. *Hum. Biol.* 47: 37-43, 1975.
- Araujo, A.M. & Salzano, F.M. Congenital malformations, twinning and associated variables in a Brazilian population. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 24: 31-39, 1975.
- Arizawa, M., Suehara, N., Takemura, T. & Nakayama, M. Monozygotic twins discordant for sex. *Acta Obstet. Gynecol. Jap.* 40: 1479-1482, 1988.
- Armitage, P., Boyd, J.D., Hamilton, W.J. & Rowe, B.C. A statistical analysis of a series of birth-weights and placental weights. *Hum. Biol.* 39: 430-444, 1967.
- Barr, A. & Stevenson, A.C. Stillbirths and infant mortality in twins. *Ann. Hum. Genet.* 25: 131-140, 1961.
- Beiguelman, B. & Villarroel-Herrera, H.O. Sex ratio of twins in a southeastern Brazilian population. *Braz. J. Genet.* 15:707-711, 1992.
- Beiguelman, B. & Villarroel-Herrera, H.O. Factors influencing the decline of twinning incidence in a southeastern Brazilian population. *Braz. J. Genet.* 16: 793-801, 1993.
- Beiguelman, B. & Franchi-Pinto, C. Perinatal mortality among twins and singletons in a city in southeastern Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 23: 15-23, 2000.

- Beiguelman, B., Franchi-Pinto, C. & Magna, L.A. Biological and social traits associated with twinning among Caucasoids and Negroids. *Braz. J. Genet.* 20: 311-318, 1997.
- Beiguelman, B., Franchi-Pinto, C., Dal Colletto, G.M. & Krieger, H. Annual variation of sex ratio in twin births and in singletons in Brazil. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 44: 163-168, 1995.
- Beiguelman, B., Franchi-Pinto, C., Krieger, H. & Magna, L.A. Twinning rate in a southeastern Brazilian population. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 45: 317-324, 1996.
- Beiguelman, B., Dal Colleto, G.M., Franchi-Pinto, C. & Krieger, H. Birth weight of twins. 1. The fetal growth patterns of twins and singletons. *Genet. Mol. Biol.* 21: 151-154, 1998.
- Belitzky, R., Fescina, R.E. & Ucieda, F. Definiciones y terminologias aplicables al periodo perinatal. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y modificaciones de la F.I.G.O. *Publicación Científica del CLAP 757*: 136-147, 1978.
- Benirschke, K. Chimerism, mosaicism and hybrids. *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Cong. Hum. Genet., Excerpta Medica*, Amsterdam: 212-231, 1972.
- Benirschke, K. Multiple gestation, incidence, etiology and inheritance. Em *Maternal fetal medicine-principles and practice*. Creasy, R.K. & Resnik, R. (Eds.), 3<sup>a</sup>. ed., Saunders, Philadelphia, 1994.
- Benirschke, K. & Kim, C.K. Multiple pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 288: 1329-1336, 1973.
- Bertranpetit, J. & Marin, A. Demographic parameters and twinning: a study in Catalonia, Spain. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 37: 127-135, 1988.
- Blickstein, I. & Weissman, A. Birth weight discordancy in male-first pairs of unlike-sexed twins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162: 661-663, 1990.
- Bomsel-Helmreich, O. & Papiernik-Berkhauer, E. Delayed ovulation and monozygotic twinning. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 25: 73-76, 1976.
- Bonnelykke, B., Sogaard, J. & Nielsen, J. Seasonality in twin birth rates. Denmark, 1936-1984. *J. Epidemiol. Community Health* 41: 338-343, 1987.
- Brackenridge, C.J. The secular variation of Australian twin births over fifty years. *Ann. Hum. Biol.* 4: 559-564, 1977.
- Bressers, W.M.A., Eriksson, A.W., Kostense, P.J. & Parisi, P. Increasing trend in the monozygotic twinning rate. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 36: 397-408, 1987.
- Buckler, J.M.H. & Buckler, J.B. Growth characteristics in twins and higher order multiple births. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 36: 197-208, 1987.

- Bulmer, M.G. The effect of parental age, parity and duration of marriage on the twinning rate. *Ann. Hum. Genet.* 23: 454-458, 1959.
- Busjahn, A., Knoblauch, H., Faulhaber, H.D., Aydin, A., Uhlmann, R., Tuomilieto, J., Kaprio, J., Jedrusik, P., Januszewicz, A., Strelau, J., Schuster, H., Luft, F.C. & Muller-Myshok, B. A region of chromosome 3 is linked to dizygotic twinning. *Nat Genet* 26: 398-399, 2000.
- Castilla, E.E., Lopez-Camelo, J.S., Orioli, I.M., Sánchez, O. & Paz, J.E. The epidemiology of conjoined twins in Latin America. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 37: 111-118, 1988.
- Channing, C.P. & Tsafiriri, A. Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the ovary *in vitro*. *Metabolism* 26: 413-468, 1977.
- Chen, C.J., Lin, T.M., Chang, C. & Cheng, Y.J. Epidemiological characteristics of twinning rates in Taiwan. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 36: 335-342, 1987.
- Chen, C.J., Wang, C.J., Yu, M.W. & Lee, T.K. Perinatal mortality and prevalence of major congenital malformations of twins in Taipei City. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 41: 197-203, 1992.
- Chown, B., Lewis, M. & Bowman, J.M. A pair of newborn blood chimeric twins. *Transfusion* 3: 494- 495, 1963.
- Colletto, G.M.D.D., Segre, C.A. & Beiguelman, B. Twinning rate in a sample of a Brazilian hospital with a high standard of reproductive care. *São Paulo Medical J.* 119: 216-219, 2001.
- Committee on Fetus and Newborn. American Academy of Pediatrics. *Pediatrics* 78:1148-1149.
- Cummins, J.M., Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. *Zygote* 6 : 213-222, 1998.
- Czeizel, A. Unexplainable demographic phenomena of multiple births in Hungary. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 22 (Suppl.): 214-218, 1974.
- 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.
- Dandekar, P.V. & Talbot, P. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 135-143, 1992.

- Dandekar, P.V., Martin, M.C. & Glass, R.H. Maturation of immature oocytes by coculture with granulose cells. *Fertil. Steril.* 55: 95-99, 1991.
- Derom, C., Vlietinck, R., Derom, R., Van den Berghe, H. & Thiery, M. Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet I*: 1236-1238, 1987.
- Doherty, J.D.H. Perinatal mortality in twins, Australia, 1973-1980:II- maternal age, lethal congenital malformations and sex. *Acta Genet.Med. Gemellol.* 37: 321-329, 1988.
- Edwards, J.H., Dent, T. & Kahn, J. Monozygotic twins of different sex. *J. Med. Genet.* 3: 117-123, 1966.
- Elwood, J.M. Changes in the twinning rate in Canada 1926-1970. *Brit. J. Prev. Soc.Med.* 27: 236-241, 1973.
- Essel, J.K. & Opai-Tetteh, E.T. Twin birth-weight discordance in Transkey. *S. Afr. Med. J.* 84: 69-71, 1994.
- Fanaroff, A.A. & Martin, R.J. *Neonatal-perinatal Medicine: Diseases of the fetus and infant.* 5a. ed., vol.2, Mosby-Yearbook, New York, NY, USA, 1992.
- Forrest, J.D. & Singh, S. The sexual and reproductive behavior of American women, 1982-1988. *Fam. Plann. Perspect.* 22: 206-214, 1990.
- Franchi-Pinto, C. *Incidência, sazonalidade, razão de sexo e outros aspectos da biologia da gemelaridade.* Tese de Doutorado, UNICAMP, 1996.
- Fujimoto, A., Boelter, W.D., Sparkes, R.S., Lin, M.S. & Battersby, K. Monozygotic twins of discordant sex both with 45,X/46,X,idic(Y) mosaicism. *Am. J. Med. Genet.* 41: 239-245, 1991.
- Galton, F. The history of twins, as a criterion of the relative powers of nature and nurture. *Royal Anthropol. Inst. of Great Britain and Ireland*, 6: 391-406, 1876, cf. Munsinger, 1977, *op. cit.*
- Gedda, L., Brenci, G. & Gatti, I. Low birth weight in twins versus singletons: separate entities and different implications for child growth and survival. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 30: 1-8, 1981.
- Gilula, N.B., Epstein, M.L. & Beers, W.H. Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell. Biol.* 78: 58-75, 1978.
- Gómez, E., Tarín, J.J. & Pellicer, A. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.* 60: 40-46, 1993.
- Goodfellow, S.A., Strong, S.J. & Stewart, J.S.S. Bovine freemartins and true hermaphroditism. *Lancet I*: 1040-1041, 1965.

- Grothe, W. & Rüttgers, H. Twin pregnancies: an 11-year review. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 34: 49-58, 1985.
- Hasbargen, U. Lohse, P. Thaler, C. J. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C-->T mutation. *Hum. Reprod.* 15: 2659-2662, 2000.
- Herschler, M.S. & Fechheimer, N.S. The role of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. *Cytogenetics* 6: 204-212, 1967.
- Hoshi, K., Sugano, T., Endo, C., Yoshimatsu, N., Yanagida, K. & Sato, A. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 60: 149-153, 1993.
- Houshmand, M., Holme, E., Hanson, C., Wennerholm, U.B. & Hamberger, L. Is paternal mitochondrial DNA transferred to the offspring following intracytoplasmic sperm injection? *J. Assist. Reprod. Genet.* 14: 223-227, 1997.
- Huettnner, A.F. *Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates*. MacMillan Co., N.York, 1957.
- Ihering, R. von *Da vida dos nossos animais*. Editora Rotermond, São Leopoldo, RS, 3<sup>a</sup>. ed., 1953.
- Imaizumi, Y. & Inouye, E. Analysis of multiple birth in Japan. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 28: 107-124, 1979
- International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. Conjoined twins- an epidemiological study based on 312 cases. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 40: 325-335, 1991.
- Jablon, S., Neel, J.V., Gershowitz, H. & Atkinson, G.F. The NAS-NRC twin panel: methods of construction of the panel, zygosity diagnosis, and proposed use. *Am. J. Hum. Genet.* 19: 133-161, 1967.
- James, W.H. Sex ratio in twin births. *Ann. Hum. Biol.* 2: 365-378, 1975.
- James, W.H. Coitus-induced ovulation and its implications for estimates of some reproductive parameters. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 33: 547-555, 1984.
- Jeanneret, O. & MacMahon, B. Secular changes in rates of multiple births in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* 14: 410-425, 1962.
- Jirásek, J.E. Principles of reproductive embryology. Em Simpson, J.L.- *Disorders of sexual differentiation*. Academic Press, Nova York, Cap. 2: 51-110, 1976.

- Jost, A., Chodkiewicz, M. & Mauleon, P. Intersexualité du foetus de veau par des androgènes. Comparison entre l'hormone foetale responsable du free-martinisme et l'hormone testiculaire adulte. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 236: 274-276, 1963.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C. Lindahl, K.F. & Yonekawa, H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4542-4546, 1995.
- Karp, L., Bryant, J.I., Tagatz, G., Giblett, E. & Fialkow, P.J. The occurrence of gonadal dysgenesis in association with monozygotic twinning. *J. Med. Genet.* 12: 70-78, 1975.
- Kelly, M.P. Molo, M.W., Maclin, V.M., Binor, Z., Rawlins, R.G. & Radwanska, E. Human chorionic gonadotropin rise in normal and vanishing twin pregnancies. *Fertil. Steril.* 56: 221-224, 1991.
- Keith, L. Mortality and morbidity among twins: recent observations from the United States. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 43: 25-31, 1994.
- Kurosawa, K., Kuromaru, R., Imaizumi, K., Nakamura, Y., Ishikawa, F., Ueda, K. & Kuroki, Y. Monozygotic twins with discordant sex. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 41: 301-310, 1992.
- Landy, H.J. & Keith, L.G. The vanishing twin: a review. *Hum Reprod. Update* 4: 177-183, 1998.
- Lewis, C.M., Healey, S.C. & Martin, N.G. Genetic contribution to DZ twinning. *Am J. Med. Genet.* 61: 237-246, 1996.
- Lichtenstein, P., Kallen, B. & Koster, M. No paternal effect on monozygotic twinning in the Swedish Twin Registry. *Twin Res.* 1: 212-215, 1998.
- Lopes, S., Jurisicova, A. & Casper, R.F. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.* 13: 703-708, 1998.
- Luke, B., Witter, F.R., Abbey, H., Feng, T., Namnoum, A.B., Paige, D.M. & Johnson, T.R.B. Gestational age-specific birthweights of twins versus singletons. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 40: 69-76, 1991.
- Lumme, R.H. & Saarkoski, S.V. Perinatal deaths in twin pregnancy: a 22-year review. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 37: 47-54, 1988.
- Maruri, F. & Azziz, R. Laparoscopic surgery for ectopic pregnancies: technology assessment and public health implications. *Fertil. Steril.* 59: 487-498, 1993.

- McKewon, T. & Record, R.G. Observations on foetal growth of multiple pregnancy in Man. *J. Endocrinol.* 5: 387-401, 1952.
- Meulemans, W.J., Lewis, C.M., Boomsma, D.I., Derom, C.A., Van den Berghe, H., Orlebeke, J.F., Vlietinck, R.F. & Derom, R. M. Genetic modeling of dizygotic twinning in pedigrees of spontaneous dizygotic twins. *Am. J. Med. Genet.* 61: 258-263, 1996.
- Milham Jr., S. Pituitary gonadotrophin and dizygotic twinning. *Lancet* 2: 566, 1964.
- Moraes, M.H.B. de, Beiguelman, B. & Krieger, H. Decline of twinning rate in Brazil. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 38: 57-63.
- Munsinger, H.- The identical-twin transfusion syndrome: A source of error in estimating IQ resemblance and heritability. *Ann. Hum. Genet.* 40: 307-321, 1977.
- Nylander, P.P.S. The inheritance of DZ twinning. A study of 18.737 maternities in Ibadan, Western Nigeria. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 19: 36-39, 1970.
- Nylander, P.P.S. The factors that influence twinning rates. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 30: 189-202, 1981.
- Ohno, S., Klinger, H.P. & Atkin, N.B. Human oogenesis. *Cytogenetics* 1: 42-51, 1962.
- Parisi, P. & Caperna, G. Twinning rates, fertility and industrialization: a secular study. Em Bonné-Tamir, B. (Ed.) *Human Genetics, Part A: The unfolding genome*. Alan R. Liss, N.York: 375-394, 1982.
- Papiernik, E., Mussy, M.A., Vial, M. & Richard, A. A low rate of perinatal deaths for twin births. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 34: 201-206, 1985.
- Pedreira, C.M., Peixoto, L.I.S. & Ito-Rocha, L.M.G. Estudo da gemelaridade na população de Salvador, Bahia. *Anais da I Reunião Brasil. Genét. Hum.* (Curitiba): 137-140, 1959.
- Phelan, M.C., Pellock, J.M. & Nance, W.E. Discordant expression of fetal hydantoin syndrome in heteroparental dizygotic twins. *N. Engl. J. Med.* 307: 99-101, 1982.
- Picard, R., Fraser, D., Hagay, Z.J. & Leiberman, J.R. Twinning in southern Israel; secular trends, ethnic variation and effects of maternal age and parity. *Europ. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 33: 131-139, 1989.
- Pinkerton, G.D., Carey, H.M. Ost-pill anovulation. *Med. J. Austr.* 1: 220-222, 1976.

- Porter, P. Chimerism and immunological tolerance: a consequence of fraternal twinning in the marmoset. *Diss. Abstr.* 29, 479 B: 601, 1968, cf. Benirschke, 1972 *op. cit.*
- Powers, W.F. Twin pregnancy, complications and treatment. *Obstet. Gynecol.* 42: 795-808, 1973.
- Race, R.R. & Sanger, R. *Blood groups in Man*. Blackwell Scient. Publ., Oxford, 6<sup>a</sup>. ed., 1975.
- Ramos-Arroyo, M.A., Ulbright, T.M., Yu, P.-L. & Christian, J.C. Twin study: relationship between birth weight, zygosity, placentation, and pathologic placental changes. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 37: 229-238, 1988.
- Rankin, J. & Dean, J. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev. Reprod.* 5: 114-121, 2000.
- Reindollar, R.H., Byrd, J.R., Hahn, D.H., Haseltine, F.P. & McDonough, P.G. A cytogenetic and endocrinologic study of monozygotic isokaryotic 45,X/46,XY twins discordant for phenotypic sex: mosaicism versus chimerism. *Fertil. Steril.* 47: 626-633, 1987.
- Rogers, B.O. & Allen, G. Intolerance of dizygotic human twins to reciprocal skin homografts. *Science* 122: 158, 1955.
- Rola-Janicki, A. Multiple births in Poland in 1949-1971. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 22: (Suppl.): 202-209, 1974.
- Rudak, E., Jacobs, P. & Yanagimachi, R. Direct analysis of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913, 1978.
- Schinzel, A.A., Smith, O.W. & Miller, J.R. Monozygotic twinning and structural defects. *J. Pediatr.*, 95:921-930, 1979.
- Schmidt, R., Sobel, E.H., Nitowsky, H.M., Dar, H. & Allen, F.H. Monozygotic twins discordant for sex. *J. Med. Genet.* 13: 64-79, 1976.
- Shoham, Z., Jacobs, H.J. & Insler, V. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effect when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil. Steril.* 59: 1153-1161, 1993.
- Sills, E.S., Moomjy, M., Zaninovic, N., Veeck, L.L., McGee, M., Palermo, G.D. & Rosenwaks, Z. Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Hum Reprod.* 15:890-895, 2000.
- Sorgo, G. Das problem der superfoecundatio in Vaterschaftsgutachten. *Beitr. Gerichtl. Med.* 30: 415-421, 1973.

- Spielmann, W. & Kühnl, P. The efficacy of modern blood group genetics with regard to a case of probable superfecundation. *Hematol. Hung.* 13: 75-85, 1980.
- St John, J., Sakkas, D., Dimitriadi, K., Barnes, A., Maclin, V., Ramey, J., Barratt, C. & De Jonge, C. Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet* 355: 200, 2000.
- Stocks, P. Recent statistics of multiple births in England and Wales. *Acta Genet. Med. Gemellol.1:* 8-13, 1952.
- Susanne, C. & Corbisier, J.V. Les naissances gémellaires en Belgique (1960-1961). *Acta Genet. Med. Gemellol.* 18: 294-320, 1969.
- Terasaki, P.I., Gjertson, D., Bernoco, D., Perdue, S., Mickey, M.R. & Bond, J. Twins with two different fathers identified by HLA. *N. Engl. J. Med.* 299: 590-592, 1978.
- Tsafiriri, A., Pomerantz, S.H. & Channing, C.P. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.* 14: 511-516, 1976.
- Turpin, R., Lejeune, J., Lafourcade, J., Chigot, P.L. & Salmon, C. Présomption de monozygotisme en dépit d'un dimorphisme sexuel: sujet masculin XY e sujet neutre haplo X. *C. R. Acad. Sci. Paris* 252: 2945-2946, 1961.
- Ville, Y., Hecher, K., Ogg, D., Warren, R. & Nicolaidis, K. Successful outcome after Nd:YAG laser separation of chorioangiopagus-twins under sonoendoscopic control. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2: 42-431, 1992
- Voorhorst, F.J., Bouter, L.M., Bezemer, P.D. & Kurver, P.H.J. Maternal characteristics and expected birt weight. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 50: 115-122, 1993.
- Ward, W.S. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 48: 1193-1201, 1993.
- Watson, P. & Campbell, D.M. Preterm deliveries in twin pregnancies in Oxford. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 35: 193-199, 1986.
- Weidling, P.J. *Darwinism and social Darwinism in imperial Germany: The contribution of the cell biologist Oscar Hertwig (1849-1922)*. G, Fischer Verlag, Stuttgart, 1991.
- Weinberg, W. *Arch. Rass. Ges. Biol.* 6: 28, 1909, cf. Busjahn *et al.*, 2000, *op. cit.*
- Wenk, R.E., Brooks, M. & Houtz, T. Heteropaternal dizygotic twinning evidence of human superfecundation. *Lab. Med.* 17: 526-528, 1986.
- Wenk, R.E., Houtz, T., Brooks, M. & Chiafari, F.A. How frequent is heteropaternal superfecundation? *Acta Genet. Med. Gemellol.* 41: 43-47, 1992.

Whittingham, D.G. In-vitro fertilization, embryo transfer and storage. *Brit. Med. Bull.* 35: 105-111, 1979.

Wyshak, G. & White, C. Genealogical study of human twinning. *Am. J. Public Health Nations Health* 55: 1586-1593, 1965.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> ed. Ed. por Knobil, E. & Neill, J.D., Raven Press, Ltd., New York, Cap. 5: 189- 317, 1994.

## CAPÍTULO 2. O DIAGNÓSTICO DA ZIGOSIDADE

### EMPREGO DE CARACTERES MONOGÊNICOS

A atribuição de monozigosidade ou de dizigosidade aos gêmeos pode ser feita por intermédio da investigação da concordância dos gêmeos em relação a marcadores genéticos, os quais podem ser polimorfismos de DNA, como os genes de locos de *mini-satélites*, também conhecidos pela sigla STR (do inglês, *short tandem repeat*), usados mais modernamente, e(ou) polimorfismos genéticos clássicos como os grupos sanguíneos eritrocitários, os grupos do sistema HLA, as haptoglobinas, os grupos Gm etc. Quaisquer que sejam os marcadores, o método utilizado para investigar a zigosidade dos gêmeos tem, como princípio básico, que essa investigação somente é necessária em pares de gêmeos do mesmo sexo, já que os discordantes quanto ao sexo são, regra geral, dizigóticos (DZ), pois, como já vimos no capítulo anterior, são raríssimos os gêmeos monozigóticos (MZ) compostos por um elemento do sexo masculino e outro do sexo feminino.

O método utilizado para a investigação da zigosidade é probabilístico e tem por objetivo calcular a probabilidade de um par de gêmeos, ainda que DZ, ser concordante em relação a uma série de caracteres. Se essa probabilidade for muito pequena, o que equivalerá a uma grande probabilidade de monozigose, rejeitar-se-á a hipótese de dizigosidade em favor da de monozigosidade. Nesse método, a primeira situação a ser levada em conta diz respeito à frequência com que os pares DZ e os MZ ocorrem entre os gêmeos da população da qual se originam, pois essas frequências são tomadas como estimativas da probabilidade de ocorrência desses pares. Assim, se a investigação da zigosidade for feita em um lugar onde a proporção de DZ e de MZ entre os gêmeos é, respectivamente, 55% e 45%, admitiremos que um par de gêmeos concordantes quanto ao sexo tem probabilidade igual a 55% de ser um par DZ e que a probabilidade de esse par ser MZ é 45%. Se a investigação da zigosidade for feita em uma localidade onde 70% dos gêmeos são DZ e 30% são MZ é claro que admitiremos *a priori* que um par de gêmeos do mesmo sexo tem probabilidade igual a 70% de ser DZ.

A segunda situação que é levada em conta nesse método é a probabilidade de concordância do par de gêmeos DZ quanto ao sexo. Se aceitarmos que a probabilidade de nascer um indivíduo do sexo masculino é, praticamente, a mesma de nascer um do sexo feminino, tem-se que a probabilidade de um par de gêmeos DZ ser do mesmo sexo é igual a 0,5 ou 50 %. Em relação aos pares MZ, essa probabilidade é, evidentemente, sempre 1 ou 100 %, pois aceitamos que, com certeza, os pares MZ são concordantes quanto ao sexo.

Quando os polimorfismos genéticos utilizados para a comparação dos gêmeos são os marcadores genéticos clássicos, devemos considerar quatro situações diferentes (Beiguelman, 1971<sub>a</sub>), conforme se conheça:

- a) o genótipo dos gêmeos e o de seus pais;
- b) o genótipo dos pais, mas não o dos gêmeos;
- c) somente o fenótipo dos gêmeos e o de seus pais;
- d) somente a constituição genotípica ou fenotípica dos gêmeos;

mas, quando se trabalha com mini-satélites, temos que levar em conta apenas a primeira e a última dessas situações (a e d), porque, a investigação do DNA sempre permite a determinação do genótipo dos indivíduos examinados.

#### **a) O genótipo dos gêmeos e de seus pais é conhecido**

Quando se conhece a constituição genotípica dos gêmeos e a de seus pais, o diagnóstico da zigosidade é muito simples. Para exemplificar, consideremos, inicialmente, os resultados da investigação dos alelos pertencentes a oito locos STR de um casal caucasóide e de suas filhas gêmeas (Tabela 1.2) e admitamos que, na população de origem desse casal, a frequência de pares DZ entre os nascimentos gemelares é estimada em 55%.

Os dados da Tabela 1.2 permitem concluir que uma criança gerada pelo casal em estudo tem probabilidade igual a 50% de ser 9-10 no loco F13B, 50% de ser 5-5 no loco CD4, 25% de ser 11-14 no loco PLA2A1, 25% de ser 10-12 no loco CSF1PO, 25% de ser 6-9 no loco THO1, 50% de ser 8-11 no loco TPOX, 25% de ser 6-18 no loco vWA e 25% de ser 11-11 no loco LPL. Como consequência, pode-se concluir que, *dado que* o genótipo de uma filha de um casal como o da Tabela 1.2 é 9-10 no loco F13B, a probabilidade de sua gêmea ter o mesmo genótipo, apesar de ser DZ, é 50%. De fato, por se tratar de

*probabilidade condicional*, tem-se  $P(9-10. 9-10 | 9-10) = \frac{0,50 \times 0,50}{0,50} = 0,50$ . De modo

análogo, chegamos à conclusão que *dado que* o genótipo de uma filha de um casal como o

da Tabela 1.2 é 11-14 no loco PLA2A1, a probabilidade de sua gêmea DZ ter o mesmo genótipo é 25% porque  $P(11-14. 11-14 | 11-14) = \frac{0,25 \times 0,25}{0,25} = 0,25$ , e assim por diante.

Tabela 1.2 Resultados da investigação dos alelos presentes em oito locos STR de um casal e de suas filhas gêmeas.

Loco	Pai	Mãe	Gêmeas
F13B	8-9	10-10	9-10
CD4	5-5	5-10	5-5
PLA2A1	14-15	11-15	11-14
CSF1PO	11-12	10-11	10-12
THO1	6-7	7-9	6-9
TPOX	8-8	9-11	8-11
vWA	16-17	17-18	16-18
LPL	11-13	10-11	11-11

Com base no exposto, podemos, pois, estimar que a probabilidade conjunta de as gêmeas da Tabela 1.2, mesmo que DZ (probabilidade de 55 %, isto é,  $P = 0,55$ ), serem concordantes quanto ao sexo ( $P = 0,50$ ) e quanto aos genótipos 9-10 do loco F13B ( $P = 0,50$ ), 5-5 do loco CD4 ( $P = 0,50$ ), 11-14 do loco PLA2A1 ( $P = 0,25$ ), 10-12 do loco CSF1PO ( $P = 0,25$ ), 6-9 do loco THO1 ( $P = 0,25$ ), 8-11 do loco TPOX ( $P = 0,50$ ), 16-18 do loco vWA ( $P = 0,25$ ) e 11-11 do loco LPL ( $P = 0,25$ ) é o produto de todas essas probabilidades, o que dá, como resultado,  $P = 0,0000336$ . Por outro lado, estimando-se que a probabilidade de ocorrência de um par MZ entre os gêmeos dessa população é 45% e que, por princípio, se aceita que os pares MZ têm o mesmo sexo e são concordantes em relação a todos os marcadores genéticos estudados, teremos que a probabilidade conjunta de as gêmeas da Tabela 1.2, em sendo MZ ( $P = 0,45$ ), serem concordantes quanto ao sexo e aos genótipos analisados ( $P = 1$ ) é, pois, igual a 0,45. Tais estimativas permitem, agora, calcular a probabilidade de as gêmeas em questão serem DZ em 0,007% e a de elas serem MZ em 99,993% porque:

$$P(DZ) = \frac{0,0000336}{0,45 + 0,0000336} = 0,00007$$

$$P(MZ) = \frac{0,45}{0,45 + 0,0000336} = 0,99993 \text{ ou } P(MZ) = 1 - 0,00007 = 0,99993$$

*Diante dessa altíssima probabilidade de monozigosidade, concluímos, evidentemente, pela aceitação da hipótese de que as gêmeas são MZ.*

Consideremos, agora, que, em vez da investigação dos alelos dos locos STR, o casal e suas filhas gêmeas, bem como duas outras filhas do mesmo casal, nascidas de partos sucessivos, tivessem sido estudadas quanto aos grupos sanguíneos dos sistemas ABO, MNSs, P, Rh, Kell, Duffy, Kidd e Xg, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2.2. Graças às filhas do grupo O (genótipo  $OO$ ),  $P_2$  (genótipo  $P_2P_2$ ) e Xg(a-) (genótipo  $XgXg$ ), tais resultados permitem inferir que o casal tem constituição genotípica  $AO$  no sistema ABO e  $P_1P_2$  no sistema P, e que a mãe tem genótipo  $Xg^aXg$  no sistema Xg,

Os dados da Tabela 2.2 também permitem constatar, facilmente, que uma criança gerada pelo casal em estudo tem probabilidade igual a 25% de ser  $OO$ , 25% de ser  $MS/Ms$ , 25% de ser  $P_2P_2$ , 25% de ser  $CDe/cDE$ , 50% de ser  $Kk$ , 50% de ser  $Fy^aFy^b$ , 50% de ser  $Jk^ak^b$  e, quando do sexo feminino, 50% de ser  $XgXg$ .

Tabela 2.2 Constituição genotípica quanto aos grupos sanguíneos de vários sistemas, de uma família que inclui um par de gêmeas.

Sistema	Pai	Mãe	Gêmeas	Filha	Filha
ABO	$AO$	$AO$	$OO$	$OO$	$A$
MNSs	$MS/NS$	$Ms/Ns$	$MS/Ms$	$MS/Ms$	$Ms/NS$
P	$P_1P_2$	$P_1P_2$	$P_2P_2$	$P_1$	$P_2P_2$
Rh	$CDe/cde$	$CDe/cDE$	$CDe/cDE$	$CDe/CDe$	$CDe/CDe$
Kell	$Kk$	$Kk$	$Kk$	$kk$	$Kk$
Duffy	$Fy^b y^b$	$Fy^a Fy^b$	$Fy^a Fy^b$	$Fy^a Fy^b$	$Fy^b y^b$
Kidd	$Jk^b Jk^b$	$Jk^a k^b$	$Jk^a k^b$	$Jk^b Jk^b$	$Jk^a k^b$
Xg	$XgY$	$Xg^a Xg$	$XgXg$	$Xg^a Xg$	$XgXg$

Pode-se, agora, empregar o mesmo raciocínio utilizado em relação aos dados da Tabela 1.2, para estimar a probabilidade conjunta de as gêmeas da Tabela 2.2 serem DZ (probabilidade de 55 %, isto é,  $P = 0,55$ ) e, mesmo assim, serem concordantes quanto ao sexo ( $P = 0,50$ ) e quanto aos genótipos  $OO$  ( $P = 0,25$ ),  $MS/Ms$  ( $P = 0,25$ ),  $P_2P_2$  ( $P = 0,25$ ),  $CDe/cDE$  ( $P = 0,25$ ),  $Kk$  ( $P = 0,50$ ),  $Fy^a Fy^b$  ( $P = 0,50$ ),  $Jk^a Jk^b$  ( $P = 0,50$ ) e  $XgXg$

( $P = 0,50$ ). Desse modo, obtém-se 0,000067, que é o produto de todas essas probabilidades. Por outro lado, estimando-se que a probabilidade de ocorrência de um par MZ entre os gêmeos dessa população é 45% e que, por princípio, se aceita que os pares MZ têm o mesmo sexo e são concordantes em relação a todos os marcadores genéticos estudados, teremos que a probabilidade conjunta de as gêmeas da Tabela 2.2, em sendo MZ ( $P = 0,45$ ), serem concordantes quanto ao sexo e aos genótipos analisados ( $P = 1$ ) é igual a 0,45. Tais estimativas permitem, agora, calcular a probabilidade de as gêmeas em questão serem DZ em 0,01%, a qual é uma probabilidade muito baixa diante da probabilidade de elas serem MZ (99,9%) porque:

$$P(DZ) = \frac{0,000067}{0,45 + 0,000067} = 0,0001$$

$$P(MZ) = \frac{0,45}{0,45 + 0,000067} = 0,9999 \text{ ou } P(MZ) = 1 - 0,0001 = 0,9999$$

Como se vê, quando se conhece o genótipo dos genitores e dos gêmeos, os sistemas genéticos clássicos também permitem o diagnóstico da zigossidade com a mesma precisão que os polimorfismos de DNA. Os locos dos mini-satélites têm, entretanto, a vantagem de fornecer sempre o genótipo dos indivíduos examinados, isto é, a vantagem de seus alelos serem sempre codominantes, o que nem sempre ocorre com os polimorfismos genéticos clássicos. Além disso, os mini-satélites têm maior probabilidade de serem informativos para o diagnóstico da zigossidade do que os polimorfismos genético clássicos, porque a probabilidade de heterozigose nos locos STR é sempre alta, variando entre 70% a 80% em qualquer população.

De fato, a homozigose de ambos os genitores é um entrave ao diagnóstico da zigossidade. Assim, se tanto o pai quanto a mãe dos gêmeos forem, por exemplo, homozigotos  $OO$  ou  $MS/MS$  ou  $P_2P_2$ , está claro que os gêmeos e quaisquer outros filhos desse casal terão, com certeza, essa mesma constituição genotípica. Tais genótipos não serão, pois, informativos, para o diagnóstico da zigossidade. Do mesmo modo, se tanto o pai quanto a mãe dos gêmeos forem, por exemplo, 5-5 no loco CD4 ou 11-11 no loco PLA2A1 ou 12-12 no loco CSF1PO, é evidente que, também esses locos, não serão informativos para concluir a favor ou contra a hipótese de dizigossidade.

Quando um pesquisador interessado no diagnóstico da zigosidade de gêmeos tiver limitações quanto ao número de locos STR a serem investigados, ele poderá valer-se do recurso alternativo de combinar os resultados alcançados com o estudo de DNA com os obtidos com polimorfismos genéticos clássicos.

Uma observação que parece pertinente diz respeito à probabilidade inicial que é levada em conta no cálculo da zigosidade. Alguns autores preferem seguir a orientação de Maynard-Smith e Penrose (1955) que, em vez de considerar as proporções de DZ e MZ entre os gêmeos como as estimativas das probabilidades de ocorrência desses tipos de gêmeos, usaram a relação entre essas proporções. Assim, se numa população as estimativas forem 55% de DZ e 45% de MZ, a relação a favor dos DZ será 1,222:1 porque  $\frac{0,55}{0,45} = 1,222$ . Se as estimativas das proporções de DZ e MZ forem, respectivamente, 70% e

30%, a relação a favor dos DZ será, evidentemente, 2,333:1 porque  $\frac{0,70}{0,30} = 2,333$ .

Quando essa orientação é seguida, *o resultado final é exatamente o mesmo*, mas as fórmulas utilizadas para obter as probabilidades de dizigosidade e de monozigosidade são diferentes. Para exemplificar, tomemos, inicialmente, os dados da Tabela 1.2, a respeito de gêmeos que pertencem a uma população na qual as proporções de DZ e MZ entre eles são, respectivamente, 55% e 45%. Se seguíssemos o que preconizaram Maynard-Smith e Penrose (1955), a probabilidade conjunta que calcularíamos para um par DZ concordante em relação ao sexo e a todos os caracteres estudados seria:

$$1,222 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,25 \times 0,25 \times 0,25 \times 0,50 \times 0,25 \times 0,25 = 0,000746$$

enquanto que para um par MZ a probabilidade conjunta seria igual a 1. Isso permitiria calcular a probabilidade de dizigose em 0,007% e a de monozigose em 99,993% porque:

$$P(DZ) = \frac{0,000746}{1 + 0,000746} = 0,0007 \text{ e } P(MZ) = \frac{1}{1 + 0,000746} = 0,99993.$$

Em relação aos gêmeos cujos dados estão expressos na Tabela 2.2 teríamos a seguinte probabilidade conjunta para um par DZ :

$$1,222 \times 0,50 \times 0,25 \times 0,25 \times 0,25 \times 0,25 \times 0,50 \times 0,50 \times 0,50 \times 0,50 = 0,000149$$

o que permitiria obter  $P(DZ) = 0,01\%$  e  $P(MZ) = 99,99\%$ , como anteriormente, porque:

$$P(DZ) = \frac{0,000149}{1 + 0,000149} = 0,0001 \text{ e } P(MZ) = \frac{1}{1 + 0,000149} = 0,9999$$

**b) O genótipo dos pais é conhecido, mas não o dos gêmeos.**

Quando, mesmo conhecendo a constituição genotípica dos genitores, somente se consegue o fenótipo dos gêmeos, a estimativa da probabilidade de monozigosidade diminui, em relação à obtida levando em conta a constituição genotípica dos pais e filhos (Beiguelman, 1971<sub>a</sub>). Realmente, se nos dados da Tabela 2.2 os grupos sanguíneos das gêmeas fosse A e P<sub>1</sub>, em vez de O e P<sub>2</sub>, sua constituição genotípica não poderia ser determinada em relação a esses dois fenótipos.

Tendo em mente que uma criança gerada por um casal como o da Tabela 2.2 tem probabilidade igual a 75% de ser do grupo A (25% de ser AA e 50% de ser AO) e, do mesmo modo, 75% de ser do grupo P<sub>1</sub> (25% de ser P<sub>1</sub>P<sub>1</sub> e 50% de ser P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>), pode-se aceitar que a probabilidade conjunta de um par de gêmeas filhas de um casal como o da Tabela 2.2 ser DZ e, apesar disso, ser concordante quanto ao sexo e aos genótipos e fenótipos estudados (A, MS/MS, P1, CDe/cDE, Kk, Fy<sup>a</sup>Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>Jk<sup>b</sup> e XgXg) passaria a ser 0,55×0,5×0,75×0,25×0,75×0,25×0,5×0,5×0,5×0,5 = 0,000604. Em consequência, a probabilidade de essas gêmeas serem DZ seria estimada em 0,13 % e a de serem MZ em 99,87 %, pois:

$$P(DZ) = \frac{0,00604}{0,45 + 0,000604} = 0,0013$$

$$P(MZ) = 1 - 0,0013 = 0,9987 \text{ ou}$$

$$P(MZ) = \frac{0,45}{0,45 + 0,000604} = 0,9987$$

**c) Somente se conhece o fenótipo dos pais e dos gêmeos**

Quando se conhece somente o fenótipo dos pais e dos gêmeos, a estimativa da probabilidade de monozigosidade é menor do que a do item precedente. Assim, por exemplo, se o casal da Tabela 2.2 não tivesse gerado outras filhas, além das gêmeas, e se os grupos sanguíneos dessas gêmeas fossem A e P<sub>1</sub>, não teríamos como saber se o genótipo do casal é AA ou AO, ou se ele é P<sub>1</sub>P<sub>1</sub> ou P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>. Deveríamos, pois, considerar que o casal

poderia ser  $AA \times AA$ ,  $AA \times AO$  ou  $AO \times AO$  e, de modo análogo,  $P_1P_1 \times P_1P_1$ ,  $P_1P_1 \times P_1P_2$  ou  $P_1P_2 \times P_1P_2$ .

Designando por  $p$  e  $r$  as freqüências dos genes  $A$  e  $O$  do sistema ABO, tem-se que, na população em equilíbrio de Hardy e Weinberg, os indivíduos  $AA$  são encontrados com freqüência  $p^2$  e os indivíduos  $AO$  com freqüência  $2pr$ . Desse modo, a freqüência dos casais  $AA \times AA$  será  $p^4$ , a dos casais  $AO \times AO$  será  $4p^2r^2$  e a dos casais  $AA \times AO$  será  $4p^3r$  pois, neste último caso, temos que somar a freqüência dos casais em que o marido é  $AA$  e a esposa  $AO$  ( $2p^3r$ ) com a daqueles em que o marido é  $AO$  e a mulher é  $AA$  ( $2p^3r$ ). Sabendo que na população caucasóide do Estado de São Paulo as estimativas das freqüências dos genes  $A$ ,  $B$  e  $O$  do sistema ABO são, respectivamente,  $p = 0,242$ ,  $q = 0,069$  e  $r = 0,689$  (Beiguelman, 1983), podemos estimar que a freqüência populacional dos casais em apreço é:

$$\begin{aligned}
 AA \times AA &= 0,0034 \\
 AA \times AO &= 0,0391 \\
 \underline{AO \times AO} &= \underline{0,1112} \\
 \text{Total} &= 0,1537
 \end{aligned}$$

Muitos autores seguem a recomendação de Maynard-Smith e Pensrose (1955) e usam essas estimativas para calcular a proporção de cada um desses três tipos de casais entre os casais  $A \times A$ , operando como abaixo:

$$\begin{aligned}
 AA \times AA &= 0,0034 \div 0,1537 = 0,0221 \\
 AA \times AO &= 0,0391 \div 0,1537 = 0,2544 \\
 AO \times AO &= 0,1112 \div 0,1537 = 0,7235
 \end{aligned}$$

Em seguida, levando em conta que os casais  $AA \times AA$  e os casais  $AA \times AO$  podem gerar somente filhos do grupo sanguíneo  $A$  (probabilidade igual a 1) e os casais  $AO \times AO$  têm probabilidade  $\frac{3}{4}$  ou 75% de gerar um filho do grupo  $A$ , estimam as probabilidades de cada um desses casais gerar um filho do grupo sanguíneo  $A$  e de gerar dois filhos com esse mesmo grupo como abaixo:

Casal	Um filho A	Dois filhos A
$AA \times AA$	$1 \times 0,0221 = 0,0221$	0,0221
$AA \times AO$	$1 \times 0,2544 = 0,2544$	0,2544
$AO \times AO$	$0,75 \times 0,7235 = 0,5426$	$(0,75)^2 \times 0,7235 = 0,4070$
Total	0,8191	0,6835

Com base nesses totais calculam a probabilidade de um par de gêmeos DZ gerados por um casal do grupo sanguíneo A ( $A \times A$ ) ser concordante quanto a esse grupo, dado que

$$\text{um desses gêmeos é A em } 83,4 \% \text{ porque } P(A.A|A) = \frac{0,6835}{0,8191} = 0,834.$$

As operações preconizadas por Maynard-Smith e Penrose (1955) com a finalidade de calcular a proporção desses casais é, entretanto, desnecessária, porque chegamos exatamente ao mesmo resultado final quando essas operações não são feitas. De fato, empregando as freqüências dos casais  $A \times A$  segundo o genótipo calculamos as probabilidades de esses casais gerarem um filho e dois filhos do grupo A como abaixo e, igualmente, chegamos à conclusão de que  $P(A.A|A) = 83,4\%$  porque

$$P(A.A|A) = \frac{0,10505}{0,1259} = 0,834.$$

Casal	Um filho A	Dois filhos A
$AA \times AA$	$1 \times 0,0034 = 0,0034$	0,0034
$AA \times AO$	$1 \times 0,0391 = 0,0391$	0,0391
$AO \times AO$	$0,75 \times 0,1112 = 0,0834$	$(0,75)^2 \times 0,1112 = 0,06255$
Total	0,1259	0,10505

Aplicando o mesmo raciocínio aos grupos sanguíneos do sistema P e aceitando para as populações caucasóides do Estado de São Paulo as freqüências estimadas para os genes  $P_1$  e  $P_2$  nas populações européias (Race e Sanger, 1975), isto é  $p = 0,54$  e  $q = 0,46$ , podemos estimar que a freqüência populacional dos casais  $P_1 \times P_1$ , segundo seu genótipo como abaixo:

Casal	Freqüência
$P_1P_1 \times P_1P_1$	$p^4 = 0,0850$
$P_1P_1 \times P_1P_2$	$4p^3q = 0,2897$
$P_1P_2 \times P_1P_2$	$4p^2q^2 = 0,2468$

Visto que os casais  $P_1P_1 \times P_1P_1$  e  $P_1P_1 \times P_1P_2$  podem gerar somente filhos do grupo sanguíneo  $P_1$ , enquanto que os casais  $P_1P_2 \times P_1P_2$  têm 75% de probabilidade de gerar um filho  $P_1$ , pode-se, com base nos dados do quadro abaixo, calcular a probabilidade de um

par de gêmeos DZ gerado por um casal  $P_1 \times P_1$  ser concordante quanto ao grupo sanguíneo

$P_1$ , dado que um desses gêmeos é  $P_1$  em 91,7% porque  $P(P_1.P_1|P_1) = \frac{0,5135}{0,5598} = 0,917$ .

Casal	Um filho $P_1$	Dois filhos $P_1$
$P_1P_1 \times P_1P_1$	1 × 0,0850 = 0,0850	0,0850
$P_1P_1 \times P_1P_2$	1 × 0,2897 = 0,2897	0,2897
$P_1P_2 \times P_1P_2$	0,75 × 0,1851 = 0,1851	$(0,75)^2 \times 0,1851 = 0,1388$
TOTAL	0,5598	0,5135

Uma solução mais geral para estimar a probabilidade de as gêmeas de nosso exemplo serem DZ e concordantes quanto ao grupo sanguíneo A, dado que uma delas tem esse grupo sanguíneo, foi apresentada há algum tempo pelo autor e parte do princípio de que a probabilidade de um casal  $A \times A$  gerar um filho do grupo A é  $P(A) = p^4 + 4p^3r + \frac{3}{4}4p^2r^2$  e que a probabilidade de tal casal gerar dois filhos do grupo A é  $P(A.A) = p^4 + 4p^3r + (\frac{3}{4})^2 4p^2r^2$ .

Daí se conclui que, dado que uma filha de um casal  $A \times A$  é do grupo A, a probabilidade de sua gêmea DZ ter, também, grupo A é calculada por intermédio de:

$$P(A.A|A) = \frac{p^4 + 4p^3r + (\frac{3}{4})^2 4p^2r^2}{p^4 + 4p^3r + \frac{3}{4}4p^2r^2} = \frac{p^2 + 4pr + 2,25r^2}{p^2 + 4pr + 3r^2}$$

Substituindo  $p$  e  $q$  pelos valores estimados para a população caucasóide do Estado de São Paulo, isto é, por  $p = 0,242$ ,  $q = 0,069$  e  $r = 0,689$  (Beiguelman, 1983), pode-se, após resolver a fórmula acima, estimar a probabilidade  $P(A.A|A)$  como, anteriormente, em 83,4 %.

Em relação ao sistema P, a fórmula de cálculo da probabilidade de concordância dos gêmeos dizigóticos no grupo  $P_1$  é ainda mais simples porque levamos em conta apenas os alelos  $P_1$  e  $P_2$ , com frequências  $p$  e  $q$ , respectivamente, sendo  $p = 1 - q$ . Em vista disso, a fórmula abaixo,

$$P(P_1.P_1|P_1) = \frac{p^4 + 4p^3q + (\frac{3}{4})^2 4p^2q^2}{p^4 + 4p^3q + \frac{3}{4}4p^2q^2}$$

após simplificação, pode ser expressa da seguinte maneira (Beiguelman, 1971<sub>a</sub>):

$$P(P_1.P_1 | P_1) = 1 - \frac{0,75q^2}{1+2q}$$

Aceitando para as populações caucasóides do Estado de São Paulo, as frequências estimadas para os genes  $P_1$  e  $P_2$  nas populações européias (Race e Sanger, 1975), isto é,  $p = 0,54$  e  $q = 0,46$ , tem-se, após substituição nessa última fórmula, que a gêmea DZ da filha  $P_1$  de um casal  $P_1 \times P_1$  como o da Tabela 2 tem probabilidade igual a 91,7 % de ter o mesmo grupo sanguíneo.

Para chegar a esse resultado poderíamos, ainda, ter seguido outro raciocínio (Beiguelman, 1971<sub>a</sub>). De fato, em relação ao grupo sanguíneo  $P_1$ , poderíamos ter considerado, inicialmente, que a probabilidade de um indivíduo da população à qual pertencem os gêmeos ter o genótipo  $P_1P_2$ , dado que ele é do grupo  $P_1$  é  $P(P_1P_2 | P_1) = \frac{2pq}{p^2 + 2pq} = \frac{2q}{1+q}$ . Se um par de gêmeos do grupo  $P_1$  tem genitores com esse fenótipo ( $P_1 \times P_1$ ), pode-se considerar a probabilidade de ambos os genitores serem heterozigotos  $P_1P_2$ , isto é  $\left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2$  e a de que pelo menos um desses genitores ser homozigoto  $P_1P_1$ , isto é,  $1 - \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2$ . Se ambos os genitores forem heterozigotos  $P_1P_2$ , a probabilidade de eles gerarem um filho do grupo  $P_1$  será, evidentemente, igual a  $\frac{3}{4}$ , mas se pelo menos um deles for homozigoto  $P_1P_1$ , ter-se-á a certeza de que seus filhos somente poderão ser do grupo  $P_1$ . Por conseguinte, a probabilidade de um casal  $P_1 \times P_1$  gerar um filho do grupo  $P_1$  é  $P(P_1) = 1 - \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2 + \frac{3}{4} \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2$  e a de gerar dois filhos do grupo  $P_1$  é  $P(P_1.P_1) = 1 - \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2 + \left(\frac{3}{4}\right)^2 \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2$ . Por isso, dado que o filho de um casal  $P_1 \times P_1$  é do grupo  $P_1$ , a probabilidade de seu gêmeo DZ também o ser, pode ser obtida por meio de

$$P(P_1.P_1 | P_1) = \frac{1 - \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2 + \left(\frac{3}{4}\right)^2 \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2}{1 - \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2 + \frac{3}{4} \left(\frac{2q}{1+2q}\right)^2} = 1 - \frac{0,75q^2}{1+2q}$$

No concernente aos genes do sistema ABO, em que o casal é  $A \times A$  e os gêmeos também são do grupo A, a fórmula de cálculo da probabilidade de concordância dos pares

DZ quanto a esse grupo não pode ser tão simplificada porque, como já vimos, levamos em conta dois dos três alelos (*A*, *B* e *O*), isto é, os genes *A* e *O*, com frequências *p* e *r*. Nesse caso, a probabilidade de concordância dos DZ no grupo A seria obtida por intermédio de:

$$P(A.A|A) = \frac{1 - \left(\frac{2r}{p+2r}\right)^2 + \left(\frac{3}{4}\right)^2 \left(\frac{2r}{p+2r}\right)^2}{1 - \left(\frac{2r}{p+2r}\right)^2 + \frac{3}{4} \left(\frac{2r}{p+2r}\right)^2} = \frac{p^2 + 4pr + 2,25r^2}{p^2 + 4pr + 3r^2}.$$

Qualquer que seja o modo de se obter essas probabilidades, tem-se que a probabilidade conjunta de as gêmeas de nosso exemplo serem DZ e concordantes quanto ao sexo e aos genótipos e fenótipos estudados seria, nesse caso, estimada em 0,00082 porque:

$$0,55 \times 0,5 \times 0,834 \times 0,25 \times 0,917 \times 0,25 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 = 0,00082$$

Isso permite estimar as probabilidades de dizigosidade e de monozigosidade dessas gêmeas em 0,18 % e 99,82 %, respectivamente, porque:

$$P(DZ) = \frac{0,00082}{0,45 + 0,00082} = 0,0018$$

$$P(MZ) = \frac{0,45}{0,45 + 0,00082} = 0,9982$$

Se em nosso exemplo um dos cônjuges e as gêmeas manifestassem o fenótipo dominante e o outro cônjuge o fenótipo recessivo, isto é, se, por acaso, o marido e as gêmeas fossem do grupo A e a esposa do grupo O, o cálculo da probabilidade de concordância das gêmeas quanto ao fenótipo teria que ser diferente. De fato, nesse caso teríamos que levar em conta os casais compostos por marido AA ( $p^2$ ) e esposa OO ( $r^2$ ), cuja frequência na população é  $p^2r^2$ , e os casais compostos por marido AO ( $2pr$ ) e esposa OO ( $r^2$ ), cuja frequência na população é  $2pr^3$ . Sabendo que os casais marido AA × esposa OO podem gerar somente filhos do grupo sanguíneo A e que os casais marido AO × esposa OO têm probabilidade igual a 1/2 ou 50% de gerar um filho do grupo A e  $(1/2)^2$  ou 25% de gerar dois filhos com esse grupo sanguíneo, poderemos escrever que a probabilidade de um casal composto por marido do grupo A e mulher do grupo O gerar um filho do grupo A é  $P(A) = p^2r^2 + 0,5 \times 2pr^3 = p^2r^2 + pr^3$ . A probabilidade de um casal desse tipo gerar dois filhos do grupo A é, pois,  $P(A.A) = p^2r^2 + 0,25 \times 2pr^3 = p^2r^2 + 0,5pr^3$ . Disso resulta que a probabilidade de um par de gêmeas DZ geradas por um casal composto por

marido A e esposa O ser concordante no grupo A dado que uma delas tem esse grupo pode ser obtida por intermédio de:

$$P(A.A.|A) = \frac{p^2r^2 + 0,5pr^3}{p^2r^2 + pr^3} = \frac{p + 0,5r}{p + r}$$

Substituindo  $p$  e  $r$  pelas estimativas de suas frequências na população, isto é, respectivamente, por 0,242 e 0,689, verificaremos que essa probabilidade é de 63%.

Quando se leva em conta dois alelos apenas, essa fórmula geral fica ainda mais simplificada. De fato, consideremos um casal composto por marido do grupo sanguíneo  $P_1$  e esposa do grupo  $P_2$  cujas filhas gêmeas são do grupo  $P_1$ . Em relação a esse tipo de casal sabemos que o marido pode ter genótipo homocigoto  $P_1P_1$  ou heterocigoto  $P_1P_2$  e que os casais marido  $P_1P_1 \times$  esposa  $P_2P_2$ , que ocorrem na população com frequência  $p^2q^2$ , podem gerar somente filhos do grupo sanguíneo  $P_1$ , enquanto que os casais marido  $P_1P_2 \times$  esposa  $P_2P_2$ , que ocorrem na população com frequência  $2pq^3$ , podem gerar um filho do grupo  $P_1$  com probabilidade igual a  $\frac{1}{2}$  ou 50% e dois filhos com esse grupo com probabilidade igual a  $(\frac{1}{2})^2$  ou 25%. Isso permite escrever que a probabilidade de um casal composto por marido  $P_1$  e esposa  $P_2$  gerar um filho do grupo  $P_1$  é  $P(P_1) = p^2q^2 + pq^3$  e que a probabilidade de tal casal gerar dois filhos do grupo  $P_1$  é  $P(P_1.P_1) = p^2q^2 + pq^3$ . Disso resulta que a probabilidade de um par de gêmeas DZ geradas por um casal composto por marido  $P_1$  e esposa  $P_2$  ser concordante quanto ao grupo  $P_1$  dado que uma delas manifesta esse grupo pode ser calculada a partir de  $P(P_1.P_1|P_1) = \frac{p^2q^2 + 0,5pq^3}{p^2q^2 + pq^3}$ . Essa fórmula, depois de simplificada, e lembrando que  $p + q = 1$ , passa a ser escrita como  $P(P_1.P_1|P_1) = p + 0,5q$ . Substituindo  $p$  e  $q$  por suas estimativas encontradas em Race e Sanger (1975) tem-se  $P(P_1.P_1|P_1) = 0,54 + 0,23 = 0,77$ .

#### **d) Não se conhece o genótipo ou o fenótipo dos genitores dos gêmeos**

Quando conhecemos apenas a constituição fenotípica ou genotípica dos gêmeos, por não ser possível o exame de seus genitores, a determinação da probabilidade de dizigotidade e de monozigotidade é um pouco mais elaborada e devemos analisar separadamente os sistemas dialélicos e polialélicos.

Para entender o cálculo da probabilidade de concordância de pares DZ em relação a

um caráter dialélico, consideremos um par de alelos autossômicos  $A, a$ , com frequências iguais, respectivamente, a  $p$  e  $q = 1 - p$ . Aceitemos, ainda, que os genótipos  $AA, Aa$  e  $aa$  são encontrados na população com frequências iguais, respectivamente, a  $p^2, 2pq$  e  $q^2$ , isto é, que a população está em equilíbrio de Hardy e Weinberg quanto a esses genótipos. Se não houver relação de dominância entre esses alelos, existirão três alternativas para os gêmeos de um par DZ serem concordantes, pois ambos poderão ser  $AA$ , ambos  $Aa$  ou ambos  $aa$ .

Dentre os casais que podem originar filhos  $AA$  ( $AA \times AA, AA \times Aa$  e  $Aa \times Aa$ ), um deles,  $AA \times AA$ , que ocorre com frequência  $p^4$ , é capaz de gerar somente filhos com o genótipo  $AA$ . Os casais  $AA \times Aa$ , que ocorrem com frequência  $4p^3q$ , têm probabilidade  $\frac{1}{2}$  de gerar um filho com o genótipo  $AA$ , ao passo que os casais  $Aa \times Aa$ , que ocorrem com frequência  $4p^2q^2$ , têm probabilidade  $\frac{1}{4}$  de gerar um filho com genótipo  $AA$ . Isso permite escrever que a probabilidade de ocorrência na população de um par de irmãos DZ que sejam ambos  $AA$  será obtida por intermédio de:

$$P(AA.AA) = p^4 + (\frac{1}{2})^2 4p^3q + (\frac{1}{4})^2 4p^2q^2$$

Tal fórmula, depois de simplificada, levando em conta que  $q = 1 - p$ , pode ser escrita como:

$$P(AA.AA) = \frac{p^2(1+p)^2}{4}$$

Em vista do exposto, tem-se que a probabilidade de um par de gêmeos DZ ser concordante em relação ao genótipo  $AA$ , dado que um dos elementos do par tem esse genótipo, é estimada por intermédio de  $\frac{(1+p)^2}{4}$ , porque:

$$P(AA.AA|AA) = \frac{p^2(1+p)^2}{4p^2} = \frac{(1+p)^2}{4}$$

Para calcular a probabilidade de um par de irmãos DZ ser concordante em relação ao genótipo  $Aa$ , deve-se ter em mente que indivíduos com esse genótipo podem ser gerados por casais  $AA \times Aa, AA \times aa, Aa \times Aa$  e  $Aa \times aa$ , os quais ocorrem na população com frequências iguais, respectivamente, a  $4p^3q, 2p^2q^2, 4p^2q^2$  e  $4pq^3$ . Com exceção dos casais  $AA \times aa$ , que somente podem gerar filhos  $Aa$ , todos os outros têm probabilidade  $\frac{1}{2}$  de gerar

um filho  $Aa$ . Por isso, a probabilidade de ocorrer na população um par de irmãos DZ concordantes quanto ao genótipo  $Aa$  será obtida por intermédio de:

$$P(Aa.Aa) = (\frac{1}{2})^2 4p^3q + 2p^2q^2 + (\frac{1}{2})^2 4p^2q^2 + (\frac{1}{2})^2 4pq^3 = pq(1+pq).$$

Em conseqüência, podemos escrever que a probabilidade de um par de gêmeos DZ ser concordante quanto ao genótipo  $Aa$ , dado que um dos gêmeos tem esse genótipo, é obtida por intermédio de  $\frac{1+pq}{2}$ , porque:

$$P(Aa.Aa|Aa) = \frac{pq(1+pq)}{2pq} = \frac{1+pq}{2}.$$

O cálculo da probabilidade de um par de irmãos DZ ser concordante em relação ao genótipo  $aa$  segue o mesmo raciocínio utilizado para o genótipo  $AA$ , isto é, leva-se em conta que são três os tipos de casais capazes de gerá-los,  $Aa \times Aa$ ,  $Aa \times aa$  e  $aa \times aa$ , os quais ocorrem na população com frequências iguais, respectivamente, a  $4p^2q^2$ ,  $4pq^3$  e  $q^4$ . Evidentemente, os casais  $Aa \times Aa$ , que ocorrem na população com frequência  $4p^2q^2$ , têm probabilidade  $\frac{1}{4}$  de gerar um filho  $aa$ , os casais  $Aa \times aa$ , cuja frequência na população é  $4pq^3$ , têm probabilidade  $\frac{1}{2}$  de gerar um filho com esse genótipo, enquanto os casais  $aa \times aa$ , que ocorrem com frequência  $q^4$ , somente podem gerar filhos  $aa$ . Isso permite calcular a probabilidade de ocorrência na população de um par de irmãos DZ por intermédio de  $\frac{q^2(1+q)^2}{4}$ , porque:

$$P(aa.aa) = (\frac{1}{4})^2 4p^2q^2 + (\frac{1}{2})^2 4pq^3 + q^4 = \frac{q^2(1+q)^2}{4}.$$

Em vista disso, pode-se escrever que a probabilidade de um par de gêmeos DZ ser concordante quanto ao genótipo  $aa$  dado que um dos gêmeos exibe esse genótipo pode ser estimada por intermédio de  $\frac{(1+q)^2}{4}$ , porque:

$$P(aa.aa|aa) = \frac{q^2(1+q)^2}{4q^2} = \frac{(1+q)^2}{4}.$$

Nas situações em que há dominância, o que não acontece quando se estudam locos de STR, a probabilidade de concordância dos DZ quanto ao fenótipo recessivo  $aa$  não se altera. No concernente ao fenótipo dominante  $A_$  deve-se levar em conta que os casais

$AA \times AA$ ,  $AA \times Aa$  e  $AA \times aa$  somente geram filhos com fenótipo  $A_{-}$ , e que os casais  $Aa \times Aa$  e  $Aa \times aa$  geram indivíduos  $A_{-}$  com probabilidades iguais a  $\frac{3}{4}$  e  $\frac{1}{2}$ , respectivamente. Daí se conclui que a probabilidade de encontro na população de um par de irmãos DZ que seja  $A_{-}$  é obtida a partir de  $p(1+q) - \frac{pq^2(3+q)}{4}$ , porque:

$$P(A_{-}A_{-}) = p^4 + 4p^3q + 2p^2q^2 + (\frac{3}{4})^2 4p^2q^2 + (\frac{1}{2})^2 4pq^3 = p(1+q) - \frac{pq^2(3+q)}{4}.$$

Pode-se, por isso, escrever que a probabilidade de um par de gêmeos DZ ser concordante quanto ao fenótipo  $A_{-}$  dado que um dos gêmeos exibe esse fenótipo, encontrado na população com probabilidade  $P(A_{-}) = p^2 + 2pq = p(1+q)$ , pode ser estimada por intermédio de:

$$P(A_{-}A_{-} | A_{-}) = 1 - \frac{q^2(3+q)}{4(1+q)}.$$

Para os caracteres polialélicos o raciocínio empregado é o mesmo e, em relação aos homozigotos, as fórmulas de cálculo são exatamente as dos sistemas que levam em conta apenas um par de alelos, porque sempre podemos representar o alelo homozigoto por  $A$ , e todos os outros do sistema polialélico por não- $A$  ou  $\tilde{A}$ . Entretanto, em relação aos heterozigotos, o cálculo para a obtenção das probabilidades de concordância é trabalhoso, pois é necessário levar em consideração a freqüência de todos os tipos de casais que podem gerar filhos com um determinado fenótipo ou genótipo e a contribuição de cada um deles para a geração seguinte. Assim, por exemplo, quando não conhecemos o genótipo ou o fenótipo dos pais de gêmeos que são concordantes quanto ao grupo sanguíneo A do sistema ABO, devemos levar em conta que qualquer um dos casais  $AA \times AA$ ,  $AA \times AO$ ,  $AA \times OO$ ,  $AA \times BO$ ,  $AA \times AB$ ,  $AO \times AO$ ,  $AO \times BO$ ,  $AO \times OO$ ,  $AB \times AO$ ,  $AB \times BO$ ,  $AB \times AB$  e  $AB \times OO$  poderia gerá-los. Em vista disso, podemos escrever que a probabilidade de ocorrência na população de um par de irmãos DZ concordantes quanto ao grupo sanguíneo A é obtida por intermédio de:

$$P(A.A) = p^4 + 4p^3r + 2p^2r^2 + (\frac{1}{2})^2 4p^2qr + (\frac{1}{2})^2 4p^3q + (\frac{3}{4})^2 4p^2r^2 + (\frac{1}{4})^2 2pqr^2 + (\frac{1}{2})^2 4pr^3 + (\frac{1}{2})^2 8p^2qr + (\frac{1}{4})^2 8pq^2r + (\frac{1}{4})^2 4p^2q^2 + (\frac{1}{2})^2 4pqr^2.$$

Com base nessa fórmula e no conhecimento de que as freqüências dos genes  $A$ ,  $B$  e  $O$  do sistema ABO podem ser estimadas como  $p = 0,242$ ,  $q = 0,069$  e  $r = 0,689$  na

população caucasóide do Estado de São Paulo (Beiguelman, 1983), poderíamos, pois, aceitar que, nesse Estado, a probabilidade de encontro de um par de irmãos caucasóides concordantes quanto ao grupo sanguíneo A é  $P(A.A) = 0,2585$  ou 25,85%. Ora, sabendo que no Estado de São Paulo, a probabilidade de encontrar um caucasóide com grupo sanguíneo A é estimada em  $P(A) = p^2 + 2pr = 0,3920$  ou 39,2%, concluímos que a probabilidade de um par de gêmeos DZ caucasóides desse Estado ser concordante quanto ao grupo sanguíneo A dado que um deles tem esse grupo é 65,94% porque  $P(A.A|A) = 0,2585/0,3920 = 0,6594$ .

Para populações européias, como é o caso da população inglesa, existem tabelas (Maynard-Smith e Penrose, 1955; Race e Sanger, 1975) que informam qual a probabilidade de concordância de gêmeos DZ em relação aos sistemas sanguíneos eritrocitários ABO, MNSs, P, Rh, Lutheran, Kell, Duffy, Lewis, Kidd, Yt, Dombrock, Colton e Xg, o que, evidentemente, facilita muito o trabalho de diagnóstico da zigosidade quando não se conhece o genótipo ou o fenótipo dos pais dos gêmeos. Com o emprego desses marcadores genéticos pode-se, mesmo desconhecendo a constituição genotípica ou fenotípica dos pais obter altos valores de probabilidade de monozigose.

Quando se deseja fazer o cálculo da probabilidade de concordância de um par DZ heterozigoto em relação a um loco STR, a situação se torna mais complicada do que no caso dos sistemas sanguíneos eritrocitários ou outros polimorfismos genéticos clássicos, porque cada um desses locos contém muitos alelos. Em compensação, esse cálculo torna-se desnecessário se a investigação da zigosidade de um par de gêmeos, sem informações a respeito de seus genitores, for feita por intermédio do exame de mais de seis locos STR, porque, nesse caso, se o par de gêmeos for concordante em todos os locos, poder-se-á atribuir monozigosidade. Mesmo a discordância em relação a um alelo não servirá para rejeitar a hipótese de monozigosidade, porque sempre é possível a ocorrência de uma mutação, mas duas discordâncias falarão a favor da rejeição dessa hipótese, porque aceitamos ser muito pouco provável que duas discordâncias sejam consequência de duas mutações nesses locos.

## IMPRESSÕES DÍGITO-PALMARES E DIAGNÓSTICO DA ZIGOSIDADE

As impressões dígito-palmares permitem, entre outras observações, a contagem do número total de linhas dermatoglíficas nos dez dedos (TRC, do inglês, *total ridge count*), do número de linhas *a-b*, do número de linhas A'-d e a medida do ângulo *atd*.

Para a contagem do TRC empregam-se os critérios estabelecidos por Bonnevie (1924), segundo os quais, os *arcos* são considerados como tendo zero linhas. Nas *presilhas simples* conta-se o número de linhas que interceptam o segmento de reta traçado do centro da presilha ao centro do trirrádio, enquanto que nos *verticilos* e nas *presilhas duplas*, que possuem dois trirrádios, somente se leva em conta o lado que apresentar maior número de linhas. O número de linhas *a-b* é o número de linhas dermatoglíficas palmares, contadas nas duas mãos, que atravessam o segmento de reta traçado para unir o centro do trirrádio palmar *a*, sob o dedo indicador, com o trirrádio palmar *b*, sob o dedo médio. O número de linhas A'-d refere-se ao número de linhas dermatoglíficas palmares, contadas nas duas mãos, entre o trirrádio palmar *d*, sob o dedo mínimo, e a linha palmar A. O ângulo *atd*, por sua vez, é o ângulo formado pelos segmentos de reta que unem os trirrádios da base do dedo indicador (*a*) e do dedo mínimo (*d*) ao trirrádio palmar axial (*t*). Para mais detalhes, o leitor interessado poderá consultar o capítulo sobre “O exame dos dermatóglifos” de Beiguelman (1982).

De acordo com Lamy *et al.* (1957), nenhum dentre 272 pares de gêmeos MZ apresentou diferença intrapar igual ou superior a 50 linhas quanto à TRC, enquanto 26,5% dentre 185 pares DZ do mesmo sexo ultrapassou essa cifra (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Distribuição, em porcentagem, de 272 pares MZ e 185 DZ segundo a diferença intrapar do número de linhas dermatoglíficas na falange distal dos dedos (Lamy *et al.*, 1957).

Diferença	MZ	DZ
0-10	54,0	21,1
10-20	32,0	20,0
20-30	10,3	9,2
30-40	2,6	14,6
40-50	1,1	8,6
50-60		4,3
60-70		6,5
70-80		5,4
80-90		2,2
90-100		4,9
≥ 100		3,2

No concernente ao número de linhas *a-b* e de linhas *A'-d* (Tabelas 4.2 e 5.2), tem-se que, numa investigação feita em 38 pares MZ, não se constatou, em nenhum desses pares, diferença maior que 12 linhas *a-b* ou maior do que 17 linhas *A'-d*. Nos 90 pares DZ analisados no mesmo estudo, 25,6 % mostraram diferença intrapar superior a 12 linhas *a-b* e 46,7% ultrapassaram 17 linhas *A'-d* de diferença (Beiguelman, 1971<sub>b</sub>).

Tabela 4.2 Distribuição, em porcentagem, de 38 pares MZ e 90 DZ segundo a diferença intrapar do número de linhas *a-b* (Beiguelman, 1971<sub>b</sub>)

Diferença	MZ	DZ
0-3	31,6	22,2
3-6	31,6	17,8
6-9	31,6	14,4
9-12	5,2	20,0
12-15		6,7
15-18		4,4
18-21		5,6
≥21		8,9

Tabela 5.2 Distribuição, em porcentagem, de 38 pares MZ e 90 pares DZ segundo a diferença intrapar do número de linhas *A'-d* (Beiguelman, 1971<sub>b</sub>).

Diferença	MZ	DZ
0-5	50,0	20,0
5-9	28,9	8,9
9-13	15,8	15,5
13-17	5,3	8,9
17-21		13,3
21-25		8,9
25-29		6,7
≥ 29		17,8

Em relação à soma dos ângulos *atd* observados nas duas mãos, sabemos, por intermédio de Maynard-Smith e Penrose (1955), que, em 80 pares MZ, não foi possível encontrar, nesses pares, uma diferença intrapar superior a 45 graus (Tabela 6.2).

Em conseqüência do exposto, pode-se, pois, dizer que, se um par de gêmeos do mesmo sexo apresentar diferença intrapar de TRC igual ou superior a 50 linhas e(ou) 12 ou mais linhas *a-b* e(ou) 17 ou mais linhas *A'-d* e(ou) mais de 45 graus de ângulo *atd*, tal par poderá ser classificado como DZ. Para diferenças intrapar inferiores a esses limites, as porcentagens com que ocorrem as diferenças assinaladas nas Tabelas 3.2 a 6.2 podem ser consideradas como estimativas da probabilidade de essas diferenças serem detectadas em gêmeos MZ e DZ.

Tabela 6.2 Distribuição, em porcentagem, de 80 pares MZ e de 310 pares de irmãos, segundo a diferença intrapar dos ângulos *atd* (Maynard-Smith & Penrose, 1955).

Diferença	MZ	Irmãos
0 - 5	42,50	23,23
5 - 10	31,25	25,16
10 - 15	8,75	15,48
15 - 20	11,25	11,61
20 - 25	1,25	9,68
25 - 30	1,25	4,84
30 - 35	2,50	2,26
35 - 40	-	1,61
40 - 45	1,25	0,97
45 - 50		1,29
≥50		3,87

Para exemplificar, suponhamos que um par de gêmeos do mesmo sexo tenha mostrado diferença intrapar de 8 linhas quanto à TRC, 2 linhas *a-b*, 3 linhas *A'-d* e 4 graus quanto ao ângulo *atd*. Se os gêmeos pertencerem a uma população onde a proporção de MZ é 45 % e a de DZ é 55 %, poderemos, com base nas Tabelas 3.2 a 6.2, calcular a probabilidade conjunta a favor dos DZ como sendo 0,000598, porque:

$$0,55 \times 0,50 \times 0,211 \times 0,222 \times 0,20 \times 0,2323 = 0,000598$$

e a favor dos MZ como sendo 0,016317, porque:

$$0,45 \times 1 \times 0,54 \times 0,316 \times 0,50 \times 0,425 = 0,016317$$

Tais informações permitem estimar a probabilidade de dizigiosidade dos gêmeos de nosso exemplo em 3,5% e a de monozigiosidade em 96,5 % porque:

$$P(DZ) = \frac{0,000598}{0,016317 + 0,000598} = 0,035$$

$$P(MZ) = 1 - 0,035 = 0,965$$

Os dados a respeito das diferenças dermatoglíficas podem ser combinados com os de concordância de marcadores genéticos, o que aumenta a precisão do diagnóstico da zigosidade. Assim, no exemplo dado no item **c**, a respeito das gêmeas que mostravam uma probabilidade conjunta de 0,00082 de serem DZ concordantes quanto ao sexo e aos genótipos e fenótipos A, MS/Ms, CDe/cDE, P<sub>1</sub>, Kk, Fy<sup>a</sup>Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>Jk<sup>b</sup> e XgXg, consideremos que se soubesse que elas diferiam em 11 linhas quanto à TRC, em 6 linhas a-b, em 7 linhas A'-d e em 5 graus do ângulo atd. De acordo com as Tabelas 3.2 a 6.2, essas diferenças dermatoglíficas podem ser encontradas em pares DZ com uma probabilidade conjunta de 0,200×0,178×0,089×0,2516 = 0,000797 e em pares MZ com uma probabilidade conjunta de 0,320×0,316×0,289×0,3125 = 0,009132.

Em decorrência disso, a nova probabilidade conjunta de concordância dos DZ em relação aos caracteres estudados passaria a 0,00082×0,000797 = 0,000000654 e a nova probabilidade conjunta dos MZ em relação a esses mesmos caracteres passaria a ser estimada em 0,45×0,009132 = 0,0041094. Esses dados permite concluir que a probabilidade de as gêmeas serem MZ ficaria ainda mais alta, pois, aumentaria de 99,82% para, praticamente, 100%, pois:

$$P(DZ) = \frac{0,000000654}{0,0041094 + 0,000000654} = 0,00016$$

$$P(MZ) = 1 - 0,00016 = 0,99984$$

## O MÉTODO DIFERENCIAL DE WEINBERG

Mesmo quando não se faz a investigação da zigosidade, é possível obter uma estimativa do número de pares MZ e DZ em uma amostra de gêmeos, bastando para isso, aplicar o clássico *método diferencial de Weinberg* (1901), que se baseia em duas premissas. A primeira delas é a de que, na prática, a probabilidade de nascimento de um menino é idêntica à de nascimento de uma menina, isto é, 0,5 ou 50% em cada caso. A segunda premissa é a de que, em cada par DZ, o sexo de um dos gêmeos é independente do de outro. Em consequência disso, passa-se a estimar as probabilidades de constituição de um par DZ

do sexo masculino, de um par DZ do sexo feminino e de um par DZ discordante quanto ao sexo, respectivamente, por:

$$P(DZ_{MM}) = 0,5 \times 0,5 = 0,25 \text{ ou } 25 \%$$

$$P(DZ_{FF}) = 0,5 \times 0,5 = 0,25 \text{ ou } 25 \%$$

$$P(DZ_{MF}) = 2 \times 0,5 \times 0,5 = 0,50 \text{ ou } 50 \%$$

Dáí se conclui, também, que a probabilidade de os gêmeos de um par DZ serem do mesmo sexo é estimada em 50%, pois  $P(DZ_{MM}) + P(DZ_{FF}) = 0,25 + 0,25 = 0,5$ , o que equívale a dizer que a probabilidade de os gêmeos de um par DZ terem o mesmo sexo é a mesma de eles serem discordantes quanto ao sexo.

Em vista do exposto, para estimar a proporção de pares DZ e MZ em uma amostra de gêmeos bastará conhecer o número de pares de gêmeos discordantes quanto ao sexo (MF). De fato, de acordo com o método diferencial de Weinberg, *o número total de pares DZ será estimado como sendo o dobro do número de pares discordantes quanto ao sexo, enquanto o número de pares MZ será obtido pela diferença entre o total de gêmeos e a estimativa do número de pares DZ.*

Para tornar mais clara a aplicação desse método, tomemos um exemplo tirado de um trabalho de Beiguelman, Franchi-Pinto, Dal Colletto e Krieger (1995) a respeito de 763 pares de gêmeos nascidos na Maternidade de Campinas num período de 10 anos, dentre os quais 205 eram discordantes quanto ao sexo (277 MM, 281 FF e 205 MF). Nesse caso, estimaríamos que, no período estudado, 410 dentre os 763 pares de gêmeos, isto é, 53,7% dos pares deveriam ser DZ e que  $763 - 410 = 353$  ou 46,3% deveriam ser MZ.

Uma apresentação mais geral do método diferencial de Weinberg considera que a frequência de recém-nascidos do sexo masculino e a de recém-nascidos do sexo feminino podem ser aceitas como estimativas das probabilidades  $p$  e  $q$  de nascimento dessas crianças. Desse modo,  $P(DZ_{MM}) = p^2$ ,  $P(DZ_{MF}) = 2pq$  e  $P(DZ_{FF}) = q^2$ . Por ser  $p + q = 1$ , é evidente que  $p^2 + 2pq + q^2$  também é igual a 1 ou 100 %, pois essa expressão é igual a  $(p + q)^2$ . Visto que  $2pq$  é a frequência esperada dos pares DZ discordantes quanto ao sexo, pode-se escrever  $\frac{DZ_{MF}}{DZ} = 2pq$ , de onde se tira que  $DZ = \frac{DZ_{MF}}{2pq}$ .

Nas populações em que  $p$  e  $q$  são semelhantes, pode-se considerar  $p = q = 0,5$ , enquanto o número total de pares DZ passa a ser estimado como sendo o dobro do número

de pares discordantes quanto ao sexo, pois o total de DZ será o número de pares discordantes quanto ao sexo dividido por 0,5.

James (1979, 1984<sub>b</sub>) contestou a validade do método diferencial de Weinberg para estimar a proporção de pares DZ e MZ em amostras de recém-nascidos, porque é sabido que o sexo dos zigotos humanos depende da época em que ocorreu a inseminação durante o ciclo menstrual (Guerrero, 1970, 1974; James, 1971, 1976). O sexo de um dos zigotos de um par DZ não seria, pois, independente, do de outro. Ainda de acordo com James (1979, 1984), entre os pares DZ, os do mesmo sexo excederiam aqueles discordantes quanto ao sexo na proporção de 8:7. Por isso, segundo esse autor, o número de pares DZ em uma amostra de gêmeos não deveria ser estimado como no método diferencial de Weinberg, isto é, por intermédio de  $2DZ_{MF}$ , mas por intermédio de  $\frac{15}{7}DZ_{MF}$ . De fato, se  $\frac{DZ - DZ_{MF}}{DZ_{MF}} = \frac{8}{7}$

é claro que  $DZ = \frac{15}{7}DZ_{MF}$ .

Aplicando a fórmula de James aos dados de Campinas mencionados acima, teríamos que a estimativa do número de pares DZ seria um pouco mais alta, porque obteríamos  $DZ = 439$  ou 57,5 %.

## **A ORGANIZAÇÃO DE UM CADASTRO DE GÊMEOS**

Os pesquisadores interessados em empregar gêmeos para estudos que visam à avaliação do efeito relativo do ambiente e do genótipo na manifestação de caracteres físicos e mentais têm necessidade de organizar um cadastro desses pares. Evidentemente, a organização desses cadastros será muito onerosa se a investigação da zigosidade tiver que ser feita pelo estudo do DNA dos gêmeos ou pela análise da concordância dos pares em relação a muitos polimorfismos.

Entretanto, se os gêmeos estiverem, pelo menos, em idade escolar, pode-se empregar um método muito econômico que permite o diagnóstico da zigosidade com grande precisão e que facilita a obtenção de grandes amostras de gêmeos (Beiguelman, 1971<sub>a</sub>). De acordo com esse método deve-se, inicialmente, tentar rejeitar a hipótese de monozigosidade dos gêmeos do mesmo sexo com base em alguns critérios objetivos, já que os discordantes quanto ao sexo são imediatamente catalogados como pares DZ. Os critérios

objetivos dizem respeito às impressões dígito-palmares e aos grupos sanguíneos eritrocitários de apenas três sistemas, cujos anti-soros são fáceis de obter (sistemas ABO, MNSs e Rh). As impressões dígito-palmares servirão para contar o número total de linhas dermatoglíficas nos dez dedos, o número de linhas *a-b*, o número de linhas *A'-d* e o ângulo *atd*.

Como já foi visto no tópico sobre o emprego das impressões dígito-palmares para o diagnóstico da zigosidade, pode-se classificar como DZ, de imediato e sem necessidade de outros exames, um par de gêmeos do mesmo sexo que apresentar diferença intrapar de TRC igual ou superior a 50 linhas e(ou) 12 ou mais linhas *a-b* e(ou) 17 ou mais linhas *A'-d* e(ou) mais de 45 graus de ângulo *atd*. Desse modo, o exame dos grupos sanguíneos somente será feito nos pares de gêmeos do mesmo sexo, em relação aos quais a hipótese de monozigosidade não pôde ser rejeitada com base no exame dermatoglífico. A sistemática, nesse caso, é a mesma, isto é, tenta-se afastar a hipótese de monozigosidade inicialmente pelo exame dos grupos sanguíneos do sistema ABO, pois os anti-soros necessários à determinação desses grupos são mais baratos. A determinação dos grupos sanguíneos do sistema MNSs somente é feita nos pares concordantes no sistema ABO, do mesmo modo que a investigação dos grupos sanguíneos do sistema Rh é feita apenas nos gêmeos em relação aos quais a hipótese de monozigosidade não pôde ser rejeitada após o exame dermatoglífico e dos grupos sanguíneos do sistema ABO e MNSs.

Os pares triados desse modo constituem uma amostra altamente selecionada de gêmeos, em relação aos quais é grande a probabilidade de se diagnosticar corretamente a zigosidade. Realmente, de acordo com Jablon *et al.* (1967), que fizeram um estudo detalhado de 257 pares de gêmeos adultos do sexo masculino, nos quais investigaram nove sistemas polimórficos (ABO, MNSs, P, Rh, Kell, Duffy, Secretor, Hp e Gm) e caracteres quantitativos, o erro de diagnóstico da zigosidade será de apenas 3,2 % se ele for emitido com base somente na análise da diferença intrapar de TRC, em conjunto com dados a respeito da concordância dos gêmeos quanto à cor dos olhos e dos cabelos, diferenças de estatura e peso corporal, bem como na opinião que os próprios gêmeos têm a respeito de sua zigosidade. Aliás, segundo Jablon *et al.* (1967), o diagnóstico da zigosidade baseado apenas na opinião dos próprios gêmeos está sujeito a um erro tão somente de 4,3 %.

Em vista do exposto, se a amostra de gêmeos a respeito da qual a hipótese de monozigosidade não pôde ser afastada com base em critérios objetivos for, agora, avaliada com base em critérios subjetivos, a probabilidade de erro de diagnóstico poderá diminuir muito. Tais gêmeos deverão, pois, ser examinados quanto ao seu aspecto físico, para que o pesquisador possa emitir sua opinião a respeito da zigosidade dos gêmeos, levando em conta a cor dos olhos e dos cabelos, o tipo de cabelo, a forma do nariz, da boca, dentes, estatura, peso etc. Por outro lado, o pesquisador deverá saber o que pensam os próprios gêmeos a respeito de sua similaridade, perguntando-lhes se eles se acham mais parecidos do que outros pares de irmãos e se seus parentes, colegas, professores e vizinhos têm ou tiveram dificuldade em distinguí-los. Tal tipo de informação deve ser complementada, quando possível, com a dos familiares, sendo de muita valia a opinião da mãe dos gêmeos.

## REFERÊNCIAS

- Beiguelman, B. A investigação da zigosidade. *Ciência e Cultura* 23: 21-30, 1971<sub>a</sub>.
- Beiguelman, B. Genetics of *a-b* and *A'-d* ridge counts. *Rev. Brasil. Pesq. Méd. Biol.* 4: 337-342, 1971<sub>b</sub>.
- Beiguelman, B. *Citogenética Humana*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1982.
- Beiguelman, B. *Farmacogenética e sistemas sangüíneos eritrocitários*. FUNCAMP/Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983.
- Beiguelman, B., Franchi-Pinto, C., Dal Colletto, G.M.D. & Krieger, H. Annual variation of sex ratio in twin births and in singletons in Brazil. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 44: 159-164, 1995.
- Bonnevie, K. Studies on papillary patterns of human fingers. *J. Genet.* 15: 1-112, 1924.
- Guerrero, R. Sex-ratio: a statistical association with the type and time of insemination within the menstrual cycle. *Int. J. Fertil.* 15: 221-225, 1970.
- Guerrero, R. Association of the type and time of insemination within the menstrual cycle with the human sex-ratio at birth. *N. Engl. J. Med.* 291: 1056-1059, 1974.
- Jablon, S., Neel, J.V., Gershowitz, H. & Atkinson, G.F. The NAS-NRC twin panel: methods of construction of the panel, zygosity diagnosis, and proposed use. *Am. J. Hum. Genet.* 19: 133-161, 1967.
- James, W.H. Cycle day of insemination, coital rate and sex-ratio. *Lancet*, 1: 112-114, 1971.

- James, W. H. Timing of fertilization and sex ratio of offspring. A review. *Ann. Hum. Biol.* 3: 549-556, 1976.
- James, W.H. Is Weinberg's differential rule valid? *Acta Genet. Med. Gemellol.* 28: 69-71, 1979.
- James, W.H. Coitus-induced ovulation and its implications for estimates of some reproductive parameters. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 33: 547-555, 1984<sub>a</sub>.
- James, W.H. Twins. *N. Engl. J. Med.* 311: 58, 1984<sub>b</sub>.
- Lamy, M., Frezal, J., Grouchy, J. De & Kelley, J. Le nombre de dermatoglyphes dans un échantillon de jumeaux. *Ann. Hum. Genet.* 21: 374-396, 1957.
- Maynard-Smith, S. & Penrose, L.S. Monozygotic and dizygotic twin diagnosis. *Ann. Hum. Genet.* 19: 273-289, 1955.
- Race, R.R. & Sanger, R. *Blood groups in Man.* Blackwell Scient. Publ., Oxford, 6<sup>a</sup>. ed., 1975.
- Weinberg, W. Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Mehrlingsgeburten beim Menschen. *Pflügers Arch.* 88: 346-430, 1901.

## **CAPÍTULO 3. O ESTUDO DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM GÊMEOS**

A utilização de gêmeos em estudos para avaliar a importância do genótipo na determinação de caracteres quantitativos baseia-se, fundamentalmente, no fato de que a similaridade genotípica dos pares DZ é, em média, aquela apresentada por pares de irmãos gerados sucessivamente, pois, do mesmo modo que eles, são oriundos da união de pares de gametas distintos, produzidos pelos mesmos genitores. Essa é a razão pela qual os pares DZ têm, em média, metade de seus genes idênticos, por terem origem comum. No caso dos gêmeos MZ, cada par é oriundo de um único zigoto, de sorte que os elementos de um par MZ são geneticamente idênticos, isto é, possuem o mesmo genótipo. Aliás, na espécie humana, os pares MZ constituem a única série isogênica.

Nos estudos gemelares para avaliar a importância do genótipo na determinação do fenótipo as seguintes premissas são aceitas, desde que não haja distorções de averiguação:

1. Os gêmeos são uma amostra da população geral, o que equivale a dizer que entre os gêmeos todos os caracteres se distribuem da mesma maneira que na população geral.
2. Os gêmeos são uma amostra de todos os gêmeos.
3. Os elementos de cada par de gêmeos estão sujeitos às mesmas influências do ambiente.
4. O meio ambiente dos gêmeos é, em média, igual ao dos elementos da população geral.
5. As variáveis que atuam sobre os gêmeos MZ, provocando diferenças fenotípicas intrapar, são as mesmas que agem sobre os pares DZ.

Ao aceitar essas premissas, aceita-se, também, que, nos pares MZ, as diferenças intrapar de caracteres quantitativos são determinadas unicamente pelos fatores do ambiente, ao passo que as diferenças intrapar observadas nos pares DZ são causadas pelos fatores responsáveis pelas diferenças nos pares MZ *acrescidas da diversidade genotípica que existe em pares de irmãos*, os quais diferem, em média, em metade de seus genes.

A premissa de que os elementos de cada par de gêmeos estão sujeitos ao mesmo ambiente baseia-se no fato de que, na fase pré-natal, os gêmeos recebem as mesmas

influências da idade materna, da paridade, das condições de saúde da gestante e do efeito da ingestão de medicamentos e outras substâncias. Como se vê, esse postulado não leva em conta que, na fase intra-uterina, é possível que um dos elementos de um par MZ receba suprimento de sangue maior do que o outro ou que, em pares MZ, possa haver repartição desigual do material embrionário que lhes deu origem. Além disso, é possível que os elementos de um par de gêmeos, MZ ou DZ, tenham espaços desiguais para o seu desenvolvimento. Ainda que tais influências possam ser minimizadas, está fora de dúvida que a diversificação do ambiente dos gêmeos se acentua com a idade, sendo maior na idade adulta.

A premissa de que o ambiente dos gêmeos é, em média, igual ao dos elementos da população geral também é passível de críticas, porque os gêmeos estão sujeitos a condições mais adversas do que os conceptos únicos, não só durante a gestação mas, também, no momento do parto e no período neonatal. Isso aliás, contribui para o fato de os gêmeos apresentarem maior taxa de mortalidade perinatal do que os recém-nascidos de parto único (Beiguelman e Franchi-Pinto, 2000).

Também é passível de críticas a premissa de que as variáveis do ambiente que atuam sobre os pares MZ são as mesmas que agem sobre os pares DZ, porque, em consequência de sua maior similaridade, os pares MZ tendem a ser tratados de modo mais semelhante do que os DZ, pelo menos na infância. Por outro lado, visto que o nascimento de gêmeos DZ está correlacionado à idade materna e que o aumento da idade das mães está associado a condições de gestação que são, em média, piores do que as de mães jovens, e a maior risco de anomalias congênitas decorrentes ou não de aberrações cromossômicas, pode-se supor que o ambiente intra-uterino é mais adverso para uma parcela dos gêmeos DZ do que para os MZ.

Essas últimas críticas têm sido refutadas com base em dados que permitem aceitar serem os fatores de distorção apontados contrabalançados por outros, que tendem a acentuar as diferenças entre os elementos de uma parte dos pares MZ e a diminuir as existentes entre os elementos dos pares DZ, mormente se apresentarem quimerismo.

## O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE

Para avaliar a participação do genótipo na variação quantitativa, por intermédio do estudo de gêmeos, é importante o cálculo do *coeficiente de correlação intraclassa* ( $r_i$ ) das medidas feitas nos pares MZ e DZ. Essa é a razão pela qual teceremos algumas considerações suscintas a respeito do seu cálculo. O leitor interessado nas deduções das fórmulas aqui apresentadas poderá consultar outra obra do autor (Beiguelman, 1994).

No modelo teórico para o cálculo do coeficiente de correlação intraclassa, a respeito de uma variável  $x$  com distribuição normal, presume-se que lidamos com uma população de pares, em relação aos quais não se reconhece uma ordem *entre* nem *dentro* desses pares. Os gêmeos se adaptam bem a esse modelo quando lidamos com amostras do mesmo grupo etário e do mesmo sexo, extraídas de uma única população. Desse modo, além de não existirem critérios para classificá-los segundo a idade ou procedência, também não será possível designar qual é o gêmeo número 1 e qual o número 2 de cada par, como se faz, normalmente, em pares como pai-filho, marido-esposa, irmão mais velho-irmão mais novo. Evidentemente, se um caráter depender da idade e os gêmeos não pertencerem a um mesmo grupo etário, poderemos, por análise de regressão, fazer o ajustamento dos dados para idade, anulando, assim, seu efeito. Se, além da idade, o caráter depender do sexo, também se poderá fazer o ajustamento para essa variável, a fim de anular seu efeito.

Tendo em vista o exposto, quando estudarmos um caráter quantitativo em gêmeos e distinguirmos, em cada par, uma medida  $x$  e outra  $x'$ , isso será feito meramente para diferenciar as medidas de cada par, mas não para indicar uma ordem dentro dos pares. É por isso, também, que não se deve falar em desvio padrão de  $x$ , isto é,  $s_x$ , e desvio padrão de  $x'$ , ou seja,  $s_{x'}$ , porque, por hipótese,  $s_x$  não pode diferir de  $s_{x'}$ . Em conseqüência, no caso do coeficiente de correlação intraclassa, sua fórmula geral não pode ser escrita como

$$r_i = \frac{COV_{xx'}}{s_x s_{x'}} \text{ e sim como } r_i = \frac{COV_{xx'}}{s_x^2}.$$

Designando a variância entre os pares por  $s_E^2$  e a variância dentro dos pares por  $s_D^2$ , e lembrando que  $COV_{xx'} = \frac{s_E^2 - s_D^2}{2}$  enquanto  $s_x^2 = \frac{s_E^2 + s_D^2}{2}$ , fica claro que o coeficiente de correlação intraclassa pode ser calculado por intermédio de  $r_i = \frac{s_E^2 - s_D^2}{s_E^2 + s_D^2}$ .

Para obtermos as fórmulas de cálculo das variâncias entre e dentro dos pares, consideremos que retiramos de uma população  $a$  amostras de  $n = 2$  indivíduos não ordenados. Cada par fornecerá uma média  $\bar{x} = \frac{x+x'}{2}$ . A média geral ( $\bar{X}$ ) pode ser obtida de várias maneiras, pois  $\bar{X} = \frac{\sum(x+x')}{2a} = \frac{\sum x + \sum x'}{2a} = \frac{\sum \bar{x}}{a}$ . Nessas fórmulas, e nas seguintes, o símbolo de somatório ( $\Sigma$ ) significa, na realidade,  $\sum_{i=1}^a$  ou seja, a soma de todas as amostras, desde a primeira até a última  $a$  amostra, cada amostra  $a$  sendo constituída por  $n = 2$  indivíduos, isto é, um par de gêmeos.

Visto que  $n = 2$  gêmeos de um par, as fórmulas gerais das somas de quadrados entre ( $SQ_E$ ) e dentro ( $SQ_D$ ) poderão ser escritas como abaixo:

$$SQ_E = n \sum (\bar{x} - \bar{X})^2 = 2 \sum (\bar{x} - \bar{X})^2$$

$$SQ_D = \sum [(x - \bar{x})^2 + (x' - \bar{x})^2]$$

as quais, depois de desenvolvidas, fornecem as seguintes fórmulas de cálculo:

$$SQ_E = \frac{\sum (x+x')^2}{2} - \frac{(\sum x + \sum x')^2}{2a}$$

$$SQ_D = \frac{\sum (x-x')^2}{2}$$

A soma de quadrados total pode ser obtida a partir da adição  $SQ_E + SQ_D$  ou a partir de  $SQ_T = \sum (x - \bar{X})^2 + \sum (x' - \bar{X})^2$  que, depois de desenvolvida fornece a seguinte fórmula de cálculo:

$$SQ_T = \sum x^2 + \sum x'^2 - \frac{(\sum x + \sum x')^2}{2a}$$

Sabendo-se que  $SQ_E$  tem  $a-1$  graus de liberdade, que  $SQ_D$  tem  $(2-1)a$ , isto é,  $a$  graus de liberdade e que  $SQ_T$  tem  $2a-1$  graus de liberdade, as estimativas das variâncias entre, dentro e total são calculadas, respectivamente, a partir de  $s_E^2 = \frac{SQ_E}{a-1}$ ,  $s_D^2 = \frac{SQ_D}{a}$

$$\text{e } s_T^2 = \frac{SQ_T}{2a-1}.$$

Para sabermos se o coeficiente de correlação intraclasse se desvia significativamente de zero, calcula-se  $F = \frac{s_E^2}{s_D^2}$ , que é comparado ao F crítico com  $a-1$  e  $a$  graus de liberdade.

Para exemplificar, consideremos os dados da Tabela 1.3, a respeito das linhas dermatoglíficas palmares A'-d tomadas em 10 pares de gêmeos MZ do sexo masculino, todos de escolas primárias de Campinas, SP, caucasóides e do mesmo grupo etário (Beiguelman, 1971).

Tabela 1.3 Número de linhas dermatoglíficas palmares A'-d contadas em 10 pares de gêmeos monozigóticos.

Par	$x$	$x'$
1	106	111
2	111	117
3	104	104
4	113	111
5	102	104
6	109	111
7	155	143
8	114	112
9	103	114
10	102	104

Designando o primeiro valor de cada par de dados por  $x$  e o segundo por  $x'$ , calculamos, inicialmente os valores abaixo:

$$\Sigma x = 1.119 \quad \Sigma x' = 1.131 \quad \Sigma x + \Sigma x' = 2.250 \quad \Sigma x^2 = 127.461 \quad \Sigma x'^2 = 129.089$$

$$\frac{(\Sigma x + \Sigma x')^2}{2a} = 253.125 \quad \frac{\Sigma (x+x')^2}{2} = 256.377 \quad \frac{\Sigma (x-x')^2}{2} = 173$$

Com esses dados podemos organizar um quadro de análise da variância como o da Tabela 2.3, que serve para calcular o coeficiente de correlação intraclasse. De acordo com os dados da Tabela 2, a contagem de linhas A'-d nos gêmeos MZ possuem coeficiente de correlação alto ( $r_i = 0,91$ ) e significativamente diferente de zero, pois  $F_{(9;10)} = 20,89$  tem  $P < 0,005$ .

Tabela 2.3 Cálculo do coeficiente de correlação intraclasse entre o número de linhas dermatoglíficas palmares A'-d em 10 pares de gêmeos monozigóticos.

Variação	G.L.	SQ	$s^2$	$r_i$	$F_{(9;10)}$
Entre	9	3252	361,33	0,91	20,89
Dentro	10	173	17,30		P<0,005
Total	19	3425	180,26		

As estimativas das variáveis necessárias ao cálculo do coeficiente de correlação intraclasse, inclusive a própria estimativa desse coeficiente, podem vir acompanhadas dos respectivos desvios padrão. De acordo com Kempthorn e Osborne (1961), o desvio padrão

da variância *entre* é obtido por intermédio de  $s_E^2 \sqrt{\frac{2}{a+1}}$  e o desvio padrão da variância

*dentro* é obtido por meio de  $s_D^2 \sqrt{\frac{2}{a+2}}$ . Os desvios padrão da covariância e da variância

total são idênticos e fornecidos por  $\sqrt{\frac{1}{2} \left[ \frac{(s_E^2)^2}{a+1} + \frac{(s_D^2)^2}{a+2} \right]}$ , ao passo que o desvio padrão do

coeficiente de correlação intraclasse é obtido pela resolução de  $\frac{s_E^2 \cdot s_D^2}{(s_E^2 + s_D^2)^2} \sqrt{\frac{8(2a+3)}{(a+1)(a+2)}}$ .

Em relação aos dados da Tabela 2 poderíamos, pois, escrever:

$$s_E^2 = 361,33 \pm 154,07$$

$$s_D^2 = 17,30 \pm 7,06$$

$$\text{cov}_{xx'} = 172,02 \pm 77,12$$

$$s_x^2 = 180,26 \pm 77,12$$

$$r_i = 0,91 \pm 0,05$$

## A COMPARAÇÃO DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM GÊMEOS

Se uma amostra de gêmeos MZ for comparada a uma amostra de pares DZ, em relação a um caráter quantitativo, e se os gêmeos em estudo pertencerem ao mesmo grupo etário, tiverem sido extraídos de uma população homogênea, não estiverem sujeitos a um processo seletivo diferencial, nem forem fruto de casamentos preferenciais, a variância total desse caráter nos pares MZ não deverá diferir significativamente daquela observada nos pares DZ. Se o caráter variar segundo o sexo deveremos obter:

$$s_x^2 \text{MZMM} = s_x^2 \text{DZMM} \quad \text{e} \quad s_x^2 \text{MZFF} = s_x^2 \text{DZFF}$$

Evidentemente, se isso não ocorrer, não deverá haver diferenças significativas entre essas quatro variâncias, isto é:

$$s_x^2 \text{MZMM} = s_x^2 \text{DZMM} = s_x^2 \text{MZFF} = s_x^2 \text{DZFF}$$

Por outro lado, se o caráter em estudo nos gêmeos depender de um componente genético importante, a variância dentro dos pares MZ será significativamente menor do que a dos pares DZ, tanto entre os pares masculinos quanto entre os femininos, isto é,

$$s_D^2 \text{MZMM} < s_D^2 \text{DZMM} \quad \text{e} \quad s_D^2 \text{MZFF} < s_D^2 \text{DZFF}$$

A covariância e o coeficiente de correlação intraclasse mostrarão uma relação oposta à da variância dentro, isto é, nos pares MZ seus valores serão significativamente maiores do que nos pares DZ, o que permite escrever:

$$\begin{aligned} \text{COV}_{\text{MZMM}} > \text{COV}_{\text{DZMM}} \quad \text{e} \quad \text{COV}_{\text{MZFF}} > \text{COV}_{\text{DZFF}} \\ r_{i\text{MZMM}} > r_{i\text{DZMM}} \quad \text{e} \quad r_{i\text{MZFF}} > r_{i\text{DZFF}} \end{aligned}$$

Para exemplificar, consideremos os dados relacionados na Tabela 3.3, a respeito das linhas *a-b* contadas nas palmas das duas mãos de 38 pares MZ (20 do sexo masculino e 18 do sexo feminino) e 52 pares DZ (28 do sexo masculino e 24 do sexo feminino), todos do mesmo grupo etário, caucasóides e do mesmo nível social, averiguados em escolas primárias de Campinas, SP (Beiguelman, 1971).

Tabela 3.3 Coeficientes de correlação intraclasse do número de linhas dermatoglíficas *a-b* de 90 pares de gêmeos e elementos utilizados para o seu cálculo.

Estimativa	MZ	DZ
$s_E^2$	207,54 ± 46,998	140,53 ± 27,299
$s_D^2$	13,08 ± 2,925	65,88 ± 12,679
$cov_{xx'}$	97,23 ± 23,545	37,32 ± 15,050
$s_x^2$	109,01 ± 23,545	102,84 ± 15,050
$r_i$	0,88 ± 0,036	0,36 ± 0,119
<i>a</i>	38	52

Visto que o número médio de linhas *a-b* nos indivíduos do sexo masculino (81,6;  $s = 10,94$ ) não diferiu significativamente do número médio dessas linhas nos indivíduos do sexo feminino (80,7;  $s = 9,43$ ), os gêmeos MZ foram comparados aos DZ sem distinção de sexo. Na Tabela 3.3 é fácil constatar que a variância total dos pares MZ não diferiu significativamente daquela observada nos DZ ( $F_{(75;103)} = \frac{109,01}{102,84} = 1,06$ ;  $P > 0,05$ ). Já a variância dentro dos pares DZ foi significativamente maior do que a estimada para os pares MZ ( $F_{(54;38)} = \frac{65,88}{13,08} = 5,04$ ;  $P < 0,05$ ). Em oposição, tanto a covariância quanto o coeficiente de correlação intraclasse foram maiores nos pares MZ do que nos DZ em ambos os sexos.

Para averiguar se a covariância dos gêmeos MZ é significativamente maior do que a dos DZ, calcula-se um *t* obtido pela divisão da diferença entre as covariâncias pelo desvio padrão dessa diferença. Com base nos dados da Tabela 3.3 tem-se, portanto,

$$t = \frac{97,23 - 37,32}{\sqrt{\frac{(23,545)^2}{75} + \frac{(15,050)^2}{103}}} = 19,345; \text{ G.L.} = 178; P < 0,001.$$

Para investigar se o coeficiente de correlação intraclasse dos gêmeos MZ é significativamente maior do que o dos DZ, pode-se empregar um método de Snedecor (1966), que requer o cálculo da quantidade  $z = \frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+r_i}{1-r_i} \right)$  para os pares MZ ( $z_i$ ) e para

os pares DZ ( $z_2$ ). No exemplo da tabela 3.3 tem-se que  $r_i = 0,88$  dá origem a  $z_1 = 1,3758$  para os gêmeos MZ, enquanto que  $z_2$  é igual a 0,3769 para os gêmeos DZ. A razão entre a diferença  $z_1 - z_2$  e o desvio padrão dessa diferença fornecerá um  $t$  com infinitos graus de liberdade. Sabendo-se que esse desvio padrão é obtido por intermédio de

$$s_{z_1} - s_{z_2} = \sqrt{\frac{1}{a_1 - 3} + \frac{1}{a_2 - 3}} \text{ onde } a_1 \text{ é o número de pares MZ e } a_2 \text{ é o número de pares DZ,}$$

$$\text{podemos calcular } t = \frac{1,3758 - 0,3769}{\sqrt{\frac{1}{35} + \frac{1}{49}}} = 4,516; \text{ G.L.} = 84; P < 0,001.$$

Em resumo, os dados da Tabela 3.3 permitem afirmar que o número de linhas dermatoglíficas palmares  $a-b$  depende, indubitavelmente, de um componente genético importante, pois os pares MZ mostram maior coeficiente de correlação intraclasse do que os DZ e todos os outros elementos que serviram para o cálculo desses coeficientes de correlação são coerentes com a hipótese da existência desse componente.

## **INVESTIGAÇÃO DA HERDABILIDADE DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM GÊMEOS**

Os coeficientes de correlação intraclasse calculados para os pares MZ e DZ estimam qual a proporção da variância fenotípica total ( $V$ ) que é comum aos membros desses pares. Assim, designando a variância aditiva por  $V_A$ , a variância dominante por  $V_D$  e a variância devido a efeitos familiares não-genéticos sobre os gêmeos por  $V_{NG}$ , e desprezando a variância epistática devido à interação, ter-se-á, de acordo com Falconer (1960) que:

$$r_{iMZ} = \frac{V_A + V_D + V_{NG}}{V}$$

$$r_{iDZ} = \frac{0,5V_A + 0,25V_D + V_{NG}}{V}$$

Simbolizando a variância genética total por  $V_G$  que, evidentemente, inclui a variância aditiva e a dominante, pode-se escrever, também,

$$r_{iMZ} = \frac{V_G + V_{NG}}{V}$$

Se a  $V_{NG}$  fosse nula,  $r_{iMZ}$  estimaria a razão  $\frac{V_G}{V}$ , que é denominada *coeficiente de determinação genética* por Smith (1974) e simbolizada por G. Essa razão tem sido chamada por outros autores, como Mather e Jinks (1984), de *herdabilidade sensu lato*, para diferenciá-la da verdadeira herdabilidade (*herdabilidade sensu stricto*,  $h^2$ ), que mede a *porção da variância fenotípica devida à variância aditiva*, isto é,  $\frac{V_A}{V}$ . No caso de  $V_{NG}$  e  $V_D$  terem valores muito baixos, tanto  $r_{iMZ}$  quanto  $2r_{iDZ}$  poderiam estimar a herdabilidade, pois, nessa situação,  $r_{iMZ} = 2r_{iDZ} = \frac{V_A}{V} = h^2$ . Entretanto, pelo fato de não conhecermos  $V_D$  nem  $V_{NG}$ , as estimativas da herdabilidade poderão ser bastante distorcidas. Por isso, para eliminar os efeitos familiares não genéticos, Smith (1974) aceitou que eles são os mesmos para os pares MZ e DZ, e recomenda o cálculo da expressão  $2(r_{iMZ} - r_{iDZ})$ , que estima  $\frac{V_A + 1,5V_D}{V}$ , porque:

$$\frac{2(V_A + V_D + V_{NG} - 0,5V_A - 0,25V_D - V_{NG})}{V} = \frac{V_A + 1,5V_D}{V}$$

Evidentemente, essa fórmula de Smith (1974) também não é boa, pois ela dará uma super-estimativa do coeficiente de determinação genética (G) se  $V_D$  ou a variação epistática forem importantes, e se aproximará da herdabilidade se  $V_D$  for pequena.

Uma postura mais razoável, embora pouco rigorosa, é a de aceitar que a herdabilidade de um caráter quantitativo estimada pelo estudo de gêmeos deve estar por volta de  $r_{iMZ}$  ou  $2r_{iDZ}$ . Assim, os dados da Tabela 3.3 permitiriam dizer que a herdabilidade ( $h^2$ ) do número de linhas dermatoglíficas palmares *a-b* deveria estar entre 0,72 e 0,88 pois  $2r_{iDZ} = 0,72$  e  $r_{iMZ} = 0,88$ .

Em 1929 Holzinger propôs uma fórmula para estimar a herdabilidade de caracteres quantitativos pelo estudo de gêmeos, a qual tem sido amplamente utilizada, apesar das críticas que sofreu. Essa fórmula é expressa do seguinte modo:

$$\frac{r_{iMZ} - r_{iDZ}}{1 - r_{iDZ}}$$

As críticas a essa fórmula têm sentido, porque se  $r_{iMZ}$  e  $r_{iDZ}$  forem substituídos, respectivamente, por  $\frac{V_A + V_D + V_{NG}}{V}$  e  $\frac{0,5V_A + 0,25V_D + V_{NG}}{V}$ , ela passará a significar  $\frac{0,5V_A + 0,75V_D}{V - (0,5V_A + 0,25V_D + V_{NG})}$ , não estimando, pois a herdabilidade.

Por causa dessas objeções, poder-se-ia, dizer que a fórmula clássica de Holzinger (1929) estima uma herdabilidade aproximada, a qual poderia ser denominada “herdabilidade” ou “ $h^2$ ”, devendo ela ser aplicada separadamente para gêmeos do sexo masculino e do sexo feminino, no caso de os caracteres em estudo sofrerem influência do sexo. Se aplicarmos essa fórmula aos dados da Tabela 3.3, poderemos dizer que a “herdabilidade” do número de linhas  $a-b$  é 0,81, porque “ $h^2$ ” =  $\frac{0,88 - 0,36}{1 - 0,36} = 0,81$ .

Se a variância total dos pares MZ puder ser considerada como idêntica à dos pares DZ, por não haver diferença significativa entre as suas estimativas, como é o caso dos dados da Tabela 3.3, a fórmula da “herdabilidade” de Holzinger pode ser transformada numa outra, que leva em conta apenas as variâncias dentro dos pares MZ e DZ de cada sexo, e que pode ser apresentada como abaixo:

$$“h^2” = \frac{s_{DDZ}^2 - s_{DMZ}^2}{s_{DDZ}^2}$$

De fato, partindo de  $r_i = \frac{s_E^2 - s_D^2}{s_E^2 + s_D^2}$ , podemos escrever:

$$1 - r_i = 1 - \frac{s_E^2 - s_D^2}{s_E^2 + s_D^2} = \frac{2s_D^2}{s_E^2 + s_D^2}$$

Essa expressão não se alterará se dividirmos por 2 tanto o numerador quanto o denominador, o que conduz a:

$$1 - r_i = \frac{s_D^2}{\frac{s_E^2 + s_D^2}{2}} = \frac{s_D^2}{s_T^2}$$

que permite escrever:

$$r_i = 1 - \frac{s_D^2}{s_T^2}$$

Se a variância total dos gêmeos MZ for igual à dos gêmeos DZ, poder-se-á escrever:

$$"h^2" = \frac{r_{iMZ} - r_{iDZ}}{1 - r_{iDZ}} = \frac{\left(1 - \frac{s_{DMZ}^2}{s_T^2}\right) - \left(1 - \frac{s_{DDZ}^2}{s_T^2}\right)}{1 - \left(1 - \frac{s_{DDZ}^2}{s_T^2}\right)} = \frac{s_{DDZ}^2 - s_{DMZ}^2}{s_{DDZ}^2}$$

Essa última fórmula, preferida por muitos autores, como Clark (1956), deixa claro que a “herdabilidade” estimada pela fórmula de Holzinger poderia ser definida como *a proporção da variância dentro dos gêmeos DZ que deve ser atribuída a fatores genéticos*. Aplicando essa última fórmula aos dados sobre a contagem das linhas *a-b* (Tabela 3.3), podemos constatar que o valor estimado é da mesma ordem que o obtido pela fórmula que leva em conta os coeficientes de correlação intraclasse dos pares MZ e DZ, pois

$$"h^2" = \frac{65,88 - 13,08}{65,88} = 0,80.$$

Em qualquer caso, a demonstração de que a “herdabilidade” difere significativamente de zero será feita por um F obtido pela divisão da variância dentro dos pares DZ pela variância dentro dos pares MZ. Nos dados da Tabela 3.3 tem-se, pois,  $F_{(52;38)} = 5,04$ ;  $P < 0,005$  o qual indica que a “herdabilidade” das linhas *a-b* difere significativamente de zero nos indivíduos de ambos os sexos.

Uma estimativa aproximada da herdabilidade de caracteres quantitativos em amostras de gêmeos sem diagnóstico da zigosidade pode ser obtida a partir de uma fórmula sugerida pelos Professores Newton E. Morton e Henrique Krieger (Franchi-Pinto, Dal Colletto, Krieger e Beiguelman, 1999). Para isso, leva-se em conta que, em uma amostra de gêmeos, os pares discordantes quanto ao sexo (MF) são, seguramente, DZ. Se o número desses pares for subtraído do número de pares de gêmeos do mesmo sexo (MM + FF), ter-se-á, de acordo com a regra clássica de Weinberg (1901) que, o número restante estimará o número de pares MZ. Assim, por exemplo, em uma amostra de gêmeos com 250 MM, 192 MF e 256 FF, a estimativa do número de pares MZ seria 314, porque  $(250+256) - 192 = 314$ . Esses dados, por sua vez, permitiriam estimar a proporção de pares do mesmo sexo que são MZ em 62% porque  $\frac{314}{506} = 0,62$ .

Se aceitarmos que o coeficiente de correlação intraclasse de um caráter quantitativo em pares MZ estima, aproximadamente, a herdabilidade, isto é, que  $r_{iMZ} = h^2$ , enquanto

entre os pares DZ esse coeficiente estima, aproximadamente, a metade da herdabilidade, isto é,  $r_{DZ} = \frac{h^2}{2}$ , os coeficientes de correlação intraclasse de pares concordantes ( $r_c$ ) e de discordantes quanto ao sexo ( $r_d$ ) poderiam ser expressos como abaixo, onde  $c$  é a proporção de pares MZ entre os gêmeos do mesmo sexo:

$$r_c = ch^2 + \frac{(1-c)h^2}{2}$$

$$r_d = \frac{h^2}{2}$$

Em vista do exposto, pode-se escrever a seguinte equação:

$$r_c + r_d = ch^2 + \frac{(1-c)h^2}{2} + \frac{h^2}{2}$$

que pode ser convertida na seguinte expressão:

$$h^2 = \frac{r_c + r_d}{1 + \frac{c}{2}}$$

Num estudo de gêmeos realizado por Franchi-Pinto, Dal Colletto, Krieger e Beiguelman (1999) nos quais o índice de Apgar foi ajustado para a idade gestacional e sexo, constatou-se que esse índice obtido no primeiro minuto após o nascimento mostrou  $r_c = 0,383$  e  $r_d = 0,169$ . Visto que, nesse estudo,  $c$  foi estimado em 0,62, isso permitiu estimar  $h^2$  como sendo igual a 0,42

Do exposto neste capítulo pode-se concluir que os estudos de gêmeos são ótimos para pôr à prova a hipótese de que um caráter quantitativo depende de um componente genético importante. Contudo, quando se trata de calcular a herdabilidade de um desses caracteres, eles são menos precisos do que os estudos familiares. Realmente, em estudos familiares podemos estimar o valor da herdabilidade por intermédio da regressão das médias das medidas do caráter quantitativo feitas nos filhos e nos genitores. Quando o número de famílias não é grande e existe muita variabilidade em relação ao tamanho das irmandades, pode ser desejável que a obtenção das médias das medidas tomadas nas irmandades seja ponderada com o número de elementos que ela contém (Kempthorne e Tandon, 1953; Reeve, 1955).

Se a regressão for feita entre a média das medidas obtidas em cada irmandade ( $\bar{F}$ ) sobre um dos genitores, isto é, sobre o pai ( $P$ ) ou sobre a mãe ( $M$ ), os coeficientes de regressão  $b_{\bar{F}P}$  ou  $b_{\bar{F}M}$  estimarão, cada qual a metade da herdabilidade, isto é,  $b_{\bar{F}P} = \frac{h^2}{2}$  e  $b_{\bar{F}M} = \frac{h^2}{2}$ , pois cada um dos genitores transmite a metade de seus genes à sua prole. Por outro lado, se a regressão for feita entre a média das medidas tomadas em cada irmandade e a média das medidas verificadas nos genitores ( $\bar{G}$ ), o coeficiente de regressão  $b_{\bar{F}\bar{G}}$  estimará a herdabilidade, isto é,  $b_{\bar{F}\bar{G}} = h^2$ . Isso permite escrever:

$$h^2 = 2 b_{\bar{F}P}$$

$$h^2 = 2 b_{\bar{F}M}$$

$$h^2 = b_{\bar{F}\bar{G}}$$

Apesar de qualquer um desses coeficientes de regressão servir para estimar a herdabilidade, considera-se que a melhor estimativa desse valor é obtida por intermédio de uma combinação dos três coeficientes. Para isso, pondera-se cada coeficiente com a *quantidade de informação da estimativa*, a qual é a invariância ( $I$ ), isto é, o inverso do quadrado do desvio padrão do coeficiente de regressão). Desse modo, pode-se escrever

$I = \frac{1}{s_b^2}$  e expressar a fórmula da estimativa combinada da herdabilidade como abaixo:

$$h^2 = \frac{2b_{\bar{F}P} \cdot I_{\bar{F}P} + 2b_{\bar{F}M} \cdot I_{\bar{F}M} + b_{\bar{F}\bar{G}} \cdot I_{\bar{F}\bar{G}}}{I_{\bar{F}P} + I_{\bar{F}M} + I_{\bar{F}\bar{G}}}$$

Nos estudos familiares, o coeficiente de regressão das medidas tomadas nas mulheres sobre as obtidas nos maridos ( $b_{PM}$ ) permite, por sua vez, verificar se o meio comum exerce influência importante sobre o caráter quantitativo em estudo ou se existem casamentos preferenciais em relação a esse caráter. Assim, se esse coeficiente não diferir significativamente de zero, aceitaremos a hipótese de que não existe influência importante do meio sobre o caráter em estudo, nem que há casamentos preferenciais em relação a esse

caráter.

Para exemplificar, consideremos os resultados da análise de regressão para investigar a herdabilidade da distância intercantal interna feita com base em medidas feitas na região orbitária em pessoas pertencentes a 62 famílias brasileiras, após ajustamento dos valores para idade e sexo (Tabela 4.3). Os valores de  $t$  expressos na Tabela 4.3 permitem concluir que:

- a) o coeficiente de regressão  $b_{PM}$  não difere significativamente de zero, o que permite descartar a hipótese de que houve casamentos preferenciais em relação à distância intercantal interna ou a de que o meio intrafamiliar comum exerceria influência importante sobre esse caráter quantitativo;
- b) todos os outros coeficientes de regressão são significativamente diferentes de zero e permitem estimar a herdabilidade da distância intercantal interna em 31 % porque:

$$h^2 = \frac{(2 \times 0,1574 \times 285,7143) + (2 \times 0,1551 \times 243,9024) + (0,3045 \times 151,5152)}{285,7143 + 243,9024 + 151,5152} = 0,3109$$

Os da Tabela 4.3 indicam, ainda, que não teríamos cometido enganos graves caso tivéssemos estimado a herdabilidade com base em apenas um dos três coeficientes de regressão utilizados. Realmente, tanto  $2b_{\overline{FP}} = 0,3148$  quanto  $2b_{\overline{FM}} = 0,3102$  ou  $b_{\overline{FG}} = 0,3054$  estão próximos do valor estimado ( $h^2 = 0,3109$ ).

Tabela 4.3 Dados para o cálculo da herdabilidade da distância intercantal interna em 62 famílias, após ajustamento dos dados para idade e sexo (Raposo-do-Amaral, 1973).

$B$	$s_b$	I	$t$	G.L.	P
$b_{PM} = 0,0285$	0,1388	-	0,205	60	>0,80
$b_{\overline{FP}} = 0,1574$	0,0594	285,7143	2,650	60	<0,02
$b_{\overline{FM}} = 0,1551$	0,0639	243,9024	2,427	60	<0,02
$b_{\overline{FG}} = 0,3045$	0,0813	151,5152	3,745	60	<0,001

## REFERÊNCIAS

- Beiguelman, B. Genetics of *a-b* and *A'-d* ridge counts *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 4: 337-342, 1971.
- Beiguelman, B. *Curso prático de Bioestatística*. Edições da Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1994.
- Beiguelman, B. & Franchi-Pinto, C. Perinatal mortality among twins and singletons in a city in southeastern Brazil, 1984-1996. *Genet. Molec. Biol.* 23: 15-23, 2000.
- Clark, P.J. The heritability of certain anthropometric characters as ascertained from measurements of twins. *Am. J. Hum. Genet.* 8: 49-54, 1956.
- Falconer, D.S. *Introduction to Quantitative Genetics*. Oliver and Boyd, Edimburgh, 1960.
- Franchi-Pinto, C., Dal Colletto, G.M.D., Krieger, H. & Beiguelman, B. Genetic effect on Apgar score. *Genet. Molec. Biol.* 22: 13-16, 1999.
- Holzinger, K.J. The relative effect of nature and nurture influences on twins differences. *J. Educ. Psychol.* 20: 241-248, 1929.
- Kempthorne, O. & Tandon, O.B. The estimation of heritability by regression of offspring on parent. *Biometrics*, 9: 90-100, 1953.
- Kempthorne, O. & Osborne, R.H. The interpretation of twin data. *Am. J. Hum. Genet.* 13: 320-339, 1961.
- Mather, K. & Jinkjs, J.L. *Introdução à Genética Biométrica*. Traduzido por F.A. Moura Duarte, F.M. Sene, H.A. Rothschild, R.B. Lôbo, N. Mortari & A.P. Schlindwein. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1984.
- Raposo-do-Amaral, C.M. *A herdabilidade das medidas da região orbitária. Contribuição ao estudo do hipertelorismo e telecanto*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1973.
- Reeve, E.C.R. The variance of the genetic correlation coefficient. *Biometrics*, 11: 357-374, 1955.
- Smith, C. Concordance in twins: methods and interpretations. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 454-466, 1974.
- Snedecor, W.G. *Statistical methods*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 5a.ed, 9a. reimpressão, 1966.
- Weinberg, W. Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Mehrlingsgeburten beim Menschen. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 88: 346-430, 1901.

## CAPÍTULO 4. O ESTUDO DE CARACTERES QUALITATIVOS EM GÊMEOS

A investigação de um caráter qualitativo em gêmeos baseia-se na análise da proporção de gêmeos MZ e DZ nos quais apenas um dos elementos de cada par manifesta esse caráter (*pares discordantes*) e de gêmeos em que isso não ocorre (*pares concordantes*). Ela se baseia, também, no princípio de que, excetuando as anomalias relacionadas à gestação e ao nascimento, os gêmeos podem representar a população geral, isto é, a frequência de um caráter observado em gêmeos não difere daquela observada nos indivíduos da população geral.

Se o caráter qualitativo que é objeto de estudo for freqüente na população, ter-se-á, numa amostra de gêmeos colhida aleatoriamente, que os pares MZ e DZ concordantes incluirão tanto aqueles em que os dois elementos exibem o caráter em estudo (++) quanto aqueles em que ambos não o manifestam (--). Se, entretanto, o caráter for raro, como é o caso de numerosas doenças constitucionais e degenerativas, a amostra de gêmeos será averiguada a partir de indivíduos que manifestam esse caráter, isto é, por intermédio de *propósitos*, também chamados de *casos índice* ou *casos probantes*. Em outras palavras, quando o caráter é raro, os pares concordantes incluem apenas aqueles em que esse caráter se manifesta em ambos os elementos de cada par (++) , visto que os pares sem o caráter em estudo (--) não são averiguados.

Visto que a amostra de gêmeos é colhida aleatoriamente para o estudo de caracteres freqüentes, não haverá, nesse caso, distorções de averiguação, o que poderá ocorrer no estudo de caracteres raros. Para corrigir as distorções de averiguação nos dados a respeito de gêmeos com caracteres qualitativos raros, como é o caso de doenças, Allen (1970) recomendou que, nos levantamentos feitos em registros hospitalares, se leve em conta a proporção de pares concordantes averiguados independentemente ( I ), isto é, aqueles em que os dois elementos do par foram registrados independentemente, diferenciando-os, assim, dos concordantes em que apenas um único elemento do par apareceu no registro (U). Chamando de D a proporção dos pares discordantes, tem-se, segundo Allen (1970), que a proporção corrigida de propósitos concordantes é obtida a partir de

$$C = \frac{2I + U}{2I + U + D}$$

Allen (1970) também demonstrou que para não haver distorções em relação à proporção de pares de gêmeos concordantes, basta calcular

$$CP = \frac{2I + U}{2I + U + 2D}$$

onde CP designa a *concordância de pares*.

Para exemplificar, consideremos que em um levantamento feito nos registros de um hospital tivessem sido encontrados 4 pares MZ concordantes em relação a uma anomalia, tendo sido ambos examinados ( $I = 4$ ), enquanto que 32 MZ foram concordantes, mas apenas um tivesse sido examinado ( $U = 32$ ). Suponhamos, ainda, que nos registros desse hospital, tivessem sido encontrados 20 pares MZ discordantes em relação à anomalia ( $D = 20$ ). Nesse caso, estimaríamos que a proporção de concordância de propósitos em 66,7% e a de concordância de pares (CP) como sendo de 50%, pois  $C = 0,666\dots$  e  $CP = 0,5$ .

Por serem os pares MZ geneticamente idênticos, pode-se inferir que, neles, a proporção de concordantes em relação a um caráter qualitativo, será tanto maior quanto menor for a participação do ambiente na expressão desse caráter. É por isso que, se um caráter depender, fundamentalmente, do genótipo, 100% dos pares MZ serão classificados como concordantes. Assim, por exemplo, por ser a determinação dos grupos sanguíneos eritrocitários dos sistemas ABO, Rh, MNSs e outros, praticamente não influenciada pelo ambiente, os pares MZ são sempre concordantes em relação aos grupos desses sistemas sanguíneos.

À medida que aumenta a participação do ambiente na manifestação de um caráter, a concordância nos pares MZ diminui. É o caso, por exemplo, do lábio leporino associado ou não ao palato fendido, e da luxação congênita do quadril. Quando essas alterações são investigadas em gêmeos MZ nota-se uma proporção de concordância ao redor de 40% em relação a cada uma delas, porque a influência de fatores do ambiente na manifestação de ambas tem importância relevante.

A constatação de que a maioria ou a totalidade dos pares MZ é concordante em relação a um caráter qualitativo, entretanto, não é, por si só, condição suficiente para enfatizar a importância do genótipo na sua manifestação. Realmente, se um caráter depender de fatores do ambiente que agem sobre a maior parte da população, uma alta

proporção de gêmeos MZ será concordante, simplesmente porque o caráter em estudo é manifestado pela maioria dos indivíduos que compõem a população estudada. Em vista disso, para demonstrar que o genótipo tem importância na manifestação de um caráter qualitativo é necessário provar que a proporção de pares concordantes em relação a esse caráter é significativamente maior nos pares MZ do que nos DZ, os quais, do mesmo modo que os irmãos gerados sucessivamente possuem, em média, metade dos genes em comum. *Evidentemente, se o caráter qualitativo depender do sexo ou da idade, os pares monozigóticos e dizigóticos a serem comparados deverão ser do mesmo sexo e pertencerem ao mesmo grupo etário.*

Para exemplificar, consideremos um estudo de gêmeos sobre sarampo, uma doença infantil que já foi muito freqüente, no qual se observou concordância em 96 dentre 98 pares MZ (98 %) e em 76 dentre 81 pares DZ (94 %). Apesar da alta proporção de concordância da manifestação do sarampo nos gêmeos MZ, esses dados não são suficientes para permitir a aceitação da hipótese de que o genótipo individual é importante para a manifestação dessa infecção, porque essa proporção também foi alta nos pares DZ e não diferiu significativamente daquela observada nos pares MZ ( $\chi^2 = 2,015$ ; G.L.= 1;  $0,10 < P < 0,20$ ).

Na literatura pertinente são numerosos os trabalhos em que as proporções de concordância de caracteres qualitativos verificadas em pares MZ e DZ serviram para o cálculo de um índice arbitrário (H), proposto por Holzinger (1929), e que foi denominado de *índice de herdabilidade de Holzinger*. Se simbolizarmos as proporções de concordância nos pares MZ e nos pares DZ por  $C_{MZ}$  e  $C_{DZ}$ , respectivamente, o índice de herdabilidade de Holzinger será calculado por intermédio de

$$H = \frac{C_{MZ} - C_{DZ}}{1 - C_{DZ}}$$

Para ilustrar a aplicação dessa fórmula, suponhamos uma reação serológica de etiologia desconhecida, que é positiva em 40% dos indivíduos e negativa nos restantes, independentemente do sexo e da faixa etária dos indivíduos. Se um pesquisador estiver interessado em investigar, por intermédio do estudo de gêmeos, se essa reação depende ou não de um componente genético importante, ele não terá necessidade de procurar indivíduos que apresentam reação positiva que possuem um irmão gêmeo, porque o caráter em estudo é freqüente na população. Bastará pesquisar a reação serológica em questão em

uma amostra de gêmeos coletada aleatoriamente, na qual a zigosidade será investigada para a classificação dos pares em MZ e DZ.

Consideremos que a amostra de gêmeos coletada incluiu 90 pares e que, dentre eles, 38 eram MZ e 52 DZ. Se os gêmeos MZ mostrarem 95% de concordância quanto à presença (++) ou ausência (--) da reação serológica, enquanto os DZ apresentarem 40% de concordância (++) e 60% de discordância (+-), o índice de herdabilidade de Holzinger será igual a 0,875 ou 87,5%, porque  $H = \frac{0,95 - 0,60}{1 - 0,60} = 0,875$ . Se a reação serológica em

estudo mostrasse concordância igual a 100% nos pares MZ, o índice de herdabilidade de Holzinger dessa reação seria igual a 1 ou 100%, qualquer que fosse a proporção de dizigóticos concordantes (evidentemente menor que 100%), pois  $H = \frac{1 - x}{1 - x}$  é igual a 1 ou 100%.

Exemplifiquemos, agora, com um caráter raro. Consideremos que, ao investigar uma série grande de casos de estenose pilórica, um pesquisador tivesse encontrado 20 que possuíam um irmão gêmeo MZ e 30 que possuíam um irmão gêmeo DZ. Se a proporção de pares concordantes quanto à estenose pilórica fosse 65% nos pares MZ e de apenas 3% nos DZ, o pesquisador pode concluir que a estenose pilórica é uma malformação que depende de um componente genético importante para a sua manifestação, porque a proporção de concordância dessa alteração é significativamente mais alta nos gêmeos MZ do que nos DZ. Por outro lado, esses dados também sugerem que é grande a influência de fatores do ambiente para a manifestação da estenose pilórica, visto que 35% dos pares MZ foram discordantes no que diz respeito a essa alteração. Com base nesses dados, o índice de herdabilidade de Holzinger para a estenose pilórica pode estimado em 0,639 ou 63,9% porque  $H = \frac{0,65 - 0,03}{1 - 0,03} = 0,639$ .

Apesar de sua ampla utilização em Genética Humana, o índice de herdabilidade de Holzinger recebeu críticas negativas, por ser um índice completamente arbitrário. Visto que os gêmeos podem fornecer subsídios importantes a respeito da participação genotípica em doenças que não são monogênicas, vários autores se empenharam na criação de um método mais elaborado para estimar a participação desse componente. Esse método parte do princípio de que essas doenças podem ser encaradas como um caráter de variação *quase-*

*contínua* (Grüneberg, 1951,1952). Em outras palavras, a predisposição ou vulnerabilidade para a manifestação da doença teria, por hipótese, distribuição normal, mas a doença somente se manifestaria a partir de um determinado limiar. Com base nesse modelo, Falconer (1965) deu grande avanço metodológico para poder avaliar a herdabilidade de doenças a partir de estudos de consangüíneos de pacientes. O método de Falconer foi melhorado por Edwards (1969) e, posteriormente, Smith (1970, 1972,1974) dedicou-se à sua aplicação aos gêmeos.

A aceitação do modelo de variação quase-contínua para as doenças permite interpretar a proporção de concordância como correspondente a um coeficiente de correlação de predisposição à doença entre parentes, no caso entre gêmeos. Mas, para estimar esse coeficiente de correlação é necessário saber não apenas a proporção de concordância, mas, também, a freqüência da doença na população. A tabela 1.4, adaptada de Smith (1974) serve para mostrar como se estima esse coeficiente de correlação. Assim, por exemplo, suponhamos que a freqüência de uma doença na população seja 5 por 10.000, isto é, 0,0005 e que a porcentagem de concordância dos gêmeos com seus propósitos seja 40% ou 0,400 nos pares MZ e 3,8% ou 0,038 nos pares DZ. Nesse caso, a tabela 1.4 nos permitirá estimar em 0,9 o coeficiente de correlação de predisposição da doença nos pares MZ e em 0,5 nos pares DZ.

Por corresponderem a coeficientes de correlação intraclasse obtidos para caracteres quantitativos, vários autores consideraram plausível aplicar os coeficiente de correlação obtidos para os caracteres qualitativos na fórmula proposta de Holzinger para o cálculo da “herdabilidade” de caracteres quantitativos, isto é,  $\frac{r_{MZ} - r_{DZ}}{1 - r_{DZ}}$ . Assim, os dados de nosso exemplo serviriam para estimar a “herdabilidade” da doença estudada em  $\frac{0,9 - 0,5}{1 - 0,5} = 0,8$ . Evidentemente, existem autores, como Smith (1974), que se opõem à utilização dessa fórmula porque, como já foi explicitado no capítulo anterior, ela não permite estimar a herdabilidade propriamente dita.

Tabela 1.4 Taxa de concordância dos propósitos em relação à frequência do caráter na população e ao coeficiente de correlação de predisposição à doença entre os gêmeos.

F r e q ü ê n c i a n a p o p u l a ç ã o										
r	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,10	0,20	0,50	0,80
0,1	0,001	0,002	0,003	0,011	0,019	0,074	0,133	0,241	0,532	0,810
0,2	0,002	0,004	0,007	0,021	0,034	0,105	0,172	0,284	0,564	0,821
0,3	0,004	0,010	0,014	0,037	0,055	0,143	0,216	0,331	0,597	0,833
0,4	0,009	0,020	0,028	0,062	0,086	0,188	0,266	0,381	0,631	0,845
0,5	0,018	0,038	0,051	0,098	0,129	0,244	0,324	0,436	0,667	0,859
0,6	0,036	0,070	0,090	0,151	0,187	0,310	0,390	0,496	0,705	0,874
0,7	0,070	0,125	0,152	0,226	0,266	0,392	0,468	0,565	0,747	0,891
0,8	0,138	0,221	0,255	0,336	0,376	0,495	0,563	0,645	0,795	0,911
0,9	0,291	0,400	0,434	0,507	0,542	0,637	0,689	0,750	0,857	0,937
0,95	0,459	0,558	0,585	0,642	0,670	0,742	0,779	0,823	0,899	0,956
0,99	0,736	0,789	0,789	0,841	0,845	0,885	0,898	0,922	0,957	0,981

Do exposto pode-se concluir, pois, que, os estudos de gêmeos também são ótimos para demonstrar que um caráter qualitativo depende de um componente genético importante, porque, nesse caso, é suficiente provar que a proporção de pares concordantes quanto a esse caráter é significativamente maior nos gêmeos MZ do que nos DZ. Já os resultados de todos os tratamentos dos dados, feitos posteriormente, visando ao cálculo da herdabilidade por intermédio do estudo de gêmeos serão sempre pouco precisos.

## REFERÊNCIAS

- Allen, G. Models of proband concordance rates for twins in clinical series. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 19: 146-149, 1970.
- Edwards, J. H. Familial predisposition in man. *Br. Med. Bull.* 25: 58-64, 1969.
- Falconer, D.S. *Introduction to Quantitative Genetics*. Oliver and Boyd, Edimburgh, 1960.
- Falconer, D. S. The heritability to certain diseases estimated from the incidences among relatives. *Ann. Hum. Genet.* 29: 51-76, 1965.
- Grüneberg, H. Genetical studies on the skeleton of the mouse. *Proc. Roy. Soc. B* 138: 437-451, 1951.
- Grüneberg, H. Genetical studies on the skeleton of the mouse. IV. Quasi-continuous variations. *J. Genet.* 51: 95-114, 1952.
- Holzinger, K. J. The relative effect of nature and nurture influences on twin differences. *J. Educ. Psychol.* 20: 241-248, 1929.
- Mather, K. & Jinks, J.L. *Introdução à Genética Biométrica*. Traduzido por F.A. Moura Duarte, F. M. Sene, H. A. Rothschild, R. B. Lôbo, N. Mortari & A. P. Schlindwein. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1984.
- Newman, H.H., Freeman, F.N. & Holzinger, K.J. *Twins, a study of heredity and environment*. Univ. Chicago Press, 1937.
- Smith, C. Heritability of liability and concordance in monozygous twins. *Ann. Hum. Genet.* 34: 85-91, 1970.
- Smith, C. Correlation in liability among relatives and concordance in twins. *Hum. Hered.* 22:97-101, 1972.
- Smith, C. Concordance in twins: methods and interpretations. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 454, 1974.