

ACTA GENETICAE MEDICAE ET GEMELLOLOGIAE

Volumen XI

N. 1 - Januarii 1962

Università di Roma - Istituto di Genetica Medica «G. Mendel»

Direttore: Prof. LUIGI GEDDA

Proposta del Test Gemellare Azigotico

Luigi Gedda, Gianni Brenci

1. Introduzione

La ricerca genetica condotta mediante lo studio dei gemelli non perde, anzi accresce, la sua importanza perchè si rivela come un'insostituibile strada per realizzare sull'uomo determinate condizioni sperimentali utili e soddisfacenti.

È chiaro che, allargandosi le applicazioni del metodo gemellare, si rende necessaria una revisione critica della sua metodologia la quale, per altro, è rivolta a rendere il metodo stesso più adeguato e privo di cause di errore. In questi ultimi anni la revisione del metodo è avvenuta, su questa stessa Rivista, ad opera di Allen (1955), Huizinga (1957), Stern (1958) ed altrove ad opera di Osborne e De George (1959), Kempthorne e Osborne (1961), Vogel (1961).

A questi contributi pensiamo di aggiungerne uno nuovo che abbiamo recentemente sperimentato con buoni risultati.

Il metodo che intendiamo proporre si riferisce ad una necessità sperimentale che è in via di crescente sviluppo.

Infatti il costituirsi di imponenti Centri di raccolta di materiale gemellare (ad esempio, la casistica di cui dispone l'Istituto Mendel ha ormai sorpassato le 8.000 unità di coppie) mentre rende sempre più rapido e facile l'utilizzazione di questo prezioso materiale, impone un problema che non sempre è di rapida risoluzione, cioè quello della diagnosi di zigotismo.

Tale diagnosi rappresenta classicamente il cuore del metodo gemellare in quanto dal confronto fra le due serie zigotiche può emergere l'orientamento, la prova e la quantificazione circa la natura ereditaria, o non ereditaria ed eventualmente circa le caratteristiche ereditarie di un determinato fenomeno umano fisiologico o patologico.

Per altro, come si accennava, la coppie quando devono essere utilizzate non sempre offrono le possibilità di una facile diagnosi di zigotismo come quella che viene offerta quando i due membri delle coppie sono di sesso diverso.

Specialmente quando l'indagine viene condotta a un livello popolazionistico mediante inchieste intese a raccogliere del materiale non selezionato, e soprattutto quando tale raccolta avviene per corrispondenza, riesce complicato da un punto di vista organizzativo ed occupa un tempo considerevole l'operazione diagnostica dello zigotismo che importa un esame diretto delle coppie gemellari, la determinazione dei gruppi sanguigni e financo, talora, delle prove di innesto crociato di lembi cutanei.

Queste considerazioni da noi fatte recentemente in occasione di un'indagine sulla causalità ereditaria delle malattie allergiche, ci conducevano a considerare l'opportunità di mettere allo studio un sistema di analisi del materiale gemellare che permettesse di prescindere dalla diagnosi di zigotismo, ma che egualmente potesse condurre a dati dimostrativi intorno al problema del fenomeno considerato e ad altri aspetti di tale problema.

Basandosi sulla situazione emergente ed ora esposta, abbiamo messo a punto un metodo che tende ad utilizzare il materiale gemellare a livello popolazionistico anche quando non siano note le diagnosi di zigotismo delle singole coppie che furono raccolte e che vengono utilizzate sperimentalmente.

Pertanto ci è sembrato opportuno di chiamare questo metodo, che ora verremo esponendo, metodo del Test Gemellare Azigotico.

2. Presentazione del T. G. A.

Dato un campione gemellare casuale di n coppie, calcolata in esso la frequenza individuale p del carattere in esame ¹, si suddividono le coppie a seconda della presenza o no del carattere in uno o in entrambi i gemelli.

La suddivisione viene effettuata nelle classi A, B, C, D con le rispettive frequenze sperimentali (f_1, f_2, f_3, f_4) secondo il seguente schema ²:

		1° gemello	
		con	senza
2° gemello	con	+ + A(f_1)	+ - B(f_2)
	senza	- + C(f_3)	- - D(f_4)

¹ Se il campione è sufficientemente numeroso ed il carattere non è raro la stima della p in una popolazione gemellare casuale corrisponde a quella nella popolazione generale.

² L'attribuzione della qualifica di primo oppure secondo ai due gemelli delle coppie non ha il significato di primo nato e di secondo nato ma rappresenta l'ordine con cui i cogemelli si sono presentati a questa osservazione.

Si calcola la distribuzione casuale delle n coppie nelle quattro classi descritte, usando la p stimata nel campione.

Si confrontano le due distribuzioni:

frequenze sperimentali	f_1	f_2	f_3	f_4
frequenze teoriche attese	np^2	npq	nqp	nq^2

usando il test del χ^2 .

Nel caso di significatività il χ^2 dimostra una diversità della distribuzione sperimentale dovuta alle condizioni stesse dell'esperimento e cioè al fatto di operare su coppie di individui come i gemelli aventi tra loro dei nessi causali di relazione probabilmente genotipici.

A questo punto, per accertare se la diversità tra frequenze attese e frequenze sperimentali sia dovuta a fattori genetici, si può ipotizzare un modello di ereditarietà e, stabilita quale dovrebbe essere la distribuzione teorica delle coppie, confrontarla con la distribuzione sperimentale.

Sia tale modello relativo ad un carattere monomero diallelico a penetranza 1.

Riprendendo in considerazione il campione in esame, calcoliamo il numero n^0 di coppie che si distribuiscono casualmente dopo aver posto $f_2 + f_3 = 2n^1pq$ (p e q sono gli stessi valori stimati inizialmente). n^1 sarà dato allora da:

$$n^1 = \frac{f_1 + f_2}{2pq}$$

Le frequenze assolute di questa nuova distribuzione saranno:

$$f_1^1 = n^1p^2 \quad f_2^1 = n^1pq \quad f_3^1 = n^1qp \quad f_4^1 = n^1q^2.$$

Confrontando per differenza la distribuzione ora descritta con quella sperimentale avremo:

$$\frac{\begin{matrix} f_1 \\ f_1^1 \end{matrix}}{(f^1 - f_1^1)} \quad \frac{\begin{matrix} f_2 \\ f_2^1 \end{matrix}}{(f^2 - f_2^1)} \quad \frac{\begin{matrix} f_3 \\ f_3^1 \end{matrix}}{(f^3 - f_3^1)} \quad \frac{\begin{matrix} f_4 \\ f_4^1 \end{matrix}}{(f^4 - f_4^1)}$$

Chiamando $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_4$ le differenze così ottenute avremo che $\varphi_2 + \varphi_3 = 0$ per il modo stesso con cui è stato calcolato il confronto.

Consideriamo ora i valori φ_1 e φ_4 . Se le loro frequenze relative saranno pressochè uguali a p e q potremo affermare la realtà del modello considerato (carattere monomero a penetranza 1) e l'ereditarietà del carattere.

Nel caso di eguaglianza tra le frequenze $\frac{\varphi_1}{\varphi_1 + \varphi_4}, \frac{\varphi_4}{\varphi_1 + \varphi_4}$ e p, q è infatti verosimile supporre che le coppie della distribuzione $f_1^1, f_2^1, f_3^1, f_4^1$ siano le coppie dizigotiche mentre le coppie dei gruppi φ_1 e φ_4 siano le monozigotiche dato che quest'ultime si comportano come se la comparsa del carattere nel secondo gemello fosse univocamente determinata dall'esistenza o meno del carattere nel primo.

Per una stima dell'attendibilità dei risultati è opportuno verificare se le coppie dei gruppi φ_1 e φ_4 sommate rappresentino il 25-35% del campione cioè la percentuale di coppie monozigotiche in una popolazione casuale di gemelli.

Per la determinazione dei limiti fiduciarî di accettazione dei valori ottenuti, si può procedere nel modo seguente.

Determinato lo scarto delle frequenze f_2 ed f_3 dalla loro media (n^1pq) lo si rapporta a questa con la formula seguente:

$$\frac{f_2 - f_3}{f_2 + f_3}$$

Chiamato l il valore così ottenuto si accetteranno i risultati se $\frac{\varphi_1}{\varphi_1 + \varphi_4}$ sarà compreso nell'intervallo $p \pm l$ e $\frac{\varphi_4}{\varphi_1 + \varphi_4}$ nell'intervallo $q \pm l$.

Il metodo esposto per un modello ereditario semplice è concettualmente applicabile a qualsiasi modello teorico.

3. Esempio

Immaginiamo di avere inviato un modulo-inchiesta a 200 coppie gemellari rappresentanti un campione casuale di una determinata popolazione di gemelli. Nei moduli si cerca di mettere in luce se i due gemelli, oppure uno solo, oppure nessuno dei due manifestino un determinato carattere. Per cinquantasei individui la risposta è affermativa.

Anzitutto calcoliamo quale sia l'incidenza del carattere nel campione. L'incidenza sarà:

$$p = 56/400 = 14/100 = 0,14$$

e quindi la frequenza degli individui che non manifestano il carattere sarà nel campione $q = 0,86$.

Dalle risposte dell'inchiesta risulta anche che le coppie gemellari in 155 casi non manifestano il carattere in nessuno dei due gemelli. In 18 casi, il primo gemello esaminato manifesta il carattere ed il secondo no, in 16 casi il primo gemello esaminato non manifesta il carattere mentre il secondo lo manifesta; infine in 11 casi entrambi i gemelli manifestano il carattere in esame. Quindi la distribuzione sperimentale può essere riassunta nel prospetto seguente:

	1 e 2 senza	1 con 2 senza	1 senza 2 con	1 e 2 con	Totale
frequenze assolute	155	18	16	11	200
frequenze relative	0,775	0,090	0,080	0,055	1,000

Distribuzione delle coppie a seconda della presenza o meno del carattere nei gemelli

Se non vi fossero legami genotipici o paratipici tra i componenti le coppie gemellari, la distribuzione delle coppie sarebbe del tutto casuale e quindi dovremmo avere, tenendo presente che la frequenza del carattere è $p = 0,14$ una distribuzione del tipo seguente:

	I e II senza	I con II senza	I senza II con	I e II con	Totale
frequenze assolute	148	24	24	4	200
frequenze relative	$0,86 \times 0,86 = 0,7396$	$0,14 \times 0,86 = 0,1204$	$0,86 \times 0,14 = 0,1204$	$0,14 \times 0,14 = 0,0196$	1,000

Distribuzione casuale teorica delle coppie per $p = 0,14$

Il confronto tra la distribuzione sperimentale e la distribuzione teorica da un $\chi^2 = 16,745$, significativo al livello del 1%.

Scegliamo come modello di trasmissione ereditaria del carattere una forma diallelica a penetranza 1-0 e controlliamo se questo modello conduce ad una distribuzione delle coppie simile a quella sperimentale.

Per fare questo, scegliamo la semisomma delle frequenze assolute delle due classi intermedie della distribuzione sperimentale $\left(\frac{18 + 16}{2} = 17\right)$ come $n'pq$ di una nuova distribuzione casuale in cui p e q sono ancora uguali rispettivamente a 0,14 ed a 0,86.

Potremo allora calcolare n^1 numero delle coppie che nella distribuzione sperimentale si distribuiscono casualmente. Allora n^1 sarà dato da $17/0,1204 \sim 141$. Queste 141 coppie si distribuirebbero nelle classi già descritte nel modo seguente:

I e II senza	I con II senza	I senza II con	I e I con	Totale
104	17	17	3	141
$0,86 \times 0,86 = 0,7396$	$0,15 \times 0,86 = 0,1204$	$0,86 \times 0,14 = 0,1204$	$0,14 \times 0,14 = 0,0196$	1,000

Se ora sottraiamo le frequenze assolute di questa ultima distribuzione da quelle sperimentali, avremo:

	I e II senza	I con II senza	I senza II con	I e II con	Totale
sperimentale	155	18	16	11	200
casuale	104	17	17	3	141
differenze	+51	+1	-1	+8	59

Esaminiamo i valori ottenuti per differenza. Nella seconda e nella terza classe, rappresentanti le coppie con un solo gemello che manifesta il carattere oggetto di studio, troviamo dei valori molto piccoli la cui somma è zero. Nella prima e nella quarta classe, rappresentanti rispettivamente le coppie con entrambi i gemelli non manifestanti il carattere e le coppie con entrambi i gemelli che lo manifestano, troviamo invece le frequenze illustrate nel prospetto:

	I e II senza	I e II con	Totale
frequenze assolute	51	8	59
frequenze relative	0,864	0,136	1,000

Se confrontiamo ora le frequenze relative di questi due gruppi con p e q , vediamo che sono pressochè uguali. Infatti q è eguale a 0,86 e la frequenza delle coppie con entrambi i membri non manifestanti il carattere è di 0,864.

Analogamente p è eguale a 0,14 e la frequenza delle coppie con entrambi i membri che manifestano il carattere è di 0,136. Questo dimostra l'esattezza del modello proposto. Infatti è verosimile che le 149 coppie che si distribuiscono casualmente rappresentino le coppie dizigotiche, e che le 59 coppie che si comportano come se fossero individui singoli rappresentino le coppie monozigotiche. Per accertare ulteriormente la veridicità del modello, sarà opportuno controllare se le 59 coppie che si comportano come individui singoli, rappresentino la percentuale normale di coppie monozigotiche in un campione casuale.

Avendo lavorato su 200 coppie, 59 di esse rappresentano il 29,5% del materiale in esame. Questo valore è accettabile, poichè le frequenze percentuali delle coppie monozigotiche oscillano tra il 25 ed il 35%.

Possiamo ora calcolare se i risultati ottenuti rientrano nei limiti fiduciarî dell'esperimento e cioè entro quali limiti i risultati del calcolo possono essere giudicati validi. Considerata come fluttuazione della seconda e della terza classe ($18 - 16 = 2$) la ponderiamo rispetto alla somma di due valori. Avremo quindi $\frac{18 - 16}{18 + 16} = 0,059$.

Stabiliamo così gli intervalli di accettazione del modello. Per p avremo $0,140 \pm 0,059$, per q $0,860 \pm 0,059$. I valori da noi ottenuti nelle frequenze dell'ultima distribuzione, devono quindi essere compresi, il primo tra 0,919 e 0,801 e il secondo tra 0,199 e 0,081. Essendo i valori trovati 0,864 e 0,136 sono evidentemente compresi negli intervalli stabiliti e quindi accettabili.

4. Sviluppi del Test Gemellare Azigotico

Come dimostreremo in una prossima nota il T.G.A. può anche servire per una diagnosi di zigotismo a livello popolazionistico.

Riassunto

Gli AA. partono dalla considerazione della attualità del metodo gemellare che importa una revisione dei sistemi di analisi in uso in tale settore. A tal fine essi si propongono di indicare un metodo che consenta l'utilizzazione del materiale gemellare anche se la diagnosi di zigotismo è ignota. Essi chiamano questo metodo Test Gemellare Azigotico (T.G.A.).

Gli AA. espongono lo sviluppo teorico ed un esempio pratico di analisi, con il T.G.A.

Si ripropongono di ritornare sull'argomento per dimostrare altri possibili sviluppi del metodo.

Bibliografia

1. L. GEDDA: Studio dei Gemelli, Cap. XV. Ed. Orizzonte Medico 1951.
2. G. ALLEN: Comments on the analysis of twin samples. *A. Ge. Me. Ge.*, vol. IV, 1955.
3. HUIZINGA and I. A. v. d. HEIDEN: The percentages of concordance in twins and mode of inheritance. *A. Ge. Me. Ge.*, vol. VI, 1957.
4. K. STERN: The basis of monozygotic to dizygotic affected twins in unselected data. *A. Ge. Me. Ge.*, vol. VII, 1958.
5. R. H. OSBORNE and F. V. DE GEORGE: Genetic basis of morphological variation; part two. Harvard University Press, 1959.
6. O. KEMPTHORNE and R. H. OSBORNE: The interpretation of twin data. *The American Journal of Human Genetics*, vol. 13, 3, 1961.
7. F. VOGEL: *Lehrbuch der allgemeinen Humangenetik*. Springer Verlag 1961.

RÉSUMÉ

En considération du développement de la méthode gémellaire, les Auteurs considèrent l'opportunité d'une révision des systèmes d'analyse en usage à présent. C'est dans ce but qu'ils désignent une méthode qui permette d'utiliser le matériel gémellaire, même si le diagnostic de zygotisme est incertain. Cette

méthode ils l'appellent Test Gémellaire Azygotique (T.G.A.), et en exposent le développement théorique, ainsi qu'un exemple pratique d'analyse.

Les Auteurs se proposent d'autres études à ce sujet, afin de démontrer d'autres développements possibles de cette méthode.

SUMMARY

Considering the development of the twin method the Authors deem it necessary to review the various systems of analysis presently used. They therefore design a method by which the twin material may be used even when zygosity is unknown. The Authors give this

method the name of Azygotic Twin Test (T.G.A.), explain it theoretically and also give a practical example of analysis.

The Authors plan to make new studies on the subject, in order to show further possible developments of this method.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verf. gehen von der Überlegung aus, dass die Aktualität der Zwillingsmethode eine Revision der zur Zeit gebrauchten Analysesysteme erfordert. Dazu nehmen sie sich vor, eine Methode aufzuweisen, die es gestattet, ein Zwillingsmaterial auch dann zu verwenden, wenn die Eiigkeitsdiagnose unbekannt ist. Sie

bezeichnen diese Methode als Zwillings-Test ohne Eiigkeitsfeststellung (T.G.A.).

Die Verf. legen die theoretische Entwicklung der Analyse nach dem T.G.A. dar und geben ein praktisches Beispiel dafür.

Si nehmen sich vor, auf das Thema zurückzukommen, um weitere mögliche Entwicklungen der Methode zu zeigen.