

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ SAMUEL DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *OR2W6P*,
OR2B8P, *OR1F12* e *OR12D2* EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO
PARANAENSE**

CURITIBA

2012

JOSÉ SAMUEL DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *OR2W6P*,
OR2B8P, *OR1F12* e *OR12D2* EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO
PARANAENSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho

Co-Orientadora: Dr^a. Fabiana Poerner

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Silva, José Samuel da

Caracterização dos polimorfismos nos genes OR2W6P, OR2B8P, OR1F12 e OR12D2 em uma amostra da população paranaense. / José Samuel da Silva. – Curitiba, 2011.

60 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Co-orientadora: Fabiana Poerner

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Antígenos de histocompatibilidade HLA 2. Algoritmos 3. Polimorfismo (Genética) I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Poerner, Fabiana IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

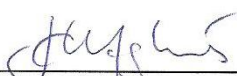
CDD (20. ed.) 575.1

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **JOSÉ SAMUEL DA SILVA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012



Professor Doutor João Carlos Marques Magalhães
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular



Professora Doutora Lupe Furtado Alle
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular



Doutora Fabiana Poerner
LIGH /UFPR – Membro Titular



Professora Doutora Maria da Graça Bicalho
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



AGRADECIMENTOS

À professora Maria da Graça Bicalho, pela orientação, apoio, incentivo e principalmente pela confiança.

Aos professores João Carlos Magalhães e Maria Luiza Petzl-Erler membros da banca de acompanhamento que no desenvolvimento do projeto deram importantes sugestões para a melhoria do mesmo.

Ao Waldir Antônio da Silva pela ajuda no uso do banco de dados do LIGH.

À equipe LIGH que me ensinou e acompanhou no desenvolver deste projeto.

Ao convênio FUNPAR-LIGH que possibilitou a realização do trabalho através da estrutura disponibilizada e da compra de reagentes.

A Capes pela bolsa concedida nestes dois anos de trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná onde a preocupação na formação dos alunos de forma ampla e não apenas com o desenvolvimento individual de seus projetos está presente.

A todos os professores e colegas que contribuíram na minha formação.

Aos colegas de mestrado, principalmente a Renata e Fabíola que muitas vezes dividiram comigo os equipamentos do laboratório nos finais de semana.

A Renata, minha companheira, pelo apoio moral nos momentos fáceis e difíceis.

A minha família.

RESUMO

Os genes de receptores de odorantes (OR) são a maior família gênica de vertebrados, podendo passar de alguns milhares de locos por indivíduo, no entanto a diversidade em cada um desses locos ainda é pouco caracterizada. O estudo de genes OR relacionados à sua função reprodutiva se intersectam com os estudos de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Os objetivos do presente estudo foram investigar a diversidade genética dos genes *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* e *OR12D2*; definir haplótipos e frequências haplotípicas e investigar a presença de desequilíbrio de ligação entre estes genes OR, assim como também com os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*. A amostra foi composta de 61 trios familiares (pai, mãe e filho(a)) e foram observados 30 SNPs, que permitiram a caracterização de 26 diferentes alelos nos quatro genes OR. Nove novos SNPs ainda não relatados na literatura foram observados. Desequilíbrio de ligação absoluto ($r^2 = 1$) foi observado entre os alelos *OR2W6P*04* e *OR1F12*05*. Com os genótipos dos trios familiares foi realizada análise de segregação na determinação dos haplótipos e permitiu comparações com a inferência haplotípica através do algoritmo EM. A comparação entre os métodos destaca o uso com cautela do algoritmo EM quando a diversidade de haplótipos é muito alta e há a presença de haplótipos raros.

Palavras-chave: MHC, HLA, receptor de odorante, escolha de parceiros, Algoritmo EM.

ABSTRACT

The odorant receptor (OR) genes are the largest gene family of vertebrates, and may be over several thousand loci per individual, however the diversity in each of these loci are poorly characterized. The study of OR genes related to their reproductive function intersect with the studies of genes in the Major Histocompatibility Complex (MHC). The main goal of the present study was to investigate the genetic diversity of the *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* and *OR12D2* genes, define haplotypes and haplotypic frequencies and investigate the presence of linkage disequilibrium between these OR genes, and with *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1*, these HLA genes had been genotyped previously in the sample. The sample was composed of 61 family trios (father, mother and child) and 30 SNPs were identified which allowed the characterization of 26 alleles among the four OR genes. Out of nine new SNPs, not yet reported in the literature, were observed. Absolute linkage disequilibrium ($R^2=1$) was observed between the *OR2W6P*04* and *OR1F12*05* alleles. Segregation analysis was used in the trios to define haplotypes and allowed comparisons with inferred haplotypes by EM algorithm. The comparison between methods highlights the cautious use of the EM algorithm when the diversity of haplotypes is very high and there is the presence of rare haplotypes.

Keywords: MHC, HLA, Odorant Receptor, Mate choice, EM Algorithm.

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1	<i>O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....</i>	<i>9</i>
1.1.1	O MHC Humano.....	10
1.1.2	A Evolução do MHC	13
1.1.3	Escolha preferencial por indivíduos MHC dissimilares.....	15
1.2	<i>O SISTEMA OLFATIVO</i>	<i>17</i>
1.2.1	O Sistema Olfativo Principal	22
1.2.2	Sistema Olfativo Acessório.....	25
1.2.3	MOE e VNO em humanos	26
1.3	<i>GENES LIGADOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....</i>	<i>30</i>
1.3.1	O efeito da Ligação na estrutura populacional	31
1.3.2	Mensurando o Desequilíbrio de Ligação (D, D' e r^2)	31
1.3.3	Os significados do Desequilíbrio de Ligação.....	32
2	OBJETIVOS GERAIS	35
2.1	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>35</i>
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	ARTIGO.....	37
5	CONCLUSÃO	46
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7	ANEXO I.....	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – VIAS SIMPLIFICADAS DE PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS MHC	11
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DO MHC HUMANO	12
FIGURA 3 – DIVERSIDADE ALÉLICA NOS GENES HLA	13
FIGURA 4 – MHC, UM COMPLEXO POLIMÓRFICO, MULTIGÊNICO E DE EXPRESSÃO CODOMINANTE.....	14
FIGURA 5 – INFLUÊNCIA DOS GENES MHC NA FORMAÇÃO DO ODOR.....	18
FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÓRGÃOS E RECEPTORES SENSORIAIS OLFATIVOS.....	19
FIGURA 7 – ESTRUTURA DOS RECEPTORES OLFATIVOS	19
FIGURA 8 – VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA DO NÚMERO DE GENES DE RECEPTORES OLFATIVOS.....	20
FIGURA 9 – RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE GRUPOS DE QUIIMIORRECEPTORES GPCR....	21
FIGURA 10 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA OLFATIVO PRINCIPAL.....	23
FIGURA 11 – SISTEMA COMBINATORIAL DA ATIVAÇÃO DOS ORS	24
FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES ORS EM HUMANOS.....	27
FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES OR LIGADOS AO MHC.....	28
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DAS DISTÂNCIAS ENTRE OS GENES ESTUDADOS.....	29
TABLE 4 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM BETWEEN OR AND HLA GENES	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CNV - Variação no número de cópias
dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfatos
EC - Alças extracelulares
EXO I - Enzima exonuclease I
FPR - Receptores de peptídeos formil
GG - Gânglio de Grueneberg
GPCR – Receptores associados à Proteína G
HLA - Antígenos Leucocitários Humanos
HORDE - *The Human Olfactory Receptor Data Exploratorium*
HUGO - *The Human Genome Organization*
IC - Alças intracelulares
LD – Desequilíbrio de Ligação
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHCx - Complexo Principal de Histocompatibilidade Estendido
MOB - Bulbo Olfativo Principal
MOE - Epitélio Olfativo Principal
NK - *Natural Killer*
OS - Órgão Septal
OSN – Neurônios Sensoriais Olfativos
OR - Receptor de Odorante
PCR - Reação em cadeia da polimerase
SAP - Enzima Fosfatase Alcalina de Camarão
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único
T CD4+ - Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD4+
T CD8+ - Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD8+
TAP - Transportador associado ao processamento de antígenos
TAAR - Receptores amino-associados
TCR - Receptor de Linfócitos T
TM - Domínio transmembrana
tRNA - RNA transportador
sRNA – RNA de Interferência
VNO - Órgão Vomeronasal
V1R e V2R – Receptores Vomeronasais
VSN – Neurônios sensoriais olfativos

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade foram caracterizados após tentativas de transplantes de pele em pacientes com queimaduras na Segunda Guerra Mundial apresentarem grandes índices de rejeição. Inicialmente os trabalhos realizados em murinos investigando o problema da rejeição\aceitação de tecidos permitiram concluir que o fenômeno da histocompatibilidade resultava de diferenças genéticas em apenas uma região do genoma, e que vários genes com função similar estavam ligados a ela. Estes genes que controlavam a compatibilidade dos tecidos ficaram conhecidos como Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC (*Major Histocompatibility Complex*) [1].

Posteriormente, descobriu-se que as proteínas MHC eram responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T. Estas células estão constantemente inspecionando as demais células do organismo em busca de sinais de mudanças celulares, originadas por patógenos ou alterações de suas funções normais e este reconhecimento imunológico é mediado pelas moléculas MHC [1].

Foi proposto que o reconhecimento de peptídeos virais por linfócitos T só era possível quando a apresentação dos mesmos fosse mediada por proteínas MHC, atribuindo-se a essas moléculas a responsabilidade pela apresentação de antígenos na implementação de uma resposta imune adaptativa [2]. Os mesmos autores propuseram que devido à especificidade MHC-peptídeo para gerar uma resposta imunológica, indivíduos heterozigotos para os locos MHC seriam capazes de responder mais eficientemente aos patógenos presentes no meio, uma vez que seriam capazes de apresentar um número maior de antígenos [3].

Genes e proteínas MHC clássicos são classificados em dois tipos - MHC de Classe I e MHC de Classe II - de acordo com suas diferenças estruturais e

funcionais. As proteínas MHC de Classe I clássicas são expressas em todas as células nucleadas de vertebrados, tendo como principal função a apresentação de antígenos de origem citosólica aos linfócitos T citotóxicos (CD8+), além de serem determinantes no controle da atividade citotóxica de células NK (*Natural Killer*), no contexto da imunidade inata. Os genes MHC de Classe II são expressos somente nas células apresentadoras de antígenos, tais como, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, sua função é apresentação de antígenos de origem extracelular aos linfócitos T auxiliares (CD4+).

O processo inicial da ativação da resposta imune adaptativa ocorre quando a estrutura tridimensional e a interação MHC-peptídeo é reconhecida como não própria pelos linfócitos T [1]. A **Figura 1** apresenta de forma simplificada as diferenças das funções das moléculas MHC de Classe I e II.

Os genes do MHC, cuja moléculas são responsáveis pela apresentação de antígenos, possuem nomes distintos nas diferentes espécies. Por exemplo, em camundongos são conhecidos como H-2 e em humanos como HLA.

1.1.1 O MHC Humano

O MHC humano está situado do braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3, que possui um comprimento de 3,6 milhões de bases (3,6 MB), e apresenta mais de 120 genes expressos, sendo que 40% deles estão relacionados à resposta imunológica [4]. O termo MHC que originalmente se referia apenas ao sistema gênico da histocompatibilidade e que codificavam as proteínas responsáveis pela rejeição, atualmente refere-se também a uma região do genoma que inclui vários genes *HLA* e outros genes não pertencentes ao sistema HLA. A divisão desse complexo em três regiões é baseada na estrutura e função gênica dos produtos protéicos codificados pelos genes correspondentes (**Figura 2**).

Os seguintes genes, denominados *HLA* clássicos, codificam moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos: *HLA-A*; *HLA-B* e *HLA-C*, genes de

Classe I, e genes da região MHC de Classe II, que codificam as cadeias α e cadeias β , das moléculas *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*.

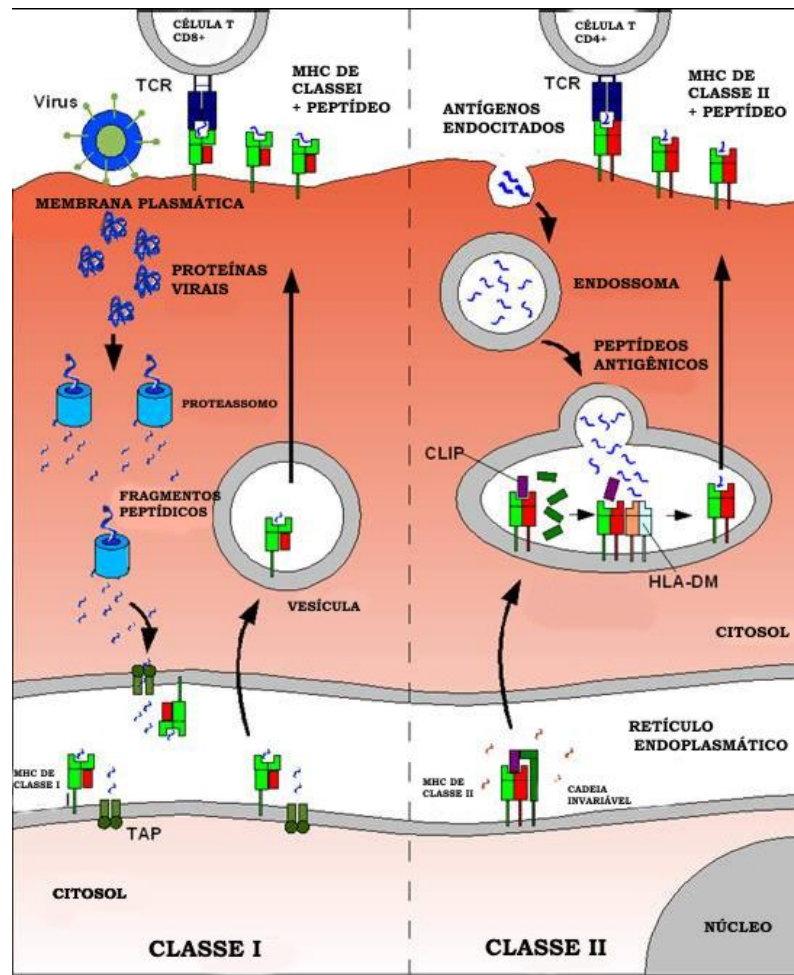


FIGURA 1 – VIAS SIMPLIFICADAS DE PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS MHC

FONTE: HALLING-BROWN, M. D. Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens. Disponível em: < http://igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/WWW/PhD_thesis.htm >. Acesso em: 03/08/2010.

NOTA: A representação demonstra de forma simplificada o processamento e a apresentação de antígenos aos linfócitos T. O lado esquerdo representa o processamento e a apresentação de polipeptídeos de origem intracelular mediado por moléculas MHC de classe I. O lado direito da figura representa o processamento de polipeptídeos oriundos do meio extracelular e apresentação por moléculas HLA de classe II. As moléculas MHC responsáveis pela apresentação de antígenos em humanos são chamadas de HLA.

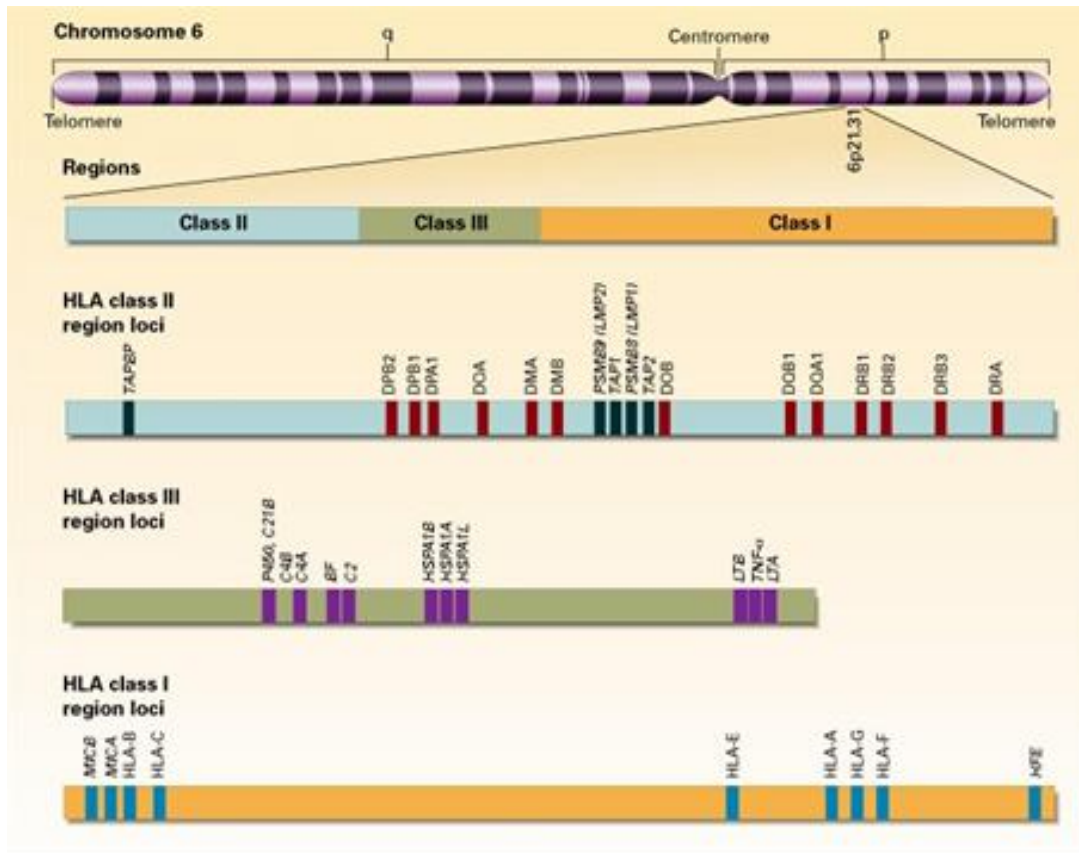


FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DO MHC HUMANO

FONTE: Disponível em < http://www.e-gastroped.com.br/jun05/ceiaca_antigen.htm >. Acesso em 03/08/2011.

Os genes *HLA* não clássicos (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*), apesar de apresentarem estrutura muito semelhante aos *HLA* clássicos de Classe I, não são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, como também não apresentam a diversidade observada nos genes *HLA* clássicos [5].

Devido ao seu importante papel na prática dos transplantes, os genes *HLA* são muito bem caracterizados em diversas populações e mostram-se como os genes mais polialélicos conhecidos. A diversidade de alelos presentes no sistema *HLA* é representada na **Figura 3**. A presença desta diversidade alélica é um grande problema para pacientes que estão à espera de um transplante e necessitam encontrar um doador que apresente os mesmos alelos *HLA*. No entanto, o polialelismo, a presença de genes duplicados em função e a expressão codominante, geram grande diversidade de moléculas *HLA* expressas em um

mesmo indivíduo (**Figura 4**), maximizando a apresentação de antígenos para o sistema imune. Desta forma, mostra-se um sistema muito bem adaptado num ambiente que apresenta extrema diversidade de patógenos aos quais os indivíduos estão potencialmente expostos [1].

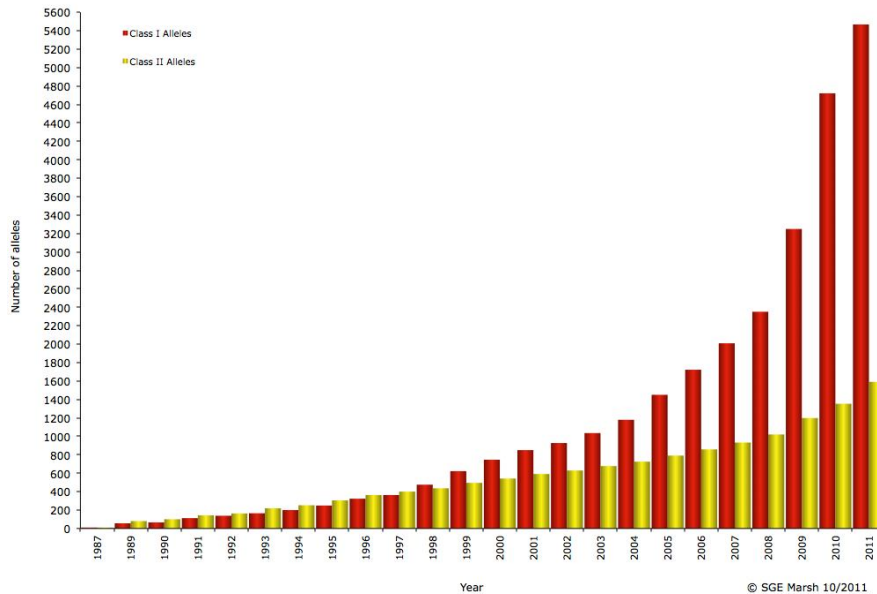


FIGURA 3 – DIVERSIDADE ALÉLICA NOS GENES HLA

FONTE: Disponível em <http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png>. Acesso em 02/01/2012.

1.1.2 A Evolução do MHC

A importante participação dos genes *MHC* na resposta imune adaptativa e, conseqüentemente, na sobrevivência dos organismos, suscita várias questões com o intuito de se compreender um pouco sobre sua evolução.

Uma das principais hipóteses entre imunogeneticistas e estudiosos da evolução do sistema imune sugere que, quanto maior a diversidade de proteínas MHC presentes em um indivíduo, maior seria a capacidade de apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T. Surge então, a primeira questão evolutiva: não seria provável que novos processos de duplicações gênicas que possam ter ocorrido levassem à apresentação de antígenos com diversidade cada vez maior,

tornando os indivíduos ainda mais capazes de combater os microorganismos presentes em seu meio?

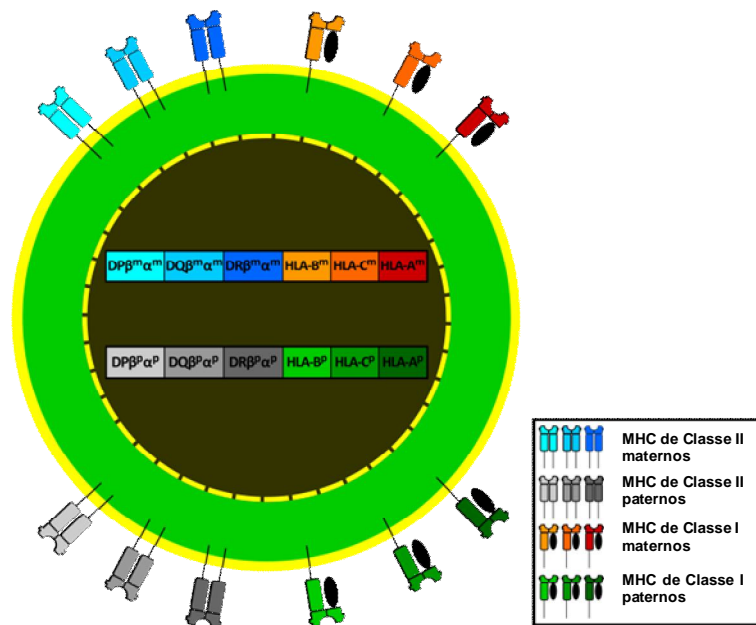


FIGURA 4 – MHC, UM COMPLEXO POLIMÓRFICO, MULTIGÊNICO E DE EXPRESSÃO CODOMINANTE.

FONTE: Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/File:MHC_expression.svg>. Acesso em 03/08/2010.

NOTA: A figura representa os haplótipos materno e paterno, a diversidade alélica e a expressão codominante dos genes HLA.

As evidências experimentais são sugestivas de que existe um balanço entre a capacidade de apresentação de antígenos e o número de células T maduras. No processo de maturação das células T (seleção negativa), aquelas que se ligam com maior afinidade ao complexo MHC-peptídeo próprio, entram em processo apoptótico ou morte celular. Aproximadamente 99% dos linfócitos T morrem neste processo. Desta forma quanto maior a diversidade das proteínas MHC expressas, menor seria o repertório de células T circulantes e/ou maior o número de células auto-reativas capazes de gerar doenças auto-imunes [6].

Uma questão chave nos estudos sobre a evolução do MHC tenta responder como foi gerada e mantida a diversidade alélica observada nos genes *MHC*, sem precedentes para qualquer outra região do genoma.

As evidências permitem sugerir que o polimorfismo observado nos genes *MHC* não poderia ter sido gerado exclusivamente por processos de evolução neutra (mutação e deriva genética), outros processos evolutivos seriam necessários para gerar esse polimorfismo. Diferentes hipóteses sobre a atuação da seleção na diversidade observada nos genes *MHC* foram propostas [5]. As hipóteses de seleção sobre os genes *MHC* podem ser divididas em duas categorias: reprodutiva e dirigida por patógenos. Mecanismos reprodutivos incluem a escolha de parceiros *MHC*-dissimilares e probabilidade diferencial no sucesso da gestação. Mecanismos dirigidos por patógenos incluem efeitos de seleção a favor dos heterozigotos, seleção dependente de frequência e seleção flutuante [5; 7-9].

1.1.3 Escolha preferencial por indivíduos *MHC* dissimilares

Evidências experimentais indicam a ocorrência de escolhas preferenciais por parceiros *MHC*-dissimilares em camundongos [10-14], lagartos [15], peixes [16; 17], aves [17; 18] e humanos [19-24]. Considerando-se a escolha preferencial por parceiros *MHC*-dissimilares, surgem duas principais perguntas: como os indivíduos reconhecem os genótipos dos parceiros em potencial e, por que existiria essa preferência pelo diferente? Vários trabalhos demonstram que a identidade *MHC* de um indivíduo pode ser reconhecida por pistas olfativas [9; 25] apesar de ainda existirem diferentes hipóteses de como isso poderia ocorrer. Três, são as principais hipóteses que tentam explicar a escolha pelo *MHC* diferente. A primeira delas tem como principal argumento que a escolha por parceiro *MHC* dissimilar aumentaria a resistência da prole contra patógenos por gerar indivíduos heterozigotos (hipótese da vantagem do heterozigoto, [26]); a segunda, argumenta que essa estratégia também poderia gerar “alvos móveis” (genótipos) com melhor performance para confronto com parasitas que evoluem rapidamente [8]; e a terceira, sugere que a escolha por parceiro *MHC* dissimilar, atuaria no sentido de se evitar o

endocruzamento e os efeitos genéticos adversos associados à genótipos homozigotos [27].

Para testar a influência do genótipo MHC na formação do odor corporal foram delineados alguns experimentos. Os experimentos iniciais resultaram em evidências de que camundongos conseguem distinguir diferentes linhagens congênicas que diferem apenas nos genótipos MHC [28].

Para testar se estas diferenças nos odores corporais eram derivadas dos produtos gênicos MHC ou de genes ligados, demonstrou-se que odores corporais de camundongos *Knockouts* para apenas um gene *MHC* de Classe I, eram diferenciados daqueles dos indivíduos normais [29]. A diferenciação do odortipo também foi observada quando deletada a *Beta-2-microglobulina*, cadeia polipeptídica parceira na configuração tridimensional e expressão estável das moléculas MHC de Classe I [30]. Diferentes odores também foram detectados quando a mutação era dirigida à região de apresentação de antígenos das moléculas MHC [31]. A individualidade odorífera corporal presente em cada indivíduo ficou conhecida como odortipo MHC¹.

Algumas hipóteses foram propostas para explicar a natureza química da influência dos genes MHC na formação dos odores corporais:

1. Moléculas MHC depois de degradadas se volatilizariam formando o odor [32];
2. Os sítios de apresentação de antígenos serviriam como moléculas carreadores dos odorantes [33];
3. Os peptídeos depois de liberados da fenda do MHC se volatilizariam caracterizando o odor [34];
4. Microorganismos comensais MHC específicos formariam o odor [35];

¹ O termo odortipo (odores que refletem um genótipo) foi proposto por Yamazaki e colaboradores (1979) para expressar uma mistura de moléculas voláteis presentes nas secreções dos indivíduos, capazes de serem percebidas por outros indivíduos, e que refletiam o genótipo dos mesmos. Este termo tem sido usado comumente para expressar a individualidade odorífera de forma geral, não se diferenciando a participação de moléculas voláteis e não-voláteis como por exemplo peptídeos MHC (revisado em RESTREPO e colaboradores [65]).

5. Microflora MHC-específica metabolizaria os peptídeos da fenda e estes produtos é que caracterizariam o odor [25].

Uma imagem ilustrativa sobre estas diferentes hipóteses encontra-se na **Figura 5**.

Considerando o envolvimento dos genes *MHC* na escolha preferencial de parceiros, surge o interesse pela compreensão de como seria detectado o odortipo de cada um. Para tal é necessário uma breve revisão sobre o sistema olfativo.

1.2 O SISTEMA OLFATIVO

A habilidade de detecção de moléculas odorantes é ubíqua no Reino Animal. O Sistema Olfativo é uma ferramenta essencial para a sobrevivência dos indivíduos, sendo utilizado em diferentes processos biológicos, tais como reprodução, alimentação, interações sociais e prospecção do ambiente, entre outros.

Em vertebrados o sistema olfativo pode ser dividido em componentes clássicos e não clássicos. A via clássica de processamento do sistema olfativo é mediada pelos neurônios olfativos sensoriais (OSN – *olfactory sensory neurons*) presentes no Epitélio Olfativo Principal (MOE – *Main Olfactory Epithelium*) que fica localizado na parte superior da cavidade nasal. Pistas químicas que entram no nariz também podem ser percebidas, adicionalmente à via clássica, pelos neurônios sensoriais presentes no Órgão Vomeronasal (VNO – *Vomeronasal Organ*), no Órgão Septal (OS) e no Gânglio de Grueneberg (GG) [36]. Cada um destes sistemas são compostos por subsistemas constituídos por diferentes receptores de membrana, vias de transdução de sinal e localizações na cavidade nasal. Baseados em sua localização topográfica, os receptores olfativos são classificados nas seguintes categorias: receptores de odorantes (OR – *odorant receptors*); receptores vomeronasal (V1R e V2R); receptores amino-associados (TAAR – *trace amine-associated receptors*); receptores de peptídeos formil (FPR – *formyl peptide receptors*) e guanilil ciclase GC-D (**Figura 6**)[37].

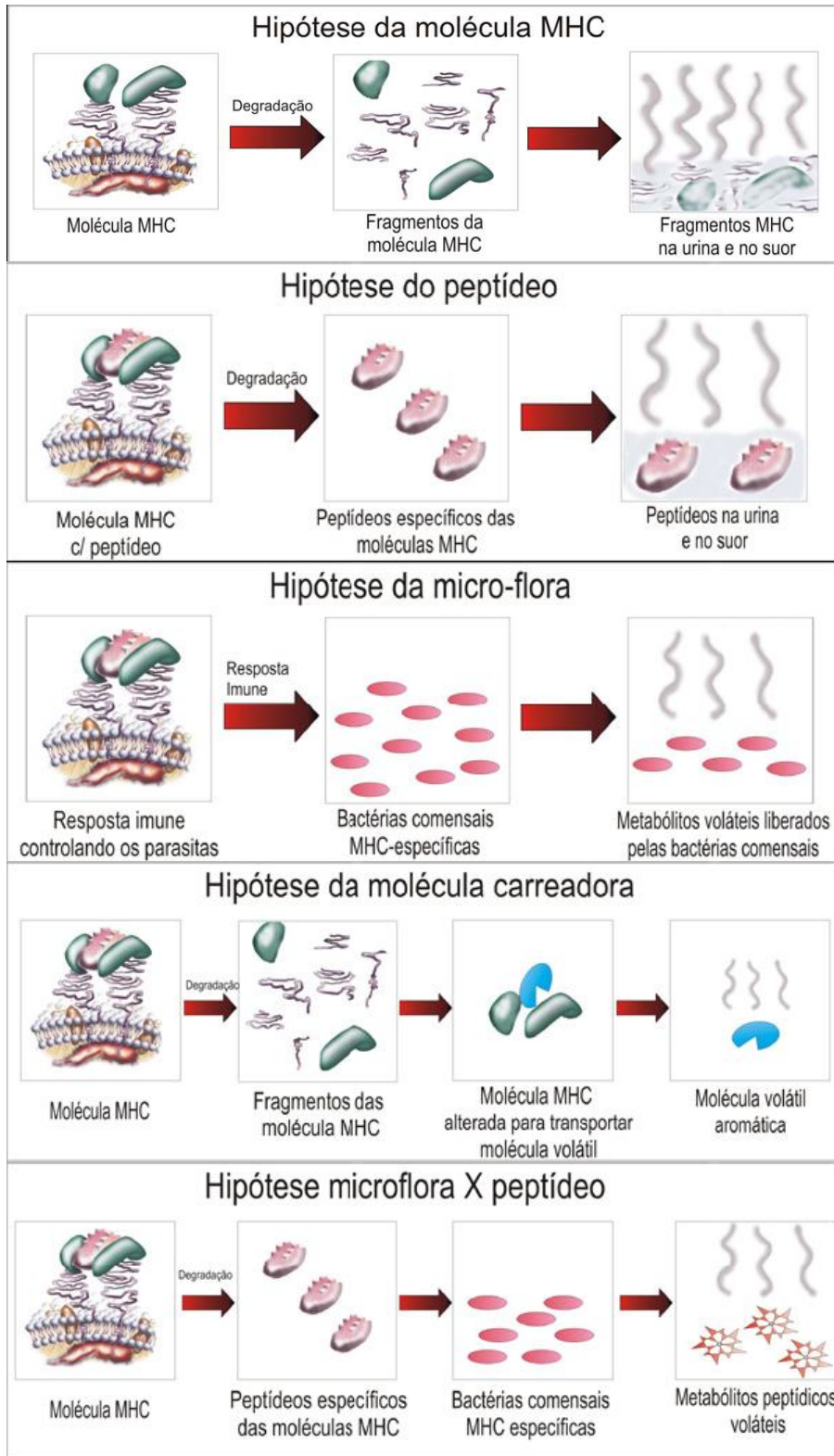


FIGURA 5 – INFLUÊNCIA DOS GENES MHC NA FORMAÇÃO DO ODOR
 FONTE: MENGARELLI, R. R. (2005). **MHC E OLFATO** [38].

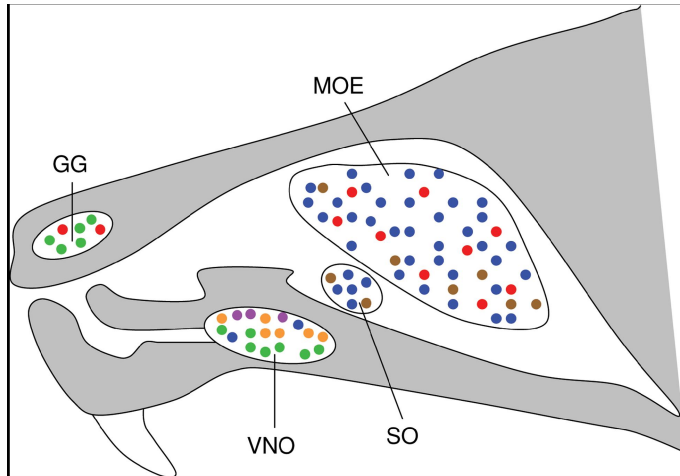


FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÓRGÃOS E RECEPTORES SENSORIAIS OLFATIVOS

FONTE: FLEISCHER et al. (2009). **Mammalian Olfactory Receptors** [37].

NOTA: Representação esquemática do corte transversal do nariz de um camundongo mostrando a localização dos diferentes órgãos envolvidos na percepção odorífera e seus respectivos receptores que estão indicados por cores. OR em azul, V1R em laranja, V2R em verde, TAAR em vermelho, FPR em roxo e GC-D em marrom.

A maioria destes receptores pertence à superfamília dos receptores associados à proteína G (GPCR – *G Protein Coupled Receptors*), cuja estrutura consenso apresenta sete domínios transmembrânicos (**Figura 7**)[37].

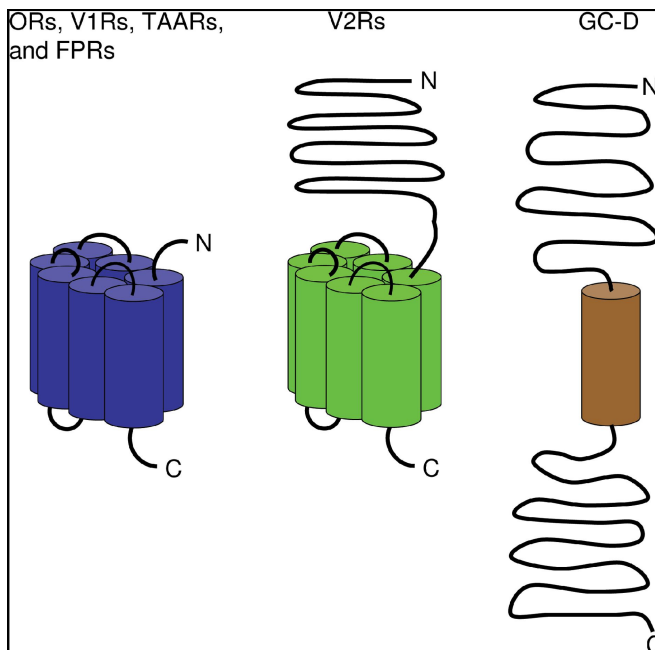


FIGURA 7 – ESTRUTURA DOS RECEPTORES OLFATIVOS

FONTE: FLEISCHER et al. (2009). **Mammalian Olfactory Receptors** [37].

Existe grande variação no número de genes funcionais e pseudogenes que codificam os receptores olfativos entre as espécies [39]. Na **Figura 8** está representada esta variação interespecífica.

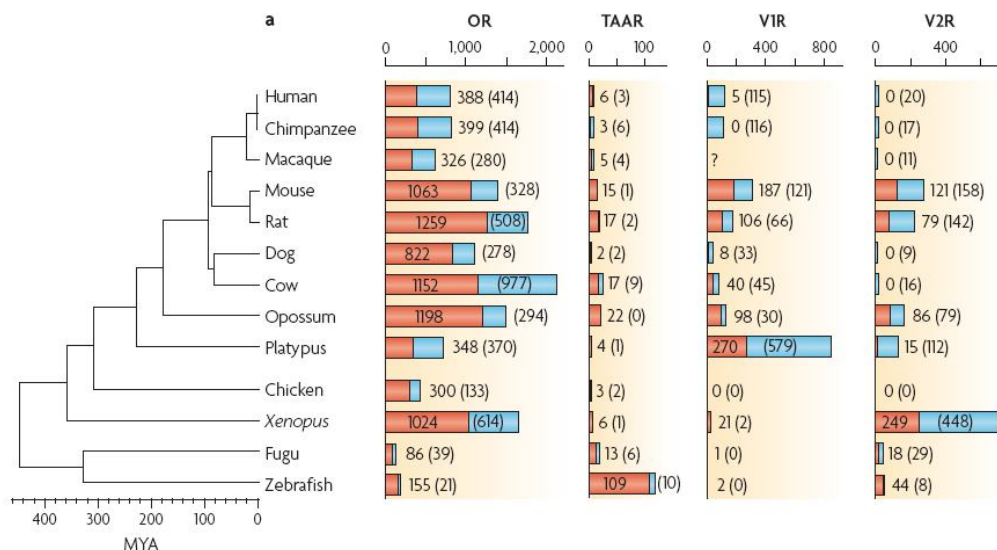


FIGURA 8 – VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA DO NÚMERO DE GENES DE RECEPTORES OLFATIVOS.

FONTE: NEI et al. (2008). **The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity** [39].

NOTA: Do lado esquerdo da figura está o cladograma indicando a relação filogenética entre as espécies, a escala está em Milhões de Anos Atrás (MYA). Do lado direito está a representação do número de genes de receptores olfativos. As barras em vermelho e azul representam respectivamente os genes funcionais e os pseudogenes. Os números fora e dentro do parênteses são também para os genes funcionais e pseudogenes respectivamente.

Quando é feita uma análise comparativa dos diferentes receptores olfativos e outros GPCR, a relação filogenética sugere que estes quimiorreceptores constituem um grupo parafilético (**Figura 9**), evidenciando que os receptores olfativos surgiram independentemente várias vezes no decorrer da evolução, de modo que qualquer GPCR tem potencial para tornar-se um receptor olfativo [40].

Os trabalhos envolvendo pistas olfativas relacionadas à escolha de parceiros concentraram-se no VNO e/ou no MOE. Sendo que para os outros órgãos citados nada se conhece a respeito da relação com a escolha de parceiros [36].

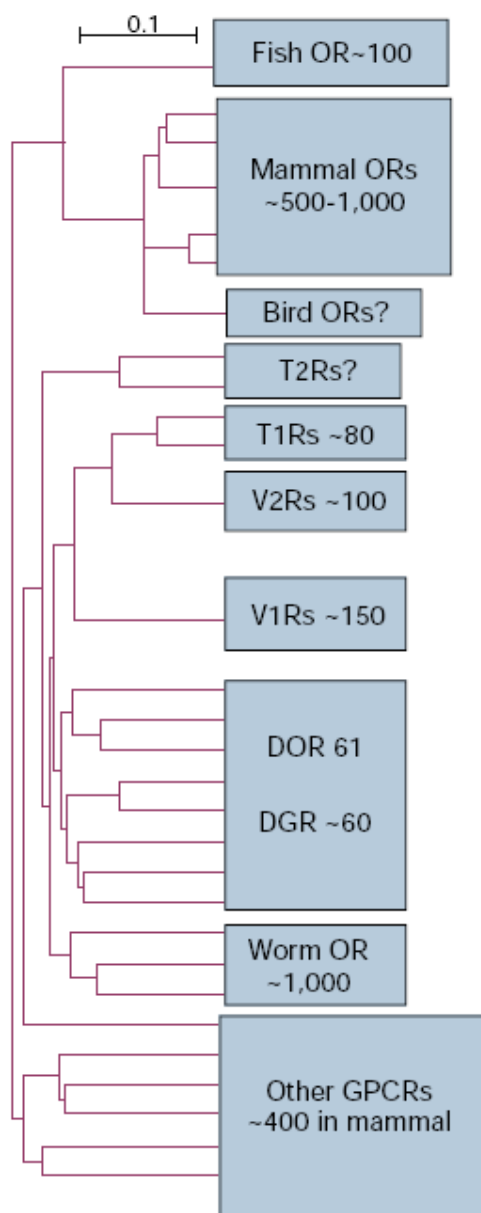


FIGURA 9 – RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE GRUPOS DE QUIIMIORRECEPTORES GPCR
 FONTE: FIRESTEIN, S., (2001). **How the olfactory system makes sense of scents** [41].

NOTA: Os quimiorreceptores olfativos não apresentam uma raiz comum. T1R e T2R são os receptores gustativos, DOR e DGR são respectivamente receptores de odorantes e gustativos de *Drosophila*. O termo Worm refere-se ao *C. elegans*. A escala do cladograma representa 10% de divergência de sequência nucleotídica.

1.2.1 O Sistema Olfativo Principal

Nos vertebrados o sistema olfativo principal detecta a grande maioria dos odorantes que chegam à cavidade nasal. Este sistema é composto pelo MOE que contém os OSN que estendem seus axônios até o Bulbo Olfativo Principal (MOB – *Main Olfactory Bulb*), cujas células mitrais comunicam-se com o córtex olfativo, amígdala e outras áreas superiores do sistema nervoso central, que estão envolvidas na percepção consciente e discriminação dos odores e, áreas do Sistema Límbico, que parece estar envolvido com o controle das emoções e efeitos motivacionais [42]. O reconhecimento dos odorantes deve-se a receptores de membrana denominados receptores de odorantes (OR – *Odorant Receptors*), presentes nos OSN. Quando um odorante se liga ao seu receptor é gerada uma cascata de sinalização intracelular que leva à despolarização da membrana e transmissão do impulso elétrico para o Bulbo Olfativo, que então transmite a informação às partes superiores do Sistema Nervoso Central (**Figura 10**)[42].

1.2.1.1 Descoberta dos Receptores de Odorantes

Evidências experimentais baseadas na observação de processos da cascata bioquímica de sinalização dos neurônios sensoriais olfatórios, indicaram que as proteínas OR eram pertencentes à superfamília dos receptores associados à proteína G (GPCR) [43-47]. Estas evidências foram confirmadas com a primeira clonagem de um gene OR [48], onde a análise da sequência nucleotídica indicou que os genes OR pertencem à primeira família (Classe A) de GPCR, assim como os receptores de catecolaminas e opsinas. As proteínas OR possuem sete hélices transmembrânicas (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7), separadas por três alças extracelulares (EC1, EC2 e EC3) e três alças intracelulares (IC1, IC2 e IC3), de modo que a extremidade amino-terminal encontra-se no meio extracelular e a extremidade carboxi-terminal no meio intracelular [49; 50], como já apresentado na

Figura 7. A região entre o segundo e o sexto domínio transmembrânico é considerada o local de ligação para a molécula odorante [51-55].

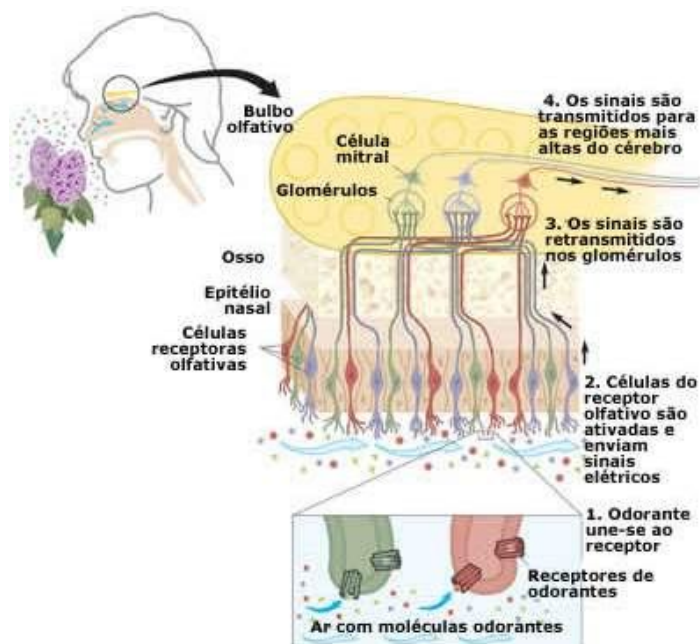


FIGURA 10 – ATIVAÇÃO DO SISTEMA OLFATIVO PRINCIPAL

FONTE: Disponível em <<http://saude.hsw.uol.com.br/cheiro2.htm>> acesso em 03/08/2010.

NOTA: No epitélio olfativo principal cada OSN expressa somente um gene OR, OSNs que expressam o mesmo OR convergem para a mesma região (glomérulos) do Bulbo Olfativo Principal. As células mitrais transmitem a informação dos OSNs que chegam aos glomérulos para áreas superiores do Sistema Nervoso Central.

1.2.1.2 Estrutura e Função Gênica dos Receptores de Odorante

Os genes de receptores de odorantes (OR), identificados em 1991 por Buck e Axel, constituem a maior família gênica dos vertebrados. Esses genes são desprovidos de íntrons em sua região codificante [48], porém, existe um longo sítio de *splicing* na região 5' não traduzida [56].

Apesar da diversidade, o número de receptores ainda é muito pequeno comparado com os potenciais odorantes, sugerindo um sistema de reconhecimento odorífero através da ativação combinatorial de diferentes OR [57], exemplificado na

Figura 11.

A diversidade dos genes *OR* não está restrita apenas à diversidade alélica e novos estudos são sugestivos de que a variação no número de cópias (CNV – *Copy Number Variation*) de genes *OR* entre indivíduos de uma mesma espécie apresenta um dos maiores índices de variação [39]. Em humanos, 30% dos genes *OR* funcionais apresentam CNV [58].

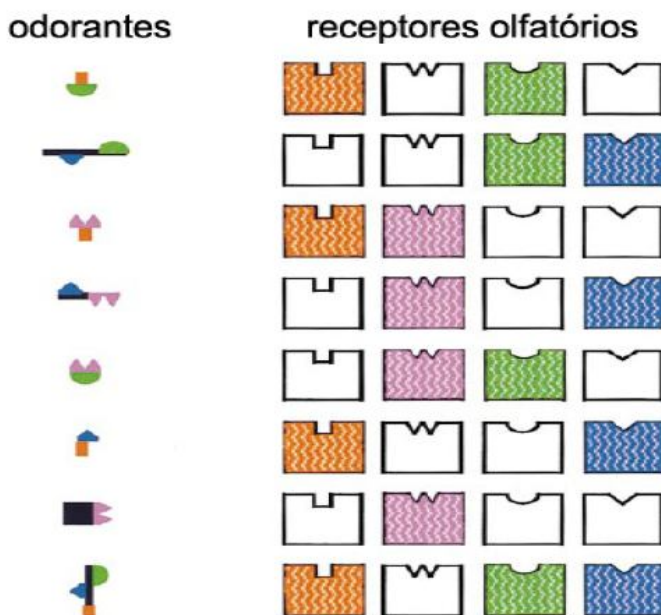


FIGURA 11 – SISTEMA COMBINATORIAL DA ATIVAÇÃO DOS ORS
 FONTE: MALNIC et al. (1999). **Combinatorial receptor codes for odors** [57].

NOTA: As moléculas odorantes são capazes de ligar-se a mais de um tipo de receptor, do mesmo modo que um receptor é capaz de reconhecer mais de um tipo de molécula. A diferenciação dos odores é dada pela combinação de quais receptores foram ativados.

1.2.1.3 Nomenclatura dos Receptores de Odorantes

A padronização da nomenclatura dos genes de receptores olfatórios foi necessária, principalmente para auxiliar na denominação e posterior intercâmbio de dados das inúmeras sequências descobertas e analisadas.

Muitas propostas têm sido apresentadas para nomear as várias sequências de genes *OR* que vem sendo descritas (ex: *HGMP07E*; *R2C4*; *HPFH1OR*; *HSOLFMF*; *OR17-2*; *OLFR89*; *ZF2A*; *SCor35*; *gen147*; entre outros). Dentre as

nomencaturas utilizadas, duas são consideradas mais importantes para entendimento dos trabalhos citados na área de estudo dos receptores ligados ao MHC. O sistema proposto por EHLERS e colaboradores [59] utiliza um prefixo “hs” (para referir-se ao *Homo sapiens*), seguido pelo número indicando o cromossomo em que essa sequência nucleotídica se encontra, pela letra M ou V (M indicando gene relacionado ao sistema olfatório principal, V indicando gene relacionado ao órgão vomeronasal), e o algarismo referente ao loco gênico. A letra “P” ao final do nome representa que essa sequência nucleotídica identifica um pseudogene (ex. *hs6M1-4P*).

A outra nomenclatura, a qual foi aprovada pelo HUGO (*Human Genome Organization*), é baseada em um sistema utilizando a classificação em famílias e subfamílias. A nomenclatura consiste do símbolo OR, seguido por um algarismo representativo da família, uma letra representando a subfamília e um algarismo significando o gene individual dentro da subfamília. Por exemplo, “*OR3A1*” é a denominação utilizada para o gene de receptor olfatório da família 3, subfamília A, gene 1 da subfamília A. Outro exemplo que pode ser utilizado é a designação “*OR7E12P*” para o pseudogene (representado pela letra “P” ao final da nomenclatura) do receptor olfatório da família 7, subfamília E, pseudogene 12 da subfamília E.

1.2.2 Sistema Olfativo Acessório

O Órgão Vomeronasal (VNO), também chamado de Sistema Olfativo Acessório, está localizado na parte inferior da cavidade nasal. As células responsáveis pela detecção são os neurônios sensoriais vomeronasais (VSN – *vomeronasal sensory neurons*), que se comunicam com o bulbo olfativo acessório. Os receptores vomeronasais (VR) são classificados em dois grupos principais: V1R e V2R. A caracterização inicial sugeriu que o VNO seria o órgão responsável pela detecção de moléculas não voláteis, entre elas os ferormônios, e o MOE seria

responsável pela detecção das moléculas voláteis e de percepção consciente. Esta divisão de função tem sido cada vez mais questionada [60-62]. Novas evidências indicam que ambos os sistemas estão envolvidos na detecção de sinais químicos relevantes na comunicação social e reprodutiva [63].

1.2.3 MOE e VNO em humanos

Em humanos e outros primatas existe um número reduzido de genes *OR* comparado com outros mamíferos, assim como também existe um aumento no número de pseudogenes em proporção aos *OR* funcionais (**Figura 8**). Uma explicação corrente para esta redução de genes *OR* é que com a aquisição de visão tricromática nos humanos e demais primatas do Velho Mundo, ocorreu uma substituição na prioridade do sistema sensorial usado na percepção do ambiente [64]. No entanto, quando feita uma análise mais ampla, esta hipótese não se sustenta, pois outros mamíferos que possuem visão dicromática também apresentam grande proporção de *OR* pseudogenes, assim como também existe baixa proporção de *OR* pseudogenes em outros organismos com visão policromática [39].

Em humanos existem aproximadamente 350 genes *OR* funcionais e 414 pseudogenes. Estes genes estão distribuídos em grupamentos gênicos (*clusters*) presentes em quase todos os cromossomos (**Figura 12**). Apesar do grande número de *OR* pseudogenes, sugerindo não funcionalidade, novas evidências indicam a expressão de 67% dos *OR* pseudogenes no MOE [65], assim como a presença de sRNA transcritos de *OR* pseudogenes com função regulatória na expressão gênica [66-68].

O envolvimento do Órgão Vomer nasal na detecção de moléculas relacionadas à escolha preferencial de parceiros em camundongos tem sido relatado em muitos trabalhos. Tratando-se de humanos, a presença e funcionalidade do VNO é bastante questionada [69], uma vez que a estrutura anatômica é considerada

vestigial, além de existir menos de 5% de genes *V1R* funcionais (5 genes intactos para 115 pseudogenes) e ainda não existir *V2R* com matriz de leitura aberta (somente 20 pseudogenes) [39]. No entanto, assim como para *OR*, é possível que para os *VR* exista alguma função associada aos pseudogenes, porém ainda não existe nenhuma evidência que apóie esta hipótese [39].

Uma questão associada à dúvida da presença do VNO em seres humanos é se estes seriam capazes de detectar feromônios? Evidências experimentais indicam que seres humanos adultos não apenas são capazes de responder à presença de feromônios, mas também são capazes de detectar essas moléculas num mecanismo mediado por genes *OR* expressos no MOE [70; 71].

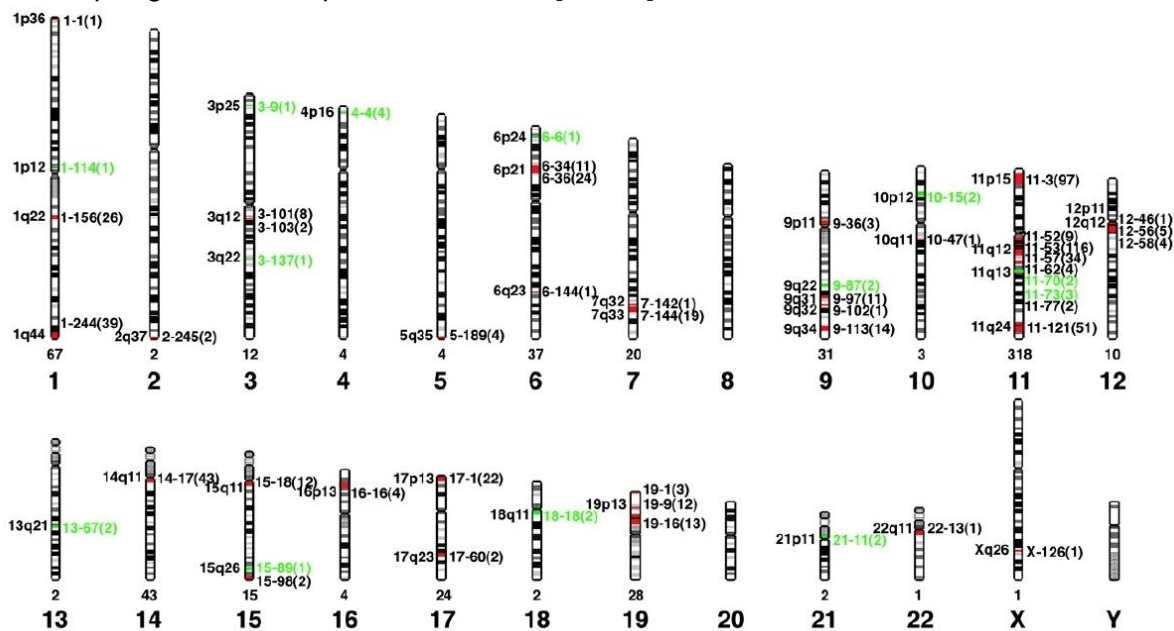


FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES ORS EM HUMANOS

FONTE: MALNIC et al. (2004). **The human olfactory receptor gene family** [72].

NOTA: Aproximadamente seiscentos e cinquenta genes de receptores de odorantes foram localizados em 51 grupamentos gênicos diferentes distribuídos por 21 cromossomos humanos. Grupamentos contendo *ORs* intactos estão indicados em vermelho; grupamentos contendo apenas pseudogenes são indicados em verde. A posição citogenética é mostrada à esquerda e sua distância em megabases do extremo do braço curto é mostrada à direita (cromossomo-Mb). O número de locos *OR* em cada grupamento é indicado entre parênteses à direita e o número de locos *OR* em cada cromossomo é indicado abaixo do mesmo.

1.2.3.1 Genes ORs Ligados aos genes MHC

Em humanos foi descrito um “*cluster*” de genes OR ligados à região MHC de Classe I, sugerindo pelo menos a presença de um gene OR funcional [73]. Um detalhamento sobre esta região demonstrou a presença de 34 genes OR, sendo 14 deles potencialmente funcionais (Sequencium Consortium, 1999, [4]). A **Figura 13** apresenta a localização dos genes OR ligados ao MHC. Este grupamento de genes OR pode ser dividido em duas sub-regiões: um agrupamento principal e outro agrupamento secundário [74].

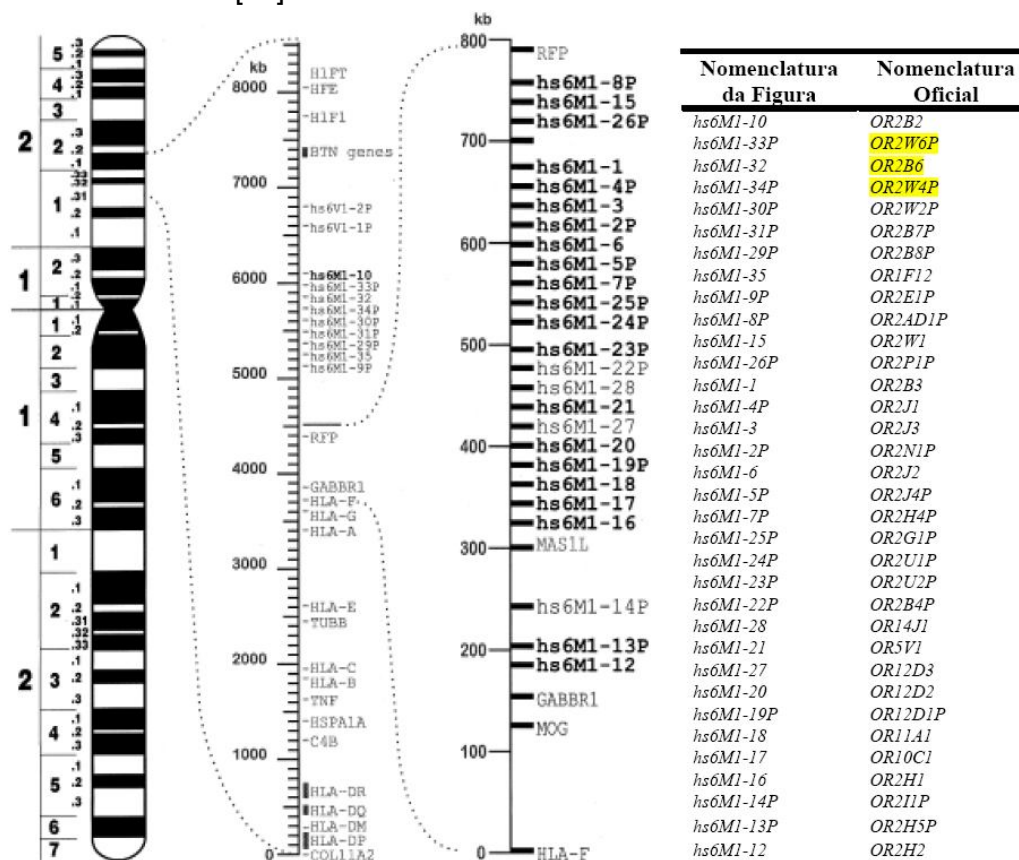


FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES OR LIGADOS AO MHC

FONTE: UEHARA, 2008. **CARACTERIZAÇÃO DOS GENES OR211P, OR12D3, OR14J1, OR2B4P, OR2E1P, OR1F12, OR2B8P, OR2B7P, OR2W2P, OR2W4P, OR2B6 E OR2W6P EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS** [75].

NOTA: A imagem é ilustrativa do Cromossomo 6. A nomenclatura oficial (HUGO) para os genes de receptores de odorantes difere da figura original. Os nomes em destaque amarelo não foram identificados no GenBank como os genes citados na coluna a sua esquerda.

A análise de genomas de outros organismos mostrou que esta ligação de genes *OR* e genes *MHC* ocorre também em outras espécies [76].

Dentre os genes analisados no presente trabalho, o pseudogene *OR2W6P* é o que se encontra mais afastado dos genes *MHC* clássicos e está situado no agrupamento telomérico de genes *OR* do Cromossomo 6. Sua localização cromossômica é 27.905.181 - 27.906.179. Os genes *OR2B8P* e o *OR1F12* também estão localizados neste mesmo grupamento, sendo as localizações cromossômicas 28.021.009 - 28.021.960 e 28.041.093 - 28.042.014 respectivamente.

O gene *OR12D2* está localizado no Agrupamento Centromérico de genes *OR* do Cromossomo 6, dentre os *OR* analisados este é que está mais próximo aos genes *MHC* clássicos, sua localização cromossômica é 29.364.476 – 29.365.397. A **Figura 14** ilustra as distâncias entre os *OR* analisados e os genes HLA- *A, *B e *DR.

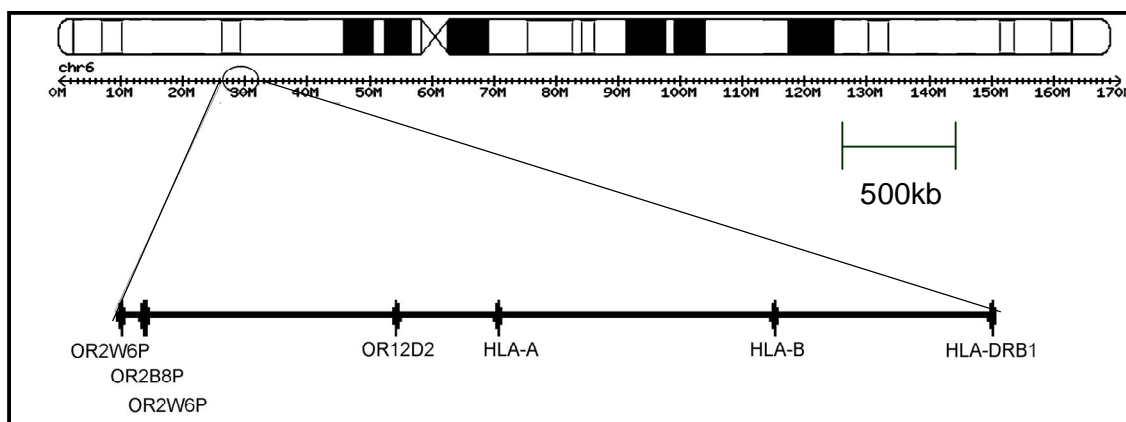


FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DAS DISTÂNCIAS ENTRE OS GENES ESTUDADOS

FONTE: O autor, 2012.

Diante deste panorama da possível influência dos genes *MHC* e sua relação com genes *OR* na escolha preferencial de parceiros, permanece a seguinte questão: Teria havido, no decorrer da evolução das espécies, a alocação de genes capazes de gerar o “odortipo” (genes *MHC*) e genes capazes de reconhecer estas pistas olfativas (genes *OR*) próximos e na mesma região do genoma?

1.3 GENES LIGADOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Sobre o possível significado evolutivo da ligação entre genes *OR* e genes *HLA* cabe uma breve revisão sobre a Ligação Gênica e seus efeitos ao longo das gerações na estrutura populacional.

Dois genes são considerados genes ligados quando a taxa de recombinação entre eles é menor que 50%, ou seja quando a transmissão da geração parental para a filial é mais provável em certa combinação como ilustrado a seguir:

P	AaBb	X	aabb
Gametas	(AB, ab, Ab, aB)	X	(ab)

F₁ >25% AaBb >25% aabb <25% Aabb <25% aaBb

A proporção da geração filial difere daquela esperada na segregação independente, onde todos os genótipos apresentam a mesma proporção (25%). Quando são avaliados os gametas produzidos por um indivíduo duplo-heterozigoto de genes ligados, os gametas que apresentam frequência superior a 25% são denominados de Parentais, enquanto aqueles com frequência inferior a 25% são denominados de Recombinantes. Desta forma pode-se identificar qual a *fase de ligação* entre os alelos destes genes, que podem ser *cis A-B* e *a-b* e *trans A-b* e *a-B*. A representação dos alelos de genes ligados, quando definido a fase de ligação, é denominada *haplótipo* (ex. *Aa-Bb* sem fase conhecida; *A-B/a-b* com fase conhecida, *haplótipo A-B* e *haplótipo a-b*).

A proporção dos gametas parentais em relação aos recombinantes depende da taxa de recombinação, quanto menor a taxa de recombinação maior a proporção dos gametas parentais.

1.3.1 O efeito da Ligação na estrutura populacional

Quando a segregação de genes ligados é estudada em famílias fica claro a diferença nas frequências haplotípicas em relação ao esperado na segregação independente. No entanto, quando a frequência destes haplótipos é estudada na população, na maioria das vezes estes haplótipos apresentam frequências muito similares daquelas esperadas através da segregação independente. Este fenômeno é chamado de *Equilíbrio de Ligação*, por outro lado quando a frequência de um determinado haplótipo apresenta desvio em relação à segregação independente é dito que os alelos presentes neste haplótipo estão em *Desequilíbrio de Ligação (LD)*. O Desequilíbrio de Ligação portanto é a associação não ao acaso de alelos em diferentes *loci*, é a correlação entre polimorfismos. Inicialmente, o desequilíbrio de ligação está presente em uma população em uma taxa determinada pela distância genética entre os dois *loci* e o número de gerações desde que ele surgiu [77].

1.3.2 Mensurando o Desequilíbrio de Ligação (D , D' e r^2)

Os parâmetros mais utilizados para mensuração do Desequilíbrio de Ligação são o D , D' e r^2 . O valor de D é obtido com a fórmula:

$$D = f_{ab} - p_a \cdot p_b$$

Onde f_{ab} é a frequência do haplótipo ab e p_a e p_b são as frequências alélicas do alelo a e b . O valor de D' é obtido com a seguinte fórmula:

$$D' = D/D_{\max}$$

Onde o D_{\max} pode assumir um dos seguintes valores:

$$\text{Se } D > 0 \quad \min(p_1q_2, p_2q_1)$$

$$\text{Se } D < 0 \quad \min(p_1q_1, p_2q_2)$$

O r^2 mede a correlação entre os alelos através da seguinte fórmula:

$$r^2 = D^2 / (p_1p_2 q_1q_2)$$

A significância dos valores obtidos é calculada em tabelas de continência 2x2, colocando-se as frequências absolutas observados dos diferentes haplótipos. Os valores obtidos seguem a Distribuição de *Qui-Quadrado* na segregação independente, desta forma valores de $p < 0,05$ indicam quais alelos dos genes em estudo estão em desequilíbrio de ligação.

Mesmo entre genes que apresentam pequenas taxas de recombinação o Equilíbrio de Ligação é a configuração mais presente nas populações, isto ocorre porque apesar das populações não serem *pammíticas* no sentido estrito, elas comportam-se como *pammíticas*, desta forma o Desequilíbrio de Ligação tende a zero com o passar das gerações, onde o tempo depende da taxa de recombinação (c), sendo no tempo 1:

$$D_1 = (1 - c) D_0$$

Quando o tempo 1 é substituído por n gerações a fórmula passa a ser:

$$D_n = (1 - c)^n D_0$$

Como no tempo evolutivo o número de gerações é muito grande o valor de D_n tende a zero. Desta forma quando é observado alelos que se encontram em desequilíbrio de ligação é necessário discutir os eventos evolutivos que podem manter o LD.

1.3.3 Os significados do Desequilíbrio de Ligação

A identificação de alelos com desequilíbrio de ligação significativos pode ser dependente de diversos fatores evolutivos e amostrais. A interpretação mais usual em relação a alelos que se encontram em desequilíbrio de ligação é a seleção, onde o argumento utilizado é que os haplótipos apresentam valores adaptativos diferentes de modo que certas combinações são favorecidas no processo evolutivo. Outro fenômeno que pode levar a valores de LD significativos é a migração, de modo que os haplótipos imigrantes podem apresentar combinações com frequências diferentes

daquelas esperadas considerando as frequências alélicas da população em estudo. Frequentemente o desequilíbrio de ligação resultante da migração se estende por loci que não estão ligados, entretanto, nesse caso, esse desequilíbrio desaparece rapidamente com os cruzamentos ao acaso [77]. O desequilíbrio de ligação pode ser originado em populações que sofreram recentemente uma redução no tamanho (bottleneck), o que aumenta o efeito da deriva genética e, conseqüentemente, poucas combinações alélicas são passadas para as gerações futuras. Embora a deriva genética possa influenciar no LD em populações pequenas, quando a população é grande os desvios são pequenos.

Os parâmetros utilizados para mensurar o LD (D , D' e r^2) apresentam diferenças em relação a interpretação dos valores obtidos. Os dois mais utilizados são o D' e r^2 onde o D' pode variar de -1 a 1 sendo que valores positivos são considerados associação entre os dois alelos em questão, enquanto valores negativos repulsão. Valores de D' iguais a 1 ou -1 indicam que apenas 3 dos 4 haplótipos possíveis estão presentes na amostra em estudo. Com esta particularidade o $D' = 1$ é bastante comum quando existe a presença de alelos raros, pois mesmo considerando o equilíbrio de ligação a frequência de determinados haplótipos é muito pequena e facilmente não é contemplada na amostra em estudo. Uma amostra pequena também pode levar a valores altos de D' , mesmo quando não existem alelos raros, mas apenas com frequências mais baixas. O r^2 pode variar de 0 a 1 e mede a correlação entre os dois marcadores estudados, valores iguais a 1 indicam que as variantes em estudo estão sempre na mesma fase e somente dois haplótipos estão presentes (ex. AB e ab), por outro lado $r^2 = 0$ seria a situação de completo equilíbrio de ligação. A interpretação do LD usando ambos os parâmetros permite uma visão mais ampla do fenômeno observado, onde valores de D' elevados e r^2 baixos indicam que não existe livre recombinação entre eles, porém a presença ou ausência de um dos marcadores não pode ser expandida para o outro marcador (uma tendência de estarem presentes apenas três haplótipos, com pares de alelos com frequências distintas). Valores de D' diferentes de 1 e r^2 alto

mostram que existe correlação entre eles, porém existe recombinação e os quatro haplótipos podem ser encontrados. Quando $D'=1$ e r^2 elevados indicam que não existem todas as combinações entre os alelos, mas também, que entre as presentes existe correlação (tendência de apenas dois haplótipos estarem presentes e com pequena diferença na frequência do par de alelos). Baixo D' e baixo r^2 implica na tendência de estarem presentes os quatro haplótipos e que a ligação dos alelos é ao acaso.

2 OBJETIVOS GERAIS

A diversidade dos genes *OR* ligados ao MHC humano ainda é pouco caracterizada, sendo que os polimorfismos genéticos conhecidos estão restritos ao estudo de poucas linhagens celulares [59; 78].

No presente trabalho temos como objetivo geral caracterizar os polimorfismos presentes nos genes *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* e *OR12D2* presentes no *MHC estendido (MHCx)*, em sessenta e um trios familiares (pai, mãe e filho) saudáveis e já genotipados para os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*.

A análise de segregação dos marcadores *HLA* no trio familiar se constitui estratégia adicional para caracterização dos alelos e haplótipos *OR-HLA*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e identificação dos alelos nos genes *OR* por meio da técnica de sequenciamento;
- Calcular frequências alélicas dos genes *OR* na amostra estudada;
- Definir haplótipos *OR* e frequências haplotípicas;
- Definir haplótipos *OR-HLA* e frequências haplotípicas;
- Determinar o desequilíbrio de ligação (LD) entre os diferentes genes *OR*, e também entre genes *OR* e genes *HLA*;
- Comparar haplótipos definidos através de análise de segregação com haplótipos inferidos através do Algoritmo EM.

3 JUSTIFICATIVA

O presente trabalho justifica-se pelo crescente número de artigos publicados, relacionando receptores olfatórios com a biologia comportamental e evolutiva. São várias as hipóteses que associam o sentido do olfato e o reconhecimento de indivíduos aparentados [27; 79], seleção em nível de gametas (*Sperm Receptor Selection*) [80; 81] e também escolha preferencial de parceiros baseados no genótipo MHC [8; 10; 12-24; 35]. A influência em outras características comportamentais não associadas ao processo reprodutivo, como por exemplo, a possível tendência ao hábito tabagista, também tem sido associada a certos haplótipos *HLA* [82]. No entanto, faltam informações adicionais sobre os genes OR situados no MHCx, tais como a presença de polimorfismos e outras características gênicas estruturais relacionadas às sequências reguladoras.

Dessa forma, o presente trabalho reveste-se de uma grande importância pela obtenção de dados e informações que se somarão àquelas já presentes na literatura, contribuindo para um melhor entendimento do papel biológico que os genes OR possam exercer.

4 ARTIGO

As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão serão apresentadas no artigo científico resultante do trabalho. O artigo está na formatação para ser enviado para a revista *Human Immunology*.

Genetic diversity of odorant receptors genes located at MHCx and linkage disequilibrium with classic HLA genes

José Samuel da Silva^{1,2}, Priscilla Fanini Wowk², Fabiana Poerner² and Maria da Graça Bicalho^{1,2*}.

¹ Genetics Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

² Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility, Genetics Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

ABSTRACT: The odorant receptor genes (OR) are the largest gene family of vertebrates, and may be over several thousand loci per individual, however the diversity in each of these loci are poorly characterized. The study of OR genes related to their reproductive function intersect with the studies of genes in the Major Histocompatibility Complex (MHC). The main goal of the present study was to investigate the genetic diversity of the *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* and *OR12D2* genes, define haplotypes and haplotypic frequencies and investigate the presence of linkage disequilibrium between these OR genes, and with *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1*, these HLA genes had been previously genotyped in the sample. The sample was composed of 61 family trios (father, mother and child) and 30 SNPs were observed which allowed the characterization of 26 alleles among the four OR genes. Nine new SNPs, not yet reported in the literature, were identified. Absolute linkage disequilibrium ($R^2=1$) was observed between the *OR2W6P*04* and *OR1F12*05* alleles. Segregation analysis was used in the trios to define haplotypes and allowed comparisons with inferred haplotypes by EM algorithm. The comparison between methods highlights the cautious use of the EM algorithm when the diversity of haplotypes is very high and there is the presence of rare haplotypes.

Keywords: MHC, HLA, Odorant Receptor, Mate choice, EM Algorithm.

INTRODUCTION

Since the discovery of odorant receptors genes (OR) by Buck and Axel in 1991 [48], a large number of genes that encode chemoreceptors related to Olfactory System have been identified [37; 39; 40]. The OR genes constitute the largest gene family in vertebrates and in humans there are approximately 350 functional OR genes and 414 pseudogenes, distributed in gene clusters in almost all chromosomes [72]. Despite such diversity, the number of receptors is still very small compared with potential odorants, suggesting an odor recognition system through the combinatorial activation of different OR [57]. Studies involving these chemoreceptors and reproduction intersect with studies related to the Major Histocompatibility Complex (MHC) genes, because the evolution of MHC could be related with mate choice.

MHC Class I and II proteins are associated with antigen presentation to T lymphocytes and control of cytotoxic activity of natural killer cells, key steps of immunosurveillance [83; 84]. The classical MHC genes present an allelic diversity that is not observed in other genes or regions of the human genome [85]. The understanding of evolutionary events that are involved in the generation and maintenance of this polymorphism has been the major focus of a large number of studies. One of the hypotheses that attempt to explain the nature of this polymorphism is based on MHC dependent mate choice [86].

Experimental evidences are suggestive of mate choice related to MHC-dissimilar partners in mice [10-14], lizards [15], fish [16; 17], birds [17; 18] and humans [19-24]. Evidences raised from several studies have demonstrated that MHC identity could be recognized by olfactory cues derived directly or indirectly from MHC molecules [9; 25; 28; 29; 31-35].

In humans, OR genes, linked to MHC Class I genes, were described in the so called extend MHC (xMHC) [73]. This uncovering was confirmed in several

other animal species investigated [76], increasing the curiosity concerning the biological significance of the link between genes that generate olfactory cues that represent the biological individuality (MHC), and genes that could recognize these olfactory cues (OR).

Faced with this panorama of the possible relationship between OR genes linked to MHC and HLA genes, more studies have detailed these OR genes, however the study of polymorphisms is still limited to few studies [59; 78; 87].

In the present study our aim was to characterize the polymorphisms in the *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* and *OR12D2* genes, estimate haplotypes and haplotypic frequencies, as well as assess the linkage disequilibrium between these OR genes and also with *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1*.

MATERIALS AND METHODS

Sample Characterization

The studied population was composed of sixty one (61) family trios (father, mother and child) from Parana population (South Brazil) already genotyped for genes *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1* in low resolution. These individuals were registered in the Brazilian National Registry of Bone Marrow Donors (REDOME) and in the database of the Laboratory for Histocompatibility and Immunogenetics (LIGH), Department of Genetics, of the Federal University of Paraná (UFPR). The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the UFPR (HC-UFPR/CEP-HC n°037ext.019/2001-07). All participants signed a free and informed consent form and completed a personal and occupational questionnaire. The criterion for inclusion in the sample was the presence of parents and at least one child registered in the LIGH database. Through self-classification, the ethnic group of this population

consists of whites (91%) and mixed (9%). The average age for parental generation is 49.87 (\pm 4.87) years, and the filial generation of 23.98 (\pm 3.16). Individual's genomic DNA sample were already extracted and stored at LIGH.

Sequencing of odorant receptor genes (OR)

The primers used for amplification and sequencing of the genes studied had already been described [59; 88]. The sequences are a) *OR2W6P*: Foward 5'TCTCTGCTATTACAGGCATTTCATCTT3', Reverse 5'CCCCATCTCATTAAATGCCTCTTCAG3'; b) *8R2B8P*: Foward 5'GGATGACACATGGAGAACGCATA3', Reverse 5'CATGGCCATGTCTTGACAAATGATA3'; c) *OR1F12*: Foward 5'CTGGCAAAAATATTTTCATTCTCTGGGT3', Reverse 5'GGAGAAGATTTTTCTTTGGCTTAGGGT3'; d) *OR12D2*: Foward 5'TCCCCAGAAGAAAGAAATACGT3', Reverse 5'GGCTAGTGTCTTGCATTTTCAA3'.

The first amplification reaction was performed in 200 μ l microtubes, final volume 50 μ l, using 50ng genomic DNA as template, 1X Taq Buffer (70 mM, Tris-HCl pH8.8, 20 mM(NH₄)₂SO₄), 2 mM MgCl₂, 0,25 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlshad, CA), 1 U of Taq DNA polymerase Platinum, 10 pMol of each primer, and water (18.2 MQcm).

Samples were subjected to 1 cycle (96° C - 2 minutes), 20 cycles (96° C - 30 seconds, 59-55° C - 30 seconds, 72° C - 3 minutes), 20 cycles (96° C - 30 seconds, 55° C - 30 seconds, 72° C - 3 minutes) and 1 cycle (72° C - 10 minutes). The PCR products (10 μ L) were purified by enzymatic method using 10 U Exonuclease I (EXO I) (United States Biochemical - USB, Staufen, Germany) and 2 U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) and 2X SAP Buffer (United States Biochemical - USB, Staufen, Germany) and then subjected to 37° C - 1 hour and 80° C - 15 minutes. After PCR products purification, samples were sequenced using an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.3 (Applied Biosystems, CA, USA). Subsequently, the samples were precipitated with 7.5 M sodium acetate (Celera) and ethanol 80% (Merck). The purified product was resuspended in 15 μ l of formamide and denatured at 96° C for 2 min, followed by thermal shock in a freezer -80° C for 40 seconds. Finally, the fragments were analyzed on ABI Primers 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) using POP7 (Applied Biosystems, CA, USA) polymer and 50 cm length capillar.

The sequences obtained were compared with reference sequences deposited in NCBI GenBank and also with the variants described in the NCBI dbSNP and HORDE (The Human Olfactory Receptor Data Exploratorium - Weizmann Institute of Science). For the characterization of the alleles the SNP segregation analysis was performed within family trio.

Statistical analysis

The SNPs, alleles and haplotype frequencies were calculated only with parental data through the program Arlequin 3.0 [89], the program Network 4.6.0.0 (Fluxus Technology LTD) was used to built a allele phylogenetic network for each OR gene studied.

The segregation analysis in families was also used to determine the haplotype between odorant receptor genes and human leukocyte antigens. We opted for the construction of three linkage groups: a) *OR2W6P-OR2B8P-OR1F12-OR12D2* b) *HLA-A-HLA-B-HLA-DRB1*, and c) *OR2W6P-OR2B8P-OR1F12-OR12D2-HLA-A-HLA-B-HLA-DRB1*. The haplotypic frequencies and linkage disequilibrium were calculate through the program Arlequin 3.0 [89]. The value of the significance level was adjusted to minimize false positive results, based on Bonferroni Correction [90] for 21 comparisons.

The allele typing of each individual obtained from the segregation analysis of SNPs were compared with those obtained through inference by Expectation Maximization (EM) algorithm included in the Arlequin 3.0 software [89] for each gene studied. This comparison was also performed considering OR and HLA haplotypes individually.

RESULTS AND DISCUSSION

The following results consider only the parental generation data (n = 122). Table 1 summarizes the SNP position, nucleotide variation and frequencies observed in the OR genes under investigation. The identification of each one of these variants was carried out according to the NCBI dbSNP or HORDE database. Nine out of 30 SNPs genotyped had not been described previously (highlighted in Table 1). Concerning the *OR1F12* and *OR12D2* genes three individuals couldn't be typed (n=119). As to the estimation of haplotypic frequencies and linkage disequilibrium only the haplotypes with no ambiguities on linkage phase status after segregation analysis were considered. The *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* and *OR12D2* allele frequencies and simplified nucleotide sequence (only variable sites) are show in Table 2.

In Figure 1 an evolutionary view on alleles` origin and graphical representation of their frequencies was made possible by building an allele phylogenetic network for each of these genes separately. In *OR2W6P* and *OR1F12* genes only one mutation differentiates the alleles 01 from the others; differently, the *OR2B8P* alleles rose from cumulative mutation that occurred just after the emergence of a new allele; finally, *OR12D2* exhibits two major alleles group that share six SNPs with different alleles in each group.

The frequencies of the ten most frequent haplotypes in the three linkage groups (OR, HLA and OR-HLA) are shown in Table 3. For the linkage group formed only by the allelic groups of *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1* haplotypic frequencies are well characterized in several populations, for example the haplotypes *HLA-A*01,-B*08,-DRB1*03* and *HLA-A*03,-B*07,-DRB1*15* are fairly frequent in populations of Caucasian origin and common in several other populations [91; 92]. In the present study these haplotypes were also found among the most frequent (Table 3).

In general, haplotypes composition is very informative for a better understanding of many biological phenomena. Nevertheless, in the absence of family data, haplotypes can not be deduced from the genotypes, except when the individual is

Table 1 – OR2W6P, OR2B8P, OR1F12 and OR12D2 , SNP position, SNP identification, nucleotide variation, aminoacid change and frequencies.

Gene	SNP position	dbSNP ID	Nucleotide Variation	Aminoacid change	Frequencies
OR2W6P <i>2n= 122</i> <i>949/998</i>	329	Not described	T/C		T= 0.9631 C= 0.0369
	411	Not described	G/A		G= 0.9959 A= 0.0041
	517	Not described	G/C		G= 0.9959 C= 0.0041
	736	Not described	T/C		T= 0.9754 C= 0.0246
OR2B8P <i>2n= 122</i> <i>951/951</i>	248	rs203886	G/A		G= 0.9877 A= 0.0123
	261	rs203887	C/T		C= 0.7295 T= 0.2705
	581	rs203888	G/A		G= 0.7295 A= 0.2705
	760	rs9468270	C/T		C= 0.9108 T= 0.0892
	767	rs203889	T/G		T= 0.7295 G= 0.2705
	845	rs35155115	-/G		- = 0.7008 G= 0.2992
	860	Not described	C/G		C= 0.9959 G= 0.0041
OR1F12 <i>2n= 119</i> <i>921/921</i>	83	Not described	TT/--		T= 0.9958 -= 0.0042
	575	rs35106887	--/CC		- = 0.8739 C= 0.12,61
	606	Not described	G/A	V/V	G= 0.9958 A= 0.0042
	654	Not described	T/C	Y/Y	T= 0.9958 C= 0.0042
	764	rs203870	T/A	I/N	T= 0.9706 A= 0.0294
	884	rs73396550	G/A	N/S	A= 0.8193 G= 0.1807
	921	rs203871	A/G	R/R	A= 0.9664 G= 0.0336
OR12D2 <i>2n= 119</i> <i>921/921</i>	32	1000GP (CHBJPT)	T/C	L/P	T= 0.9832 C= 0.0168
	79	rs36210739	G/A	V/M	G= 0.9958 A= 0.0042
	139	rs9257834	T/G	F/V	T= 0.4286 G= 0.5714
	167	rs4987411	C/T	P/L	C= 0.4286 T= 0.5714
	311	rs3128853	T/C	F/S	T= 0.9790 C= 0.0210
	339	rs2073154	G/C	L/F	G= 0.4286 C= 0.5714
	359	rs2073153	G/T	R/L	G= 0.4286 T= 0.5714
	362	rs2073152	G/C	C/S	G= 0.2017 C= 0.7983
	475	rs2073151	A/G	I/V	A= 0.4286 G= 0.5714
	722	Not described	C/-		C= 0.9958 -= 0.0042
	765	rs2073150	C/T	L/L	C= 0.4286 T= 0.5714
849	rs36211075	A/G	V/V	A= 0.9832 G= 0.0168	

Note: The positions highlighted indicate that the SNP has not been described in the literature. Field amino acid change that are not complete are either pseudogenes or changes in the reading frame that generate non-functional proteins. Below the name of each gene are the number of individuals successfully genotyped and the fraction of bases sequenced in relation to the size of the gene.

homozygous for all loci or heterozygous at only one locus, necessitating the use of statistical methods for haplotype inference from genotype data [93].

Boldt and colleagues [94] highlight the differences between haplotype inferences derived from EM and ELB algorithms, implemented in Arlequin 3.0

Table 2 – OR2W6P, OR2B8P, OR1F12 and OR12D2 allele frequencies and simplified nucleotide sequence.

	Alelles	Composition	Frequency
OR2W6P	01	TGGT	0.9303
	02	C***	0.0369
	03	***C	0.0246
	04	*A**	0.0041
	05	**C*	0.0041
OR2B8P	01	GCGCT-C	0.7008
	02	*TA*GG*	0.1803
	03	*TATGG*	0.0738
	04	*****G*	0.0287
	05	ATA*GG*	0.0082
	06	ATATGG*	0.0041
	07	*TATGGG	0.0041
OR1F12	01	T-GTTAA	0.6513
	02	*****G*	0.1807
	03	*C*****	0.1261
	04	***A*G	0.0294
	05	**C**G	0.0042
	06	**A****	0.0042
	07	--*****	0.0042
OR12D2	01	TGGTTCCTCGCTA	0.5336
	02	**TC*GGGA*C*	0.1975
	03	**TC*GG*A*C*	0.2059
	04	*****G	0.0168
	05	***C*****	0.0168
	06	C*TC*GG*A*C*	0.0168
	07	*ATC*GGGA*C*	0.0042
	08	*****_**	0.0042
	09	**TCCGG*A*C*	0.0042

Note: The asterisks indicate that the nucleotide in question is equal to the reference sequence of the allele * 01.

software [89], and data obtained by sequence-specific typing (known gametic phase) of the gene MBL2. The same study identified errors in the definition of haplotypes and also increasing the number of new spurious haplotypes using the methods EM and ELB, suggesting attention mainly to determine the haplotypes of lower frequency [94].

In this study the choice of families for the sample composition was the strategy adopted to help in the

haplotypes definitions and the EM algorithm [95] used as an additional tool to compare with family data.

Comparisons between inference and haplotype segregation analysis highlighted the use of haplotype inference warily, since the discrepancy between the results varies greatly depending on the diversity and haplotype frequencies. In the definition of SNP haplotypes to determine OR alleles, the EM algorithm showed no disagreement with the segregation analysis of *OR2W6P* alleles, a disagreement in an individual in *OR2B8P* and *OR1F12* alleles, and in two individuals in *OR12D2* alleles. For these genes the maximum number of alleles (SNP haplotypes) found was 9 for the *OR12D2* gene (Table 2). The greater the haplotypes diversity composition is more spurious haplotypes rise when EM algorithm is applied. This was observed when the haplotypes for the OR and HLA linkage groups were analyzed.

For the haplotypes formed only with four OR genes 38 haplotypes were found by EM algorithm, while by segregation analysis 36. When analyzing the composition of the haplotypes, 9 haplotypes were present through the EM method and absent through segregation analysis, and 7 present in segregation analysis were missing in EM. When the haplotypes assigned for each individual separately were compared the differences increased. Linkage phase without ambiguity was possible to define for 89 individuals through segregation analysis, out of these 46 had only one possibility of connection phase; in the remaining 43, 32.58% individuals were misassigned through EM algorithm.

When this comparison was performed for the haplotype with the three HLA genes, which exhibit a greater genetic diversity, the differences became even higher. Through segregation analysis 184 haplotypes were found, but only 87 of them were listed among the 171 haplotypes inferred by EM. Of the 115 individuals where the phase could be determined through the segregation analysis, all had more than one possible combination for the haplotypes constitution, 55 individuals were misassigned through EM algorithm (47.82%).

Despite the difference in definition of the linkage phase achieved in this study and those presented by Boldt [94], the results are in agreement that the haplotype inference is more prone to errors in samples where there is greater diversity and presence of rare haplotypes.

All levels of analysis (only SNP; OR alleles and HLA allelic groups; OR, HLA and OR-HLA haplotypes) were in Hardy-Weiberg Equilibrium ($p > 0.05$).

Table 4 presents an overview of linkage disequilibrium (LD) in the pairwise comparisons. When linkage disequilibrium is viewed in terms of alleles it is possible to identify which alleles are responsible for the observed disequilibrium between genes. As to HLA genic system there are some well-characterized linkage groups worldwide, for example, *HLA-A*01*, *-B*08* and *HLA-A*03*, *-B*07* [92]. There are also Conserved Extended Haplotypes (CEH) where the LD might extended most times from *HLA-B* locus and goes beyond *HLA-DP sub-region* [96]. Table 5 shows the LD parameters D' and r^2 for comparisons in OR-OR and OR-HLA genes where $p < 0.05$ after the correction, these parameters are not show for HLA-

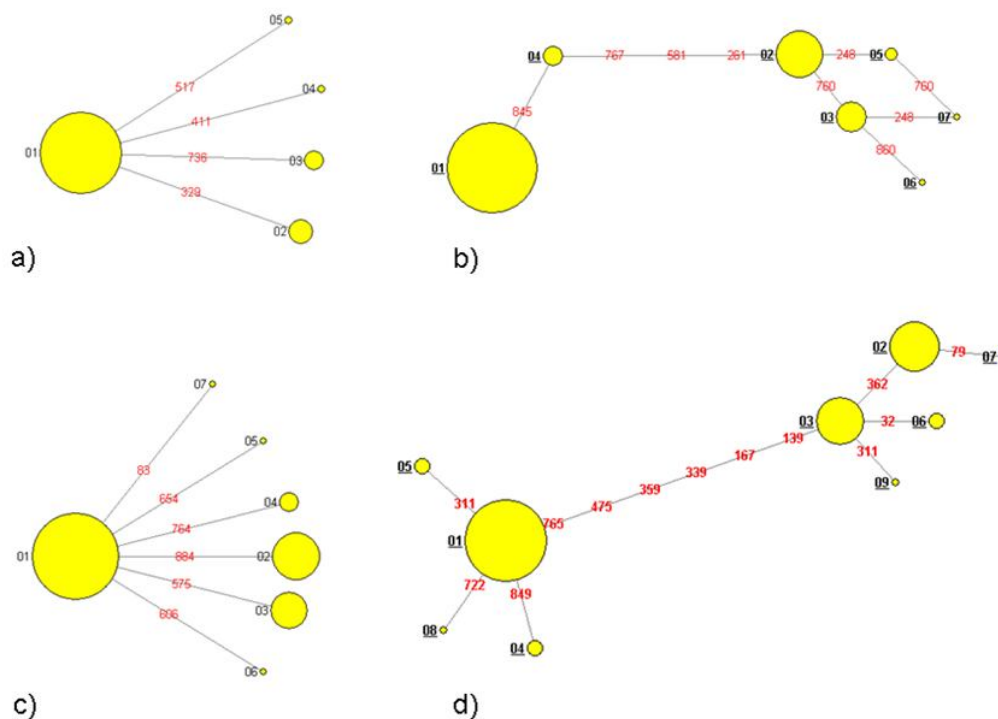


Figure 1 – Allele phylogenetics network. a) *OR2W6P*: only one mutation differentiates the alleles 02, 03, 04 and 05 from 01 allele. b) *OR2B8P*: alleles rose from cumulative mutation that occurred just after the emergence of new allele. c) *OR1F12* alleles also derived from isolated mutations that occurred in the most frequent allele. d) *OR12D2* presents two major alleles group that share six SNP with different alleles in each group.

Note: The size of the circles is proportional to the alleles frequencies, the lines represent the SNP differences between the alleles, the numbers in black are the names adopted for each of the alleles, and the numbers in red are the points of mutation that the allele differs from its origin.

Table 3 – Three groups of the ten most frequent haplotype

OR Haplotype 2W6P-2B8P-1F12-12D2		HLA Haplotype A-B-DRB1		HLA-OR Haplotype 2W6P-2B8P-1F12-12D2-A-B-DRB1	
Freq.	(n=178)	Freq.	(n=230)	Freq.	(n=178)
0.348	01 01 01 01	0.026	02 15 13	0.017	01 01 01 01 02 49 13
0.096	01 01 01 02	0.022	03 07 15	0.017	01 01 01 01 03 35 01
0.056	01 01 02 01	0.017	03 07 04	0.017	01 01 01 02 03 07 15
0.051	01 01 01 03	0.017	01 08 03	0.011	01 01 02 05 23 49 11
0.045	01 01 02 03	0.017	02 50 07	0.011	01 01 01 01 11 35 01
0.045	01 02 01 03	0.017	11 35 01	0.011	01 01 01 03 11 35 01
0.045	01 02 01 01	0.017	03 35 01	0.011	01 02 01 03 02 15 13
0.039	01 01 02 02	0.013	02 49 13	0.011	01 01 01 01 31 39 08
0.028	01 02 03 01	0.013	02 15 14	0.006	03 01 01 03 03 07 04
0.022	01 01 02 05	0.013	02 27 01	0.006	01 01 02 02 01 44 11

TABLE 4 – LINKAGE DISEQUILIBRIUM BETWEEN OR AND HLA GENES

<i>Locus</i>	0	1	2	3	4	5	6
0	*						
1	+	*					
2	+	+	*				
3	-	-	+	*			
4	-	-	+	+	*		
5	-	-	-	-	+	*	
6	-	-	-	-	+	+	*

Note: 0) *OR2W6P*; 1) *OR2B8P*; 2) *OR1F12*; 3) *OR12D2*; 4) *HLA-A*; 5) *HLA-B*; 6) *HLA-DRB1*.

HLA.

Santos and colleagues [88] detected linkage disequilibrium between SNP located in some OR genes belonging to MHCx, however they did not observe LD between SNP in different OR genes located in MHCx. In the present study the calculations of D , D' and r^2 parameters between SNP of the same gene are not shown, however a graphic view of the LD can be visualize for some SNP present in *OR2B8P* and *OR12D2* genes (Figure 1 (b) and d) respectively), which are arranged in two main groups.

In Figure 1 the lines separating any two alleles show the location of the SNPs that differentiate them. When more than one SNP are present in the line it means association between these SNPs considering that the characterization of one allele demands the nucleotide variant always at the same phase. As to *OR2B8P* gene the allele 01 shows the variants C, G, T, "del" in positions 261,581,767 and 845, while the alternative alleles 02, 03, 05, 06 and 07 show the variations T, A, G, G in the same positions, indicating complete linkage disequilibrium between these SNPs. In the *OR12D2* the alleles 01, 04, 05, 08 share the variants G, T, C, T, G, T at positions 139, 167, 339, 359, 475 and 765 while alleles 02, 03, 06, 07 and 09 variants T, C, G, G, A, C in the same positions, also indicating complete LD between these markers.

Linkage disequilibrium between OR genes belonging to MHCx and HLA was detected in this study as shown in Table 4 and 5. The LD was observed among the three loci belonging to the telomeric cluster (*OR2W6P*, *OR2B8P* and *OR1F12*), but the comparison with *OR12D2*, belonging to the centromeric cluster, the LD was observed only with gene *OR1F12* (physically closest). LD between HLA and OR genes was only observed between *HLA-A* and *OR12D2* and *HLA-A* and *OR1F12*. When the LD is viewed in terms of alleles the observed significance is derived from a few alleles that are in LD (Table 5). Thompson and colleagues [87] did not detect significant levels of LD between HLA and OR genes in a sample where it was detected MHC mate choice preference in a previous study by the same group [23]. In their study they evaluated the mate preference based on olfactory cues, HLA genes and OR genes belonging to the MHCx. No association was observed between mate choices and OR genes, even though they found association between HLA and mate preferences [87]. Although the OR genes are the largest gene family and OR genes clusters are not presented in only two

human chromosomes [72], since their discovery in the MHCx region, raised the hypothesis that the allocation in the same genome region, of genes capable of generating an "odortype" (MHC genes) and those able to recognize these olfactory cues (OR genes), could result in the selection of specific combinations of haplotypes MHC-OR prone to drive the mate choice [59; 74; 80; 97]. In humans, few studies have investigated this hypothesis in humans and the results are still contradictory. However, evidences of LD observed by others investigators are very suggestive of functional MHC-OR genes association [59; 91], while others have not observed the same trend [87]. In this work was found small indices of LD between less frequent alleles. The linkage disequilibrium phenomenon between unusual alleles could be derived from a recent populational admixture leading to a significant linkage disequilibrium, although transient [98]. In spite of the observed LD between some alleles in OR-HLA gene cluster there is no strong evidences that certain haplotypes account for specific OR-HLA genes combinations. From our emerged LD data it was not possible to sum evidences that favour mate preference as a result of the selection of OR-HLA haplotypes during the evolutionary process.

Table 5 – Linkage disequilibrium between OR and HLA alleles ($P_c < 0,05$)

ALELLES	D'	R^2
<i>OR2W6P</i> * / <i>OR2B8P</i> *		
*02 / *02	1,000	0,1869
*05 / *03	1,000	0,0614
*04 / *04	1,000	0,1955
<i>OR2W6P</i> * / <i>OR1F12</i> *		
*02 / *03	0,6360	0,1533
*04 / *05	1,000	1,0000
<i>OR2B8P</i> * / <i>OR1F12</i> *		
*02 / *03	0,6044	0,1801
*04 / *05	1,000	0,1955
*04 / *04	0,7942	0,6308
*05 / *07	1,000	0,4972
<i>OR1F12</i> * / <i>OR12D2</i> *		
*02 / *05	1,000	0,1010
*06 / *06	1,000	0,4972
<i>OR1F12</i> * / <i>HLA-A</i> *		
*02 / *23	0,4831	0,0761
*07 / *33	1,000	0,2454
*06 / *31	1,000	0,0854
<i>OR12D2</i> * / <i>HLA-A</i> *		
*05 / *23	0,7321	0,1864
*07 / *31	1,000	0,0854
*04 / *30	1,000	0,4939
*08 / *30	1,000	0,2454

CONCLUSION

Considering the possible influence of MHC genes and their relationship with OR genes in the mate choice preferences, the OR gene polymorphisms linked to the MHC were still poorly characterized. This article focused on the diversity of *OR2W6P*, *8R2B8P*, *OR1F12* and *OR12D2* genes in a sample of Caucasian origin in southern Brazil showed that HLA and OR genes were in linkage equilibrium in almost all alleles. Results also emphasize the cautious use of EM algorithm for haplotype inference when there are many rare haplotypes.

Regarding the evolutionary significance of the proximity of genes capable of generating "odortype" (MHC genes) and genes that recognize these olfactory cues (OR genes), there is no strong evidence that certain haplotypes account for specific OR-HLA gene combinations, which remains a matter of debate. New studies to assess this possible association should be performed in different species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the LIGH-FUNPAR Alliance Research Fund. We are very grateful to the volunteer bone marrow donors for generously acceding to provide samples for this study. We also thank LIGH staff for technical support.

REFERENCES

- Buck, L. and R. Axel, *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. Cell, 1991. 65(1): p. 175-87.
- Fleischer, J., H. Breer, and J. Strotmann, *Mammalian olfactory receptors*. Front Cell Neurosci, 2009. 3: p. 9.
- Nei, M., Y. Niimura, and M. Nozawa, *The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity*. Nat Rev Genet, 2008. 9(12): p. 951-63.
- Dryer, L. and A. Berghard, *Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(10): p. 413-7.
- Malnic, B., P.A. Godfrey, and L.B. Buck, *The human olfactory receptor gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(8): p. 2584-9.
- Malnic, B., et al., *Combinatorial receptor codes for odors*. Cell, 1999. 96(5): p. 713-23.
- Chazara, O., S. Xiong, and A. Moffett, *Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance*. J Leukoc Biol, 2011. 90(4): p. 703-16.
- Bernatchez, L. and C. Landry, *MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?* Journal of Evolutionary Biology, 2003. 16(3): p. 363-377.
- Robinson, J., et al., *The IMGT/HLA database*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(Database issue): p. D1171-6.
- Meyer, D. and G. Thomson, *How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review*. Annals of Human Genetics, 2001. 65: p. 1-26.
- Yamazaki, K., et al., *Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex*. J Exp Med, 1976. 144(5): p. 1324-35.
- Penn, D. and W. Potts, *MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering*. Proc Biol Sci, 1998. 265(1403): p. 1299-306.
- Yamazaki, K., et al., *Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains* Immunogenetics, 1978. 104: p. 253-259.
- Eklund, A., *The Major Histocompatibility Complex and Mating Preferences in wild mice (Mus domesticus)*. Behav. Ecol., 1997. 8: p. 630-634.
- Egid, K. and J.L. Brown, *The Major Histocompatibility Complex and female mating preferences in mice*. Anim Behav, 1989. 38: p. 548-549.
- Olsson, M., et al., *Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards*. Proc Biol Sci, 2003. 270 Suppl 2: p. S254-6.
- Landry, C., et al., *'Good genes as heterozygosity': the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (Salmo salar)*. Proc Biol Sci, 2001. 268(1473): p. 1279-85.
- Bonneaud, C., et al., *Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine*. Proc Biol Sci, 2006. 273(1590): p. 1111-6.
- Richardson, D.S., et al., *MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler*. Proc Biol Sci, 2005. 272(1564): p. 759-67.
- Wedekind, C., et al., *MHC-dependent mate preferences in humans*. Proc Biol Sci, 1995. 260(1359): p. 245-9.
- Wedekind, C. and S. Furi, *Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity?* Proc Biol Sci, 1997. 264(1387): p. 1471-9.
- Ober, C., et al., *HLA and mate choice in humans*. Am J Hum Genet, 1997. 61(3): p. 497-504.
- Thornhill, R., et al., *Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women*. 2003.
- Jacob, S., et al., *Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor*. Nat Genet, 2002. 30(2): p. 175-9.
- Santos, P.S., et al., *New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students*. Horm Behav, 2005. 47(4): p. 384-8.
- Yamazaki, K., et al., *Recognition among mice. Evidence from the use of a Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types*. J Exp Med, 1979. 150(4): p. 755-60.
- Penn, D. and W. Potts, *How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences?* Adv Immunol, 1998. 69: p. 411-36.
- Penn, D., *The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex*. Ethology, 2002. 108: p. 1-21.
- Yamazaki, K., et al., *A distinctive change in odortype determined by H-2D/L mutation*. Immunogenetics, 1991. 34(2): p. 129-31.
- Yamazaki, K., et al., *Sensory distinction between H-2b and H-2bm1 mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(18): p. 5685-8.
- Singh, P.B., R.E. Brown, and B. Roser, *MHC antigens in urine as olfactory recognition cues*. Nature, 1987. 327(6118): p. 161-4.

32. Singh, P.B., *The present status of the "carrier hypothesis" for chemosensory recognition cues.* *Genetica*, 1999. 104: p. 231 - 233.
33. Singer, A.G., G.K. Beauchamp, and K. Yamazaki, *Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(6): p. 2210-4.
34. Howard, J.C., *H-2 and mating preferences.* *Nature*, 1977. 266: p. 406 - 408.
35. Fan, W., et al., *Olfactory receptor-like genes are located in the human major histocompatibility complex.* *Genomics*, 1995. 27(1): p. 119-23.
36. Santos, P.S., et al., *Genomic architecture of MHC-linked odorant receptor gene repertoires among 16 vertebrate species.* *Immunogenetics*, 2010.
37. Ehlers, A., et al., *MHC-linked olfactory receptor loci exhibit polymorphism and contribute to extended HLA/OR-haplotypes.* *Genome Res*, 2000. 10(12): p. 1968-78.
38. Santos, P.S., et al., *Variation and linkage disequilibrium within odorant receptor gene clusters linked to the human major histocompatibility complex.* *Hum Immunol*, 2010.
39. Thompson, E.E., et al., *Sequence variations at the human leukocyte antigen-linked olfactory receptor cluster do not influence female preferences for male odors.* *Hum Immunol*, 2010. 71(1): p. 100-3.
40. Carvalho Santos, P.S., et al., *Variation and linkage disequilibrium within odorant receptor gene clusters linked to the human major histocompatibility complex.* *Hum Immunol*, 2010.
41. Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis.* *Evol Bioinform Online*, 2005. 1: p. 47-50.
42. Tanner, M.S., M.J. Sharrard, and A.S. Rigby, *Gene polymorphisms and the use of the bonferroni correction factor: when and when not to apply?* *Arch Dis Child*, 1997. 76(4): p. 386.
43. Santos, P.S., et al., *Association of smoking behavior with an odorant receptor allele telomeric to the human major histocompatibility complex.* *Genet Test*, 2008. 12(4): p. 481-6.
44. Alper, C.A., et al., *The haplotype structure of the human major histocompatibility complex.* *Hum Immunol*, 2006. 67(1-2): p. 73-84.
45. Tregouet, D.A., et al., *A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm.* *Ann Hum Genet*, 2004. 68(Pt 2): p. 165-77.
46. Boldt, A.B., et al., *Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes.* *BMC Genet*, 2010. 11: p. 38.
47. Excoffier, L. and M. Slatkin, *Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.* *Mol Biol Evol*, 1995. 12(5): p. 921-7.
48. Yunis, E.J., et al., *Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks.* *Tissue Antigens*, 2003. 62(1): p. 1-20.
49. Ziegler, A., G. Dohr, and B. Uchanska-Ziegler, *Possible roles for products of polymorphic MHC and linked olfactory receptor genes during selection processes in reproduction.* *Am J Reprod Immunol*, 2002. 48(1): p. 34-42.
50. Younger, R.M., et al., *Characterization of clustered MHC-linked olfactory receptor genes in human and mouse.* *Genome Res*, 2001. 11(4): p. 519-30.
51. Ziegler, A., et al., *Polymorphisms in olfactory receptor genes: a cautionary note.* *Hum Immunol*, 2000. 61(12): p. 1281-4.
52. Ardlie, K.G., L. Kruglyak, and M. Seielstad, *Patterns of linkage disequilibrium in the human genome.* *Nat Rev Genet*, 2002. 3(4): p. 299-309.

5 CONCLUSÃO

Diante do panorama da possível influência dos genes MHC e sua relação com genes *OR* na escolha preferencial de parceiros, e ao pouco conhecimento a respeito dos polimorfismos dos genes *OR* ligados ao MHC, o presente trabalho apresentou a diversidade encontrada nos genes *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* e *OR12D2* em uma amostra predominantemente de origem caucasóide da Região Sul do Brasil. Foram observados 30 SNPs ao longo dos 4 genes sendo que 9 ainda não haviam sido descritos. O desequilíbrio de ligação entre os genes *OR* e HLA também foi investigado sugerindo a existência de equilíbrio de ligação entre a maioria dos alelos.

Ressaltamos também o uso com cautela do método EM de inferência haplotípica quando existem muitos haplótipos raros.

Com relação ao significado evolutivo da proximidade entre genes capazes de gerar o “odortipo” (genes MHC) e genes capazes de reconhecer estas pistas olfativas (genes *OR*), não encontramos forte desequilíbrio entre estes genes, no entanto os resultados entre diferentes trabalhos ainda são bastante contraditórios e novos estudos que possam avaliar esta possível associação precisam ser realizados em diferentes espécies.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHARLES A JANEWAY, J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *J. Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science, 2001.
2. ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, v. 248, p. 701-2, 1974.
3. DOHERTY, P. C.; ZINKERNAGEL, R. M. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*, v. 256, p. 50-2, 1975.
4. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*, v. 401, p. 921-3, 1999.
5. MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann Hum Genet*, v. 65, p. 1-26, 2001.
6. MILINSKI, M. The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice. *Annu Rev. Ecol. Evol. Syst*, v. 37, p. 159-186, 2006.
7. APANIUS, V.; PENN, D.; SLEV, P. R.; RUFF, L. R.; POTTS, W. K. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol*, v. 17, p. 179-224, 1997.
8. PENN, D.; POTTS, W. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. *Am Nat*, v. 153, p. 145-164, 1999.
9. PENN, D. The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology*, v. 108, p. 1-21, 2002.
10. YAMAZAKI, K.; BOYSE, E. A.; MIKE, V.; THALER, H. T.; MATHIESON, B. J.; ABBOTT, J.; BOYSE, J.; ZAYAS, Z. A.; THOMAS, L. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med*, v. 144, p. 1324-35, 1976.
11. PENN, D.; POTTS, W. MHC-disassortative mating preferences reversed by cross-fostering. *Proc Biol Sci*, v. 265, p. 1299-306, 1998.
12. YAMAZAKI, K.; YAMAGUCHI, M.; ANDREWS, P. W.; PEAKE, B.; BOYSE, E. A. Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains *Immunogenetics*, v. 104, p. 253-259, 1978.
13. EKLUND, A. The Major Histocompatibility Complex and Mating Preferences in wild mice (*Mus domesticus*). *Behav. Ecol.*, v. 8, p. 630-634, 1997.
14. EGID, K.; BROWN, J. L. The Major Histocompatibility Complex and female mating preferences in mice. *Anim Behav*, v. 38, p. 548-549, 1989.
15. OLSSON, M.; MADSEN, T.; NORDBY, J.; WAPSTRA, E.; UJVARI, B.; WITTESELL, H. Major histocompatibility complex and mate choice in sand lizards. *Proc Biol Sci*, v. 270 Suppl 2, p. S254-6, 2003.
16. LANDRY, C.; GARANT, D.; DUCHESNE, P.; BERNATCHEZ, L. 'Good genes as heterozygosity': the major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proc Biol Sci*, v. 268, p. 1279-85, 2001.
17. BONNEAUD, C.; CHASTEL, O.; FEDERICI, P.; WESTERDAHL, H.; SORCI, G. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proc Biol Sci*, v. 273, p. 1111-6, 2006.
18. RICHARDSON, D. S.; KOMDEUR, J.; BURKE, T.; VON SCHANTZ, T. MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proc Biol Sci*, v. 272, p. 759-67, 2005.

19. WEDEKIND, C.; SEEBECK, T.; BETTENS, F.; PAEPKE, A. J. MHC-dependent mate preferences in humans. *Proc Biol Sci*, v. 260, p. 245-9, 1995.
20. WEDEKIND, C.; FURI, S. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc Biol Sci*, v. 264, p. 1471-9, 1997.
21. OBER, C.; WEITKAMP, L. R.; COX, N.; DYTCH, H.; KOSTYU, D.; ELIAS, S. HLA and mate choice in humans. *Am J Hum Genet*, v. 61, p. 497-504, 1997.
22. THORNHILL, R.; GANGESTAD, S. W.; MILLER, R.; SCHEYD, G.; MCCOLLOUGH, J. K.; FRANKLIN, M. Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women. v., 2003.
23. JACOB, S.; MCCLINTOCK, M. K.; ZELANO, B.; OBER, C. Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. *Nat Genet*, v. 30, p. 175-9, 2002.
24. SANTOS, P. S.; SCHINEMANN, J. A.; GABARDO, J.; BICALHO MDA, G. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. *Horm Behav*, v. 47, p. 384-8, 2005.
25. PENN, D.; POTTS, W. How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? *Adv Immunol*, v. 69, p. 411-36, 1998.
26. POTTS, W. K.; WAKELAND, E. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends Ecol Evol*, v. 5, p. 181-187, 1990.
27. BROWN, J. L.; EKLUND, A. Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review. *Am Nat*, v. 143, p. 435 - 461, 1994.
28. YAMAZAKI, K.; YAMAGUCHI, M.; BARANOSKI, L.; BARD, J.; BOYSE, E. A.; THOMAS, L. Recognition among mice. Evidence from the use of a Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types. *J Exp Med*, v. 150, p. 755-60, 1979.
29. YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G. K.; SHEN, F. W.; BARD, J.; BOYSE, E. A. A distinctive change in odortype determined by H-2D/L mutation. *Immunogenetics*, v. 34, p. 129-31, 1991.
30. BARD, J.; YAMAZAKI, K.; CURRAN, M.; BOYSE, E. A.; BEAUCHAMP, G. K. Effect of B2m gene disruption on MHC-determined odortypes. *Immunogenetics*, v. 51, p. 514-8, 2000.
31. YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G. K.; EGOROV, I. K.; BARD, J.; THOMAS, L.; BOYSE, E. A. Sensory distinction between H-2b and H-2bm1 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, p. 5685-8, 1983.
32. SINGH, P. B.; BROWN, R. E.; ROSER, B. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature*, v. 327, p. 161-4, 1987.
33. SINGH, P. B. The present status of the "carrier hypothesis" for chemosensory recognition cues. *Genetica*, v. 104, p. 231 - 233, 1999.
34. SINGER, A. G.; BEAUCHAMP, G. K.; YAMAZAKI, K. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 2210-4, 1997.
35. HOWARD, J. C. H-2 and mating preferences. *Nature*, v. 266, p. 406 - 408, 1977.
36. BAUM, M. J.; KELLIHER, K. R. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol*, v. 71, p. 141-60, 2009.
37. FLEISCHER, J.; BREER, H.; STROTMANN, J. Mammalian olfactory receptors. *Front Cell Neurosci*, v. 3, p. 9, 2009.
38. MENGARELLI, R. R. MHC e Olfato. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.
39. NEI, M.; NIIMURA, Y.; NOZAWA, M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet*, v. 9, p. 951-63, 2008.
40. DRYER, L.; BERGHARD, A. Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v. 20, p. 413-7, 1999.

41. FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, v. 413, p. 211-8, 2001.
42. BUCK, L. B. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr Rev*, v. 62, p. S184-8; discussion S224-41, 2004.
43. PACE, U.; HANSKI, E.; SALOMON, Y.; LANCET, D. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature*, v. 316, p. 255-8, 1985.
44. NAKAMURA, T.; GOLD, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, v. 325, p. 442-4, 1987.
45. DHALLAN, R. S.; YAU, K. W.; SCHRADER, K. A.; REED, R. R. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, v. 347, p. 184-7, 1990.
46. JONES, D. T.; REED, R. R. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, v. 244, p. 790-5, 1989.
47. FIRESTEIN, S.; DARROW, B.; SHEPHERD, G. M. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron*, v. 6, p. 825-35, 1991.
48. BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, v. 65, p. 175-87, 1991.
49. GIMELBRANT, A. A.; STOSS, T. D.; LANDERS, T. M.; MCCLINTOCK, T. S. Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells. *J Neurochem*, v. 72, p. 2301-11, 1999.
50. MCCLINTOCK, T. S.; LANDERS, T. M.; GIMELBRANT, A. A.; FULLER, L. Z.; JACKSON, B. A.; JAYAWICKREME, C. K.; LERNER, M. R. Functional expression of olfactory-adrenergic receptor chimeras and intracellular retention of heterologously expressed olfactory receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 48, p. 270-8, 1997.
51. HUGHES, A. L.; HUGHES, M. K. Adaptive evolution in the rat olfactory receptor gene family. *J Mol Evol*, v. 36, p. 249-54, 1993.
52. SINGER, M. S.; SHEPHERD, G. M. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *Neuroreport*, v. 5, p. 1297-300, 1994.
53. SCHWARTZ, T. W.; ROSENKILDE, M. M. Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci*, v. 17, p. 213-6, 1996.
54. KATADA, S.; HIROKAWA, T.; OKA, Y.; SUWA, M.; TOUHARA, K. Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J Neurosci*, v. 25, p. 1806-15, 2005.
55. ABAFFY, T.; MALHOTRA, A.; LUETJE, C. W. The molecular basis for ligand specificity in a mouse olfactory receptor: a network of functionally important residues. *J Biol Chem*, v. 282, p. 1216-24, 2007.
56. GLUSMAN, G.; CLIFTON, S.; ROE, B.; LANCET, D. Sequence analysis in the olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: recombinatorial events affecting receptor diversity. *Genomics*, v. 37, p. 147-60, 1996.
57. MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, v. 96, p. 713-23, 1999.
58. NOZAWA, M.; KAWAHARA, Y.; NEI, M. Genomic drift and copy number variation of sensory receptor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 20421-6, 2007.
59. EHLERS, A.; BECK, S.; FORBES, S. A.; TROWSDALE, J.; VOLZ, A.; YOUNGER, R.; ZIEGLER, A. MHC-linked olfactory receptor loci exhibit polymorphism and contribute to extended HLA/OR-haplotypes. *Genome Res*, v. 10, p. 1968-78, 2000.
60. RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A. M.; SCHAEFER, M. L.; LIN, W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm Behav*, v. 46, p. 247-56, 2004.

61. O'CONNELL, R. J.; MEREDITH, M. Effects of volatile and nonvolatile chemical signals on male sex behaviors mediated by the main and accessory olfactory systems. *Behav Neurosci*, v. 98, p. 1083-93, 1984.
62. SPEHR, M., ET AL. Detection of MHC class I peptides by the mammalian main olfactory system. *Chem Senses*, v. 30, p. 54, 2005.
63. RESTREPO, D.; LIN, W.; SALCEDO, E.; YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G. Odortypes and MHC peptides: Complementary chemosignals of MHC haplotype? *Trends Neurosci*, v. 29, p. 604-9, 2006.
64. GILAD, Y.; PRZEWORSKI, M.; LANCET, D. Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates. *PLoS Biol*, v. 2, p. E5, 2004.
65. ZHANG, X.; DE LA CRUZ, O.; PINTO, J. M.; NICOLAE, D.; FIRESTEIN, S.; GILAD, Y. Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray. *Genome Biol*, v. 8, p. R86, 2007.
66. BALAKIREV, E. S.; AYALA, F. J. Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu Rev Genet*, v. 37, p. 123-51, 2003.
67. DURET, L.; CHUREAU, C.; SAMAIN, S.; WEISSENBAACH, J.; AVNER, P. The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. *Science*, v. 312, p. 1653-5, 2006.
68. ZHENG, D.; GERSTEIN, M. B. The ambiguous boundary between genes and pseudogenes: the dead rise up, or do they? *Trends Genet*, v. 23, p. 219-24, 2007.
69. MEREDITH, M. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses*, v. 26, p. 433-45, 2001.
70. SHEPHERD, G. M. Behaviour: smells, brains and hormones. *Nature*, v. 439, p. 149-51, 2006.
71. KELLER, A.; ZHUANG, H.; CHI, Q.; VOSSHALL, L. B.; MATSUNAMI, H. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature*, v. 449, p. 468-72, 2007.
72. MALNIC, B.; GODFREY, P. A.; BUCK, L. B. The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 2584-9, 2004.
73. FAN, W.; LIU, Y. C.; PARIMOO, S.; WEISSMAN, S. M. Olfactory receptor-like genes are located in the human major histocompatibility complex. *Genomics*, v. 27, p. 119-23, 1995.
74. YOUNGER, R. M.; AMADOU, C.; BETHEL, G.; EHLERS, A.; LINDAHL, K. F.; FORBES, S.; HORTON, R.; MILNE, S.; MUNGALL, A. J.; TROWSDALE, J.; VOLZ, A.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Characterization of clustered MHC-linked olfactory receptor genes in human and mouse. *Genome Res*, v. 11, p. 519-30, 2001.
75. UEHARA, C. J. S. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES OR2I1P, OR12D3, OR14J1, OR2B4P, OR2E1P, OR1F12, OR2B8P, OR2B7P, OR2W2P, OR2W4P, OR2B6 E OR2W6P EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008.
76. SANTOS, P. S.; KELLERMANN, T.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; ZIEGLER, A. Genomic architecture of MHC-linked odorant receptor gene repertoires among 16 vertebrate species. *Immunogenetics*, v., 2010.
77. FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. T. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol*, v. 54, p. 357-74, 2003.
78. SANTOS, P. S.; SEKI UEHARA, C. J.; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; BICALHO, M. D. Variation and linkage disequilibrium within odorant receptor gene clusters linked to the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol*, v., 2010.
79. PORTER, R. H.; MOORE, J. D. Human kin recognition by olfactory cues. *Physiol Behav*, v. 27, p. 493-5, 1981.
80. ZIEGLER, A.; DOHR, G.; UCHANSKA-ZIEGLER, B. Possible roles for products of polymorphic MHC and linked olfactory receptor genes during

- selection processes in reproduction. *Am J Reprod Immunol*, v. 48, p. 34-42, 2002.
81. ZIEGLER, A.; KENTENICH, H.; UCHANSKA-ZIEGLER, B. Female choice and the MHC. *Trends Immunol*, v. 26, p. 496-502, 2005.
 82. FUST, G.; ARASON, G. J.; KRAMER, J.; SZALAI, C.; DUBA, J.; YANG, Y.; CHUNG, E. K.; ZHOU, B.; BLANCHONG, C. A.; LOKKI, M. L.; BODVARSSON, S.; PROHASZKA, Z.; KARADI, I.; VATAY, A.; KOVACS, M.; ROMICS, L.; THORGEIRSSON, G.; YU, C. Y. Genetic basis of tobacco smoking: strong association of a specific major histocompatibility complex haplotype on chromosome 6 with smoking behavior. *Int Immunol*, v. 16, p. 1507-14, 2004.
 83. CHAZARA, O.; XIONG, S.; MOFFETT, A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol*, v. 90, p. 703-16, 2011.
 84. BERNATCHEZ, L.; LANDRY, C. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evolution Biol*, v. 16, p. 363-377, 2003.
 85. ROBINSON, J.; MISTRY, K.; MCWILLIAM, H.; LOPEZ, R.; PARHAM, P.; MARSH, S. G. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*, v. 39, p. D1171-6, 2011.
 86. MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Annals of Human Genetics*, v. 65, p. 1-26, 2001.
 87. THOMPSON, E. E.; HALLER, G.; PINTO, J. M.; SUN, Y.; ZELANO, B.; JACOB, S.; MCCLINTOCK, M. K.; NICOLAE, D. L.; OBER, C. Sequence variations at the human leukocyte antigen-linked olfactory receptor cluster do not influence female preferences for male odors. *Hum Immunol*, v. 71, p. 100-3, 2010.
 88. CARVALHO SANTOS, P. S.; SEKI UEHARA, C. J.; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; BICALHO, M. D. Variation and linkage disequilibrium within odorant receptor gene clusters linked to the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol*, v., 2010.
 89. EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, v. 1, p. 47-50, 2005.
 90. TANNER, M. S.; SHARRARD, M. J.; RIGBY, A. S. Gene polymorphisms and the use of the bonferroni correction factor: when and when not to apply? *Arch Dis Child*, v. 76, p. 386, 1997.
 91. SANTOS, P. S.; FUST, G.; PROHASZKA, Z.; VOLZ, A.; HORTON, R.; MIRETTI, M.; YU, C. Y.; BECK, S.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; ZIEGLER, A. Association of smoking behavior with an odorant receptor allele telomeric to the human major histocompatibility complex. *Genet Test*, v. 12, p. 481-6, 2008.
 92. ALPER, C. A.; LARSEN, C. E.; DUBEY, D. P.; AWDEH, Z. L.; FICI, D. A.; YUNIS, E. J. The haplotype structure of the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol*, v. 67, p. 73-84, 2006.
 93. TREGOUET, D. A.; ESCOLANO, S.; TIRET, L.; MALLET, A.; GOLMARD, J. L. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet*, v. 68, p. 165-77, 2004.
 94. BÖLDT, A. B.; MESSIAS-REASON, I. J.; MEYER, D.; SCHRAGO, C. G.; LANG, F.; LELL, B.; DIETZ, K.; KREMSNER, P. G.; PETZL-ERLER, M. L.; KUN, J. F. Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. *BMC Genet*, v. 11, p. 38, 2010.
 95. EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*, v. 12, p. 921-7, 1995.
 96. YUNIS, E. J.; LARSEN, C. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; AWDEH, Z. L.; ROMERO, T.; HANSEN, J. A.; ALPER, C. A. Inheritable variable sizes of DNA

- stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens*, v. 62, p. 1-20, 2003.
97. ZIEGLER, A.; EHLERS, A.; FORBES, S.; TROWSDALE, J.; VOLZ, A.; YOUNGER, R.; BECK, S. Polymorphisms in olfactory receptor genes: a cautionary note. *Hum Immunol*, v. 61, p. 1281-4, 2000.
 98. ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*, v. 3, p. 299-309, 2002.

7 ANEXO I

Resultados de Genotipagem e haplótipos identificados através de análise de segregação.

Família	Sexo	Geração	HLA-A ALELO 1	HLA-A ALELO 2	HLA-B ALELO 1	HLA-B ALELO 2	HLA-DRB1 ALELO 1	HLA-DRB1 ALELO 2	OR2W6P ALELO 1	OR2W6P ALELO2	OR2B8P ALELO 1	OR2B8P ALELO 2	OR1F12 ALELO 1	OR1F12 ALELO 2	OR12D2 ALELO 1	OR12D2 ALELO 2	Haplótipo 1 HLA-A; B: DR; OR-2W6P; 2B8P; 1F12; 12D2	Haplótipo 2 HLA-A; B: DR; OR-2W6P; 2B8P; 1F12; 12D2
FAMILIA 003	F	P	01	03	07	44	04	11	1	3	1	1	2	1	2	3	03,07,04,03,01,01,03	01,44,11,01,01,02,02
FAMILIA 003	M	P	02	02	49	51	13	13	1	1	1	1	?	?	1	2	02,49,13,01,01,01,01	02,51,13,01,01,?,02
FAMILIA 003	M	F1	02	03	07	49	04	13	1	3	1	1	1	1	1	3	03,07,04,03,01,01,03	02,49,13,01,01,01,01
FAMILIA 004	M	P	11	24	18	51	11	11	1	1	1	1	1	1	1	1	11,51,11,01,01,01,01	24,18,11,01,01,01,01
FAMILIA 004	F	P	01	02	08	15	03	14	1	2	2	1	1	3	1	1	02,15,14,01,01,01,01	01,08,03,02,02,03,01
FAMILIA 004	M	F1	02	11	15	51	11	14	1	1	1	1	1	1	1	2	11,51,11,01,01,01,01	02,15,14,01,01,01,01
FAMILIA 005	F	P	02	69	27	44	08	11	1	1	1	2	1	1	3	1	02,27,08,01,02,01,03	69,44,11,01,01,01,01
FAMILIA 005	M	P	23	29	35	49	11	11	1	1	1	1	2	2	3	5	29,35,11,01,01,02,03	23,49,11,01,01,02,05
FAMILIA 005	M	F1	02	29	27	35	08	11	1	1	1	2	2	1	3	3	29,35,11,01,01,02,03	02,27,08,01,02,01,03
FAMILIA 006	M	P	01	66	08	35	03	14	1	2	2	1	2	3	1	2		
FAMILIA 006	F	P	02	02	15	35	11	13	1	1	2	3	1	1	1	1		
FAMILIA 006	F	F1	01	02	08	35	03	11	?	?	?	?	?	?	?	?		
FAMILIA 007	M	F1	03	33	14	35	01	14	1	1	1	5	1	1	1	1		
FAMILIA 008	F	P	01	02	08	15	03	14	1	1	1	3	2	1	6	3	01,08,03,01,03,02,03	02,15,14,01,01,01,06
FAMILIA 008	M	F1	02	30	14	15	14	15	1	1	1	1	2	1	1	6	02,15,14,01,01,01,06	30,14,15,01,01,02,01
FAMILIA 008	M	F1	01	03	08	35	03	12	1	1	1	3	2	1	1	3	01,08,03,01,03,02,03	03,35,12,01,01,02,01

FAMILIA 008	F	F1	01	30	08	14	03	15	1	1	?	?	2	2	2	3	01,08,03,01,03,02,03	30,14,15,01,01,02,01
FAMILIA 011	F	P	02	02	18	57	13	15	1	1	1	2	1	1	1	1	02,57,13,01,01,01,01	02,18,15,01,02,01,01
FAMILIA 011	M	P	23	29	13	44	04	07	1	1	1	3	1	3	2	2	29,44,04,01,03,03,02	23,13,07,01,01,01,02
FAMILIA 011	F	F1	02	29	44	57	04	13	1	1	1	3	1	?	2	2	02,57,13,01,01,01,02	29,44,04,01,03,03,02
FAMILIA 012	F	P	01	02	38	50	07	11	1	1	1	1	2	2	3	3	01,38,11,01,01,02,03	02,50,07,01,01,02,03
FAMILIA 012	F	F1	01	24	15	38	11	13	1	1	3	3	2	1	1	3		
FAMILIA 013	F	P	23	29	07	45	01	12	1	1	1	3	1	3	3	1		
FAMILIA 013	M	P	02	02	18	40	11	13	1	1	1	2	1	3	2	1		
FAMILIA 014	F	F1	01	02	40	44	07	15	1	1	1	1	1	1	2	2		
FAMILIA 016	M	P	11	23	35	44	01	15	1	1	1	2	1	1	1	1	23,44,15,01,02,01,01	11,35,01,01,01,01,01
FAMILIA 016	F	P	02	31	35	57	08	13	1	1	1	1	1	1	3	9	02,57,13,01,01,01,09	31,35,08,01,01,01,03
FAMILIA 016	F	F1	02	23	44	57	13	15	1	1	1	2	1	1	1	9	23,44,15,01,02,01,01	02,57,13,01,01,01,09
FAMILIA 017	F	P	03	11	14	52	04	15	1	1	1	2	2	1	1	1		
FAMILIA 017	P	P	02	11	44	57	13	15	1	3	1	1	2	1	1	2		
FAMILIA 017	F	F1	02	03	14	51	04	11	1	1	1	3	2	1	1	1		
FAMILIA 018	M	P	02	24	15	35	01	01	1	1	1	1	2	1	2	1		
FAMILIA 018	F	P	11	24	18	40	11	13	1	1	1	1	1	1	1	1		
FAMILIA 018	F	F1	23	68	15	50	04	13	1	1	1	2	1	1	1	5		
FAMILIA 019	M	P	02	03	40	45	01	11	1	1	1	3	1	1	2	2	03,40,11,01,01,01,02	02,45,01,01,03,01,02
FAMILIA 019	F	P	01	68	08	51	04	14	1	2	2	2	1	1	1	1	68,51,04,01,02,03,01	01,08,14,02,02,01,01
FAMILIA 019	F	F1	03	68	40	51	04	11	1	1	1	2	1	3	1	2	68,51,04,01,02,03,01	03,40,11,01,01,01,02
FAMILIA 020	F	P	11	25	35	44	11	14	1	1	1	1	1	1	1	1		
FAMILIA 020	M	P	03	68	15	51	07	13	1	1	1	2	1	1	3	2		
FAMILIA 021	F	P	11	00	49	51	04	10	1	1	1	2	1	3	1	1		
FAMILIA 021	M	P	01	11	49	67	04	15	2	1	2	2	1	1	1	1		
FAMILIA 022	M	P	23	31	07	35	14	15	1	5	1	3	2	1	3	2	31,35,14,01,01,01,03	23,07,15,05,03,02,02
FAMILIA 022	F	P	02	03	18	44	07	13	1	1	1	2	1	3	1	1	02,44,13,01,02,03,01	03,18,07,01,01,01,01
FAMILIA 022	M	F1	02	31	35	44	13	14	1	1	1	2	1	3	1	3	02,44,13,01,02,03,01	31,35,14,01,01,01,03
FAMILIA 023	F	P	01	24	14	35	11	15	1	1	1	1	2	1	3	1	24,14,15,01,01,02,01	01,35,11,01,01,01,03

FAMILIA 023	M	P	31	68	15	56	08	11	1	1	1	2	1	1	7	1	31,56,08,01,01,01,07	68,15,11,01,02,01,01
FAMILIA 023	M	F1	24	31	14	56	08	15	1	1	1	1	2	1	7	1	31,56,08,01,01,01,07	24,14,15,01,01,02,01
FAMILIA 023	F	F1	24	68	14	15	11	15	1	1	1	2	2	1	1	1	24,14,15,01,01,02,01	68,15,11,01,02,01,01
FAMILIA 025	M	P	01	68	53	55	11	13	1	1	1	2	2	1	1	1		
FAMILIA 025	F	F1	29	68	51	53	13	14	1	1	1	2	1	1	1	5		
FAMILIA 027	F	F1	03	03	07	35	07	13	1	1	1	1	1	1	2	1		
FAMILIA 028	F	P	02	11	15	35	01	14	1	1	1	2	1	3	1	6	11,35,01,01,?,01,01	02,15,14,01,?,03,06
FAMILIA 028	M	P	01	02	50	52	03	15	1	1	1	2	2	3	3	3	02,50,03,01,?,03,03	01,52,15,01,?,02,03
FAMILIA 028	F	F1	02	11	35	50	01	03	1	1	1	2	1	3	1	3	02,50,03,01,?,03,03	11,35,01,01,?,01,01
FAMILIA 029	F	F1	01	03	15	35	08	13	1	1	1	1	2	1	1	1		
FAMILIA 030	F	P	02	03	07	27	03	04	1	1	1	2	2	1	3	4		
FAMILIA 030	M	P	24	30	08	14	01	03	1	1	1	1	2	1	2	2		
FAMILIA 030	F	F1	03	30	07	08	03	04	1	1	1	2	2	1	?	?		
FAMILIA 031	M	F1	02	31	39	48	08	09	1	1	1	1	1	1	3	6		
FAMILIA 032	M	P	29	31	07	51	07	11	1	1	1	1	1	1	1	1	29,07,11,01,01,01,01	31,51,07,01,01,01,01
FAMILIA 032	F	P	02	31	15	50	07	11	1	1	1	1	2	1	1	1		
FAMILIA 032	M	F1	02	31	50	51	07	07	1	1	1	1	?	?	1	1	31,51,07,01,01,01,01	02,50,07,01,01,?,01
FAMILIA 033	M	P	02	03	35	52	03	11	1	1	1	1	1	1	2	1		
FAMILIA 033	F	P	02	24	38	51	04	13	1	3	1	1	1	1	2	1		
FAMILIA 034	F	P	24	30	35	42	01	03	1	1	1	1	2	1	1	4		
FAMILIA 034	M	P	02	02	07	73	03	04	1	1	1	1	1	2	1	3		
FAMILIA 034	M	F1	02	24	35	73	01	04	1	1	1	1	2	1	3	1		
FAMILIA 036	F	P	02	32	27	44	11	13	1	1	1	3	1	1	?	?		
FAMILIA 036	M	P	02	03	40	44	04	07	1	1	1	1	1	1	2	1		
FAMILIA 036	M	F1	02	02	44	44	07	13	1	1	1	1	1	1	?	?		
FAMILIA 037	M	P	02	29	35	51	11	11	1	1	1	2	2	1	3	3	02,35,11,01,02,01,03	29,51,11,01,01,02,03
FAMILIA 037	F	P	11	26	15	35	01	15	?	?	1	1	1	1	?	?	26,15,15,01,01,01,01	11,35,01,01,01,01,03
FAMILIA 037	F	F1	02	26	15	35	11	15	1	1	1	2	1	1	1	3	26,15,15,01,01,01,01	02,35,11,01,02,01,03
FAMILIA 037	F	F1	26	29	15	51	11	15	1	1	1	1	2	1	1	3	29,51,11,01,01,02,03	26,15,15,01,01,01,01

FAMILIA 038	F	P	01	31	14	40	04	11	1	1	1	1	1	1	3	31,40,04,01,01,01,01	01,14,11,01,01,01,03
FAMILIA 038	M	P	24	29	44	51	07	15	1	1	1	1	1	1	2	24,51,15,01,01,01,01	29,44,07,01,01,01,02
FAMILIA 038	M	F1	24	31	40	51	04	15	1	1	1	1	1	1	1	24,51,15,01,01,01,01	31,40,04,01,01,01,01
FAMILIA 040	M	P	02	31	07	35	15	15	1	1	1	1	1	1	3	31,35,15,01,01,01,01	02,07,15,01,01,01,03
FAMILIA 040	F	P	01	24	07	57	04	13	1	3	1	2	1	1	3	24,07,04,01,02,01,03	01,57,13,03,01,01,02
FAMILIA 040	M	F1	24	31	07	35	04	15	1	1	1	2	1	1	3	31,35,15,01,01,01,01	24,07,04,01,02,01,03
FAMILIA 042	F	P	02	02	15	51	13	15	1	1	1	2	1	1	3	02,15,13,01,02,01,03	02,51,15,01,01,01,01
FAMILIA 042	M	P	03	03	15	35	01	11	1	1	1	1	1	1	2	03,15,11,01,01,01,02	03,35,01,01,01,01,01
FAMILIA 042	F	F1	02	03	15	15	11	13	1	1	1	2	1	1	2	03,15,11,01,01,01,02	02,15,13,01,02,01,03
FAMILIA 043	F	F1	01	25	18	18	11	13	1	1	1	1	1	1	2		
FAMILIA 044	F	P	03	33	07	53	04	08	1	1	1	3	1	1	1		
FAMILIA 045	M	F1	01	24	52	58	04	13	?	?	?	?	?	?	?		
FAMILIA 046	M	P	01	03	08	15	03	11	1	1	1	1	1	1	1		
FAMILIA 046	F	P	02	03	35	41	14	15	4	2	4	2	5	3	1	02,41,15,04,04,05,03	03,35,14,02,02,03,01
FAMILIA 046	M	F1	02	03	07	41	15	15	1	4	1	4	5	1	2	02,41,15,04,04,05,03	03,07,15,01,01,01,02
FAMILIA 047	M	P	23	24	15	51	07	12	1	1	1	3	1	3	1		
FAMILIA 047	F	P	02	23	15	27	01	12	1	1	1	1	2	1	1	02,27,01,01,01,01,02	23,15,12,01,01,01,01
FAMILIA 047	F	F1	02	11	27	35	01	01	1	1	1	1	1	1	2	02,27,01,01,01,01,02	11,35,01,01,01,01,02
FAMILIA 049	F	P	24	29	35	44	11	14	1	1	1	2	1	3	3	29,44,11,01,02,?,03	24,35,11,01,01,?,03
FAMILIA 049	M	P	03	30	18	42	03	13	1	1	7	2	1	3	4	30,42,03,01,07,?,04	03,18,13,01,02,?,02
FAMILIA 049	F	F1	29	30	42	44	03	11	1	1	7	2	1	3	4	29,44,11,01,02,?,03	30,42,03,01,07,?,04
FAMILIA 050	F	P	02	02	35	52	04	07	1	1	1	2	2	3	2	02,52,07,01,01,02,02	02,35,04,01,02,03,01
FAMILIA 050	M	P	03	31	39	58	08	11	1	1	1	6	1	1	1	03,58,11,01,06,01,01	31,39,08,01,01,01,01
FAMILIA 050	F	F1	02	03	52	58	07	11	1	1	1	6	2	1	1	02,52,07,01,01,02,02	03,58,11,01,06,01,01
FAMILIA 051	F	P	03	23	18	35	01	03	1	1	1	1	1	1	1	23,18,03,01,01,01,01	03,35,01,01,01,01,01
FAMILIA 051	M	P	26	32	35	51	13	15	2	1	1	2	1	3	3	32,51,15,02,02,03,03	26,35,13,01,01,01,01
FAMILIA 051	M	F1	23	32	18	51	03	15	2	1	1	2	1	3	1	32,51,15,02,02,03,03	23,18,03,01,01,01,01
FAMILIA 052	M	P	02	00	27	41	01	07	1	1	1	1	1	1	1	02,41,07,01,01,01,01	02,27,01,01,01,01,01
FAMILIA 052	F	P	02	00	18	49	03	13	1	1	1	1	2	1	2	02,49,13,01,01,01,01	02,18,03,01,01,02,02

FAMILIA 052	F	F1	02	00	41	49	07	13	1	1	1	1	1	1	1	1	02,41,07,01,01,01,01	02,49,13,01,01,01,01
FAMILIA 053	F	P	02	03	07	57	07	15	1	1	1	3	1	3	1	1	02,57,07,01,01,?,01	03,07,15,01,03,?,01
FAMILIA 053	M	P	25	30	08	18	03	11	1	1	1	2	1	3	1	4	30,18,11,01,02,?,04	25,08,03,01,01,?,01
FAMILIA 053	F	F1	02	30	18	57	07	11	1	1	1	2	1	3	4	1	30,18,11,01,02,?,04	02,57,07,01,01,?,01
FAMILIA 054	M	P	02	32	40	50	13	15	1	1	1	1	1	3	3	2		
FAMILIA 054	M	F1	03	32	07	40	09	13	?	?	?	?	?	?	?	?		
FAMILIA 055	F	P	01	23	45	81	03	03	1	1	1	3	2	2	3	3	01,81,03,01,01,02,03	23,45,03,01,03,02,03
FAMILIA 055	M	P	02	02	08	27	01	03	1	1	3	3	1	3	1	2	02,08,03,01,03,03,01	02,27,01,01,03,01,02
FAMILIA 055	F	F1	01	02	08	81	03	03	1	1	1	3	2	3	3	1	02,08,03,01,03,03,01	01,81,03,01,01,02,03
FAMILIA 057	M	P	24	31	35	35	11	14	1	1	1	2	1	3	1	1	31,35,14,01,02,03,01	24,35,11,01,01,01,01
FAMILIA 057	F	P	11	23	27	51	07	13	1	1	1	1	2	1	1	5	11,51,07,01,01,01,01	23,27,13,01,01,02,05
FAMILIA 057	F	F1	11	31	35	51	07	14	1	1	1	2	1	3	1	1	11,51,07,01,01,01,01	31,35,14,01,02,03,01
FAMILIA 058	M	P	02	24	35	44	04	16	1	1	1	4	4	1	1	3		
FAMILIA 059	M	P	03	68	07	14	01	15	1	1	1	2	1	1	1	3	03,07,15,01,01,01,01	68,14,01,01,02,01,03
FAMILIA 059	F	P	23	29	14	53	07	11	1	1	1	1	2	2	1	3	29,14,07,01,01,02,01	23,53,11,01,01,02,03
FAMILIA 059	F	F1	03	29	07	14	07	15	1	1	1	1	1	2	1	1	29,14,07,01,01,02,01	03,07,15,01,01,01,01
FAMILIA 060	M	P	03	24	07	08	01	04	1	2	2	1	1	3	1	3	24,08,01,02,02,03,?	03,07,04,01,01,01,?
FAMILIA 060	F	P	02	24	15	39	01	13	1	1	2	1	1	1	3	1	02,15,13,01,02,01,?	24,39,01,01,01,01,?
FAMILIA 060	F	F1	02	24	08	15	01	13	1	2	2	2	1	3	1	3	24,08,01,02,02,03,?	02,15,13,01,02,01,?
FAMILIA 061	M	P	02	24	15	35	03	13	1	1	1	1	1	3	1	2		
FAMILIA 061	F	P	02	02	13	41	07	13	1	1	1	1	1	3	1	2		
FAMILIA 061	F	F1	02	24	35	41	03	13	1	1	1	1	1	3	1	1		
FAMILIA 062	M	P	02	30	14	42	07	08	1	1	1	2	1	1	1	3	32,27,12,01,01,01,02	
FAMILIA 062	F	P	02	30	15	51	03	07	1	1	1	1	1	1	1	2	02,51,07,01,01,01,02	30,15,03,01,01,01,01
FAMILIA 062	M	F1	02	32	27	51	07	12	1	1	1	1	1	1	2	2	02,51,07,01,01,01,02	32,27,12,01,01,01,02
FAMILIA 063	M	P	01	24	40	51	01	04	1	1	1	1	2	1	1	3	01,51,01,01,01,02,03	24,40,04,01,01,01,01
FAMILIA 063	F	P	03	24	07	18	11	15	1	1	2	4	1	4	3	2	03,07,11,01,04,04,02	24,18,15,01,02,01,03
FAMILIA 063	F	F1	01	03	07	51	01	11	1	1	1	4	2	4	2	3	01,51,01,01,01,02,03	03,07,11,01,04,04,02
FAMILIA 064	M	P	02	03	15	53	04	14	1	1	1	1	1	1	1	1	03,15,14,01,01,01,01	02,53,04,01,01,01,01

FAMILIA 064	F	P	68	68	35	39	09	12	1	1	1	1	1	1	1	68,35,09,01,01,01,01	68,39,12,01,01,01,01
FAMILIA 064	M	F1	11	26	39	55	11	11	1	1	1	1	1	1	3		
FAMILIA 064	M	F1	03	68	15	35	09	14	1	1	1	1	1	1	1	68,35,09,01,01,01,01	03,15,14,01,01,01,01
FAMILIA 065	M	P	33	68	27	51	08	08	1	1	1	1	2	1	1	33,51,08,01,01,01,01	68,27,08,01,01,02,02
FAMILIA 065	F	P	02	26	27	44	04	07	3	1	1	1	1	1	1	02,44,04,03,01,01,01	26,27,07,01,01,01,01
FAMILIA 065	F	F1	02	33	44	51	04	08	1	3	1	1	1	1	5	33,51,08,01,01,01,05	02,44,04,03,01,01,01
FAMILIA 067	M	P	01	01	08	51	01	07	2	1	1	2	1	3	1	02,07,04,01,02,01,?	
FAMILIA 067	F	P	29	00	35	35	13	13	1	1	1	4	4	2	1	29,35,13,01,04,04,?	29,35,13,01,01,02,?
FAMILIA 067	F	F1	02	29	07	35	04	13	1	1	2	4	4	1	3	29,35,13,01,04,04,?	02,07,04,01,02,01,?
FAMILIA 068	F	P	11	30	15	57	10	14	1	1	1	1	2	1	1	11,15,14,01,01,01,01	30,57,10,01,01,02,08
FAMILIA 068	M	P	24	25	15	18	12	15	1	1	1	1	1	1	1	24,15,12,01,01,01,01	25,18,15,01,01,01,01
FAMILIA 068	M	F1	11	24	15	15	12	14	1	1	1	1	1	1	1	24,15,12,01,01,01,01	11,15,14,01,01,01,01
FAMILIA 068	M	F1	25	30	18	57	10	15	1	1	1	1	2	1	?	25,18,15,01,01,01,01	30,57,10,01,01,02,08
FAMILIA 069	M	P	03	33	14	44	01	04	1	1	1	5	1	7	2	33,14,01,01,05,07,01	03,44,04,01,01,01,02
FAMILIA 069	F	P	11	31	08	15	08	11	1	1	1	1	1	6	1	11,08,11,01,01,01,01	31,15,08,01,01,06,06
FAMILIA 069	M	F1	11	33	08	14	01	11	1	1	1	5	1	7	1	11,08,11,01,01,01,01	33,14,01,01,05,07,01
FAMILIA 070	M	P	03	03	07	35	01	13	1	1	1	1	1	1	1	03,07,13,01,01,01,01	03,35,01,01,01,01,01
FAMILIA 070	F	P	02	02	07	38	01	13	1	1	1	2	1	1	2	02,07,01,01,01,01,02	02,38,13,01,02,01,03
FAMILIA 070	F	F1	02	03	07	07	01	13	1	1	1	1	1	1	2	03,07,13,01,01,01,01	02,07,01,01,01,01,02
FAMILIA 071	M	P	02	02	15	44	13	16	1	1	1	1	2	1	1	02,15,13,01,01,01,01	02,44,16,01,01,02,02
FAMILIA 071	F	P	02	24	14	52	13	14	1	1	4	4	4	4	3	02,52,14,01,04,04,03	24,14,13,01,04,04,01
FAMILIA 071	M	F1	02	02	15	52	13	14	1	1	1	4	4	1	1	02,15,13,01,01,01,01	02,52,14,01,04,04,03
FAMILIA 072	F	P	02	00	49	53	03	13	1	1	1	1	1	1	1	02,53,03,01,01,01,01	02,49,13,01,01,01,01
FAMILIA 072	M	P	01	33	42	44	03	04	1	1	1	1	2	2	1	33,42,03,01,01,02,03	01,44,04,01,01,02,01
FAMILIA 072	F	F1	02	33	42	53	03	00	1	1	1	1	2	1	3	02,53,03,01,01,01,01	33,42,03,01,01,02,03
FAMILIA 073	M	P	03	03	07	14	01	15	1	1	1	1	2	1	2	03,14,01,01,01,02,01	03,07,15,01,01,01,02
FAMILIA 073	F	P	02	32	07	51	15	15	1	1	1	3	2	1	1	02,07,15,01,01,02,01	32,51,15,01,03,01,03
FAMILIA 073	F	F1	02	03	07	14	01	15	1	1	1	1	2	2	1	02,07,15,01,01,02,01	03,14,01,01,01,02,01
FAMILIA 073	F	F1	03	32	07	51	15	15	1	1	1	3	1	1	3	32,51,15,01,03,01,03	03,07,15,01,01,01,02

FAMILIA 074	M	P	02	24	18	39	04	08	?	?	2	2	3	3	1	2	02,18,08,01,02,03,02	24,39,04,01,02,03,01
FAMILIA 074	F	P	24	25	40	52	14	14	1	1	1	1	1	1	1	1	25,52,15,01,01,01,01	24,40,14,01,01,01,01
FAMILIA 074	F	F1	02	25	18	52	08	15	1	1	1	2	1	3	1	2	25,52,15,01,01,01,01	02,18,08,01,02,03,02
FAMILIA 074	M	F1	24	24	39	40	04	14	1	1	1	2	1	3	3	3	24,39,04,01,02,03,01	24,40,14,01,01,01,02
FAMILIA 077	F	P	02	02	15	15	04	13	1	3	1	3	1	3	2	2	02,15,04,03,01,01,02	02,15,13,01,03,03,02
FAMILIA 077	M	P	02	25	40	40	04	16	1	1	1	1	2	1	1	2	02,40,04,01,01,01,01	25,40,16,01,01,02,02
FAMILIA 077	F	F1	02	25	15	40	13	16	1	1	1	3	2	3	2	2	02,15,13,01,03,03,02	25,40,16,01,01,02,02
FAMILIA 077	F	F1	02	02	15	40	04	04	1	3	1	1	1	1	1	2	02,15,04,03,01,01,02	02,40,04,01,01,01,01
FAMILIA 078	F	F1	02	31	07	35	15	16	1	1	1	4	4	1	3	1		
FAMILIA 079	F	F1	01	31	15	39	08	13	1	1	1	4	4	2	1	3		
FAMILIA 080	M	P	03	33	07	57	07	13	1	1	1	3	2	1	1	1		
FAMILIA 080	F	F1	33	68	35	57	08	13	1	1	1	1	2	1	1	6		
FAMILIA 082	F	P	02	66	15	41	04	04	1	1	1	1	2	1	2	1		
FAMILIA 082	F	F1	02	66	41	51	04	04	1	1	1	4	2	4	1	1		
FAMILIA 083	F	F1	02	24	35	44	07	11	1	1	1	1	1	1	1	1	24,35,07,01,01,01,01	02,44,11,01,01,01,01
FAMILIA 084	M	P	03	23	27	51	04	09	1	3	1	1	1	2	1	3	23,27,04,01,01,02,01	03,51,09,03,01,01,03
FAMILIA 084	F	P	11	31	35	39	01	08	1	1	1	1	1	1	3	1	11,35,01,01,01,01,03	31,39,08,01,01,01,01
FAMILIA 084	M	F1	11	23	27	35	01	04	1	1	1	1	1	2	1	3	23,27,04,01,01,02,01	11,35,01,01,01,01,03
FAMILIA 085	M	P	01	23	38	50	03	04	1	1	1	1	1	1	3	1	01,38,03,01,01,01,?	23,50,04,01,01,01,?
FAMILIA 085	F	P	01	68	15	58	04	13	1	1	1	1	1	1	2	1	01,58,13,01,01,01,?	68,15,04,01,01,01,?
FAMILIA 085	M	F1	01	01	38	58	03	13	?	?	1	1	1	1	?	?	01,58,13,01,01,01,?	01,38,03,01,01,01,?
FAMILIA 086	M	P	03	11	07	39	11	15	1	1	1	1	1	1	3	2	03,07,15,01,01,01,02	11,39,11,01,01,01,03
FAMILIA 086	F	P	03	31	07	55	04	15	1	1	1	1	1	2	2	5	03,07,15,01,01,01,02	31,55,15,01,01,02,05
FAMILIA 086	M	F1	03	03	07	07	15	15	1	1	1	1	1	1	2	2	03,07,15,01,01,01,02	03,07,15,01,01,01,02
FAMILIA 087	F	P	01	02	08	45	03	15	1	1	2	5	1	4	2	1	02,45,15,01,02,01,01	01,08,03,01,05,04,02
FAMILIA 087	M	P	02	02	14	50	04	10	1	1	1	2	1	2	1	1	02,50,04,01,02,01,01	02,14,10,01,01,02,01
FAMILIA 087	F	F1	02	02	45	50	04	15	1	1	3	2	1	1	1	1	02,45,15,01,02,01,01	02,50,04,01,03,01,01
FAMILIA 088	F	P	02	24	50	52	07	08	1	1	3	4	4	3	1	1	24,52,08,01,04,04,01	02,50,07,01,03,03,01
FAMILIA 088	M	P	02	24	07	35	08	14	2	1	2	2	1	3	1	3	02,07,08,01,02,01,03	24,35,14,02,02,03,01

FAMILIA 088	M	F1	24	24	35	52	08	14	2	1	2	4	4	3	1	1	24,52,08,01,04,04,01	24,35,14,02,02,03,01
FAMILIA 088	M	F1	02	31	15	50	07	08	1	1	3	2	3	3	1	2	02,50,07,01,03,03,01	31,15,08,01,02,03,02
FAMILIA 088	M	F1	02	24	07	52	08	08	1	1	4	2	4	1	3	3	02,07,08,01,02,01,03	24,52,08,01,04,04,01
FAMILIA 089	F	P	01	33	08	35	07	10	1	1	1	2	2	3	1	1	33,35,10,01,01,02,01	01,08,07,01,02,03,01
FAMILIA 089	M	P	02	11	35	47	01	13	1	1	1	1	1	1	2	1	02,35,01,01,01,01,02	11,47,13,01,01,01,01
FAMILIA 089	F	F1	02	33	35	35	01	10	1	1	1	1	2	1	1	2	33,35,10,01,01,02,01	02,35,01,01,01,01,02
FAMILIA 090	M	P	24	24	18	27	03	13	1	1	1	3	1	1	1	1	24,18,03,01,03,01,01	24,27,13,01,01,01,01
FAMILIA 090	F	P	11	23	18	49	03	11	1	1	1	1	2	1	5	1	23,49,11,01,01,02,05	11,18,03,01,01,01,01
FAMILIA 090	M	F1	23	24	18	49	03	11	1	1	1	3	2	1	1	5	24,18,03,01,03,01,01	23,49,11,01,01,02,05
FAMILIA 091	M	P	24	24	39	52	04	15	1	1	1	1	1	1	?	?		
FAMILIA 091	F	P	02	03	35	50	01	07	1	1	1	1	1	2	?	?		
FAMILIA 091	F	F1	02	24	50	52	07	15	1	1	1	1	2	1	?	?		