

JULIANO AUGUSTO SCHINEMANN

**A INFLUÊNCIA DOS GENES HLA-A E HLA-B NA ESCOLHA POR  
FRAGRÂNCIAS**

CURITIBA  
2005

**JULIANO AUGUSTO SCHINEMANN**

**A INFLUÊNCIA DOS GENES HLA-A E HLA-B NA ESCOLHA POR  
FRAGRÂNCIAS**

Monografia apresentada para a obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná – UFPR.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

**CURITIBA  
2005**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE GRÁFICOS .....	IV
RESUMO.....	VI
1. REVISÃO DO ESTADO DE ARTE.....	7
1.1 INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	10
3.2 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE TIPAGEM MOLECULAR HLA-A, -B, -DR.....	11
3.2.1 <i>Extração do DNA Genômico</i> .....	11
3.2.2 <i>A Tipagem Molecular Propriamente Dita</i> .....	11
3.2.3 <i>Controle da Amplificação</i> .....	12
3.3 TESTES OLFATIVOS.....	13
3.4 TRATAMENTO DOS DADOS.....	14
4. RESULTADOS.....	14
4.1. TIPAGENS HLA-A E HLA-B DOS INDIVÍDUOS DA AMOSTRA .....	14
4.2. ESCOLHAS REALIZADAS PELOS INDIVÍDUOS .....	17
4.3. FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA.....	18
4.4. RESULTADOS DO TESTE OLFATIVO .....	19
4.4.1. <i>FREQUÊNCIAS DE AGRADO E DESAGRADO DE CADA FRAGRÂNCIA</i> .....	19
4.4.2. <i>NÚMERO DE OCORRÊNCIAS DOS ALELOS HLA-A E HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE AVALIARAM AS DIFERENTES FRAGRÂNCIAS TESTADAS.</i>	20
4.4.3. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	35
5. DISCUSSÃO .....	41
6. CONCLUSÃO .....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
8. ANEXOS .....	44
ANEXO I - MATERIAL DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO DISTRIBUÍDO NAS CAMPANHAS DE DOAÇÃO DO LIGH/HEMEPAR PARA RECRUTAR PARTICIPANTES PARA A AMOSTRA.....	44
ANEXO II – FORMULÁRIO UTILIZADO PARA O TESTE OLFATIVO .....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: GRUPOS CREGs PROPOSTOS POR RODEY E FULLER .....	8
TABELA 2: FAMÍLIA OLFATIVA E NOTA OLFATIVA ESCOLHIDA.....	13
TABELA 3: DADOS DAS TIPAGENS HLA-A E HLA-B DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DO EXPERIMENTO. (N = 88 / 48 ♀ E 40 ♂). .....	16
TABELA 4: TABELA DAS FRAGRÂNCIAS DE AGRADO(+) E DESAGRADO (-) ESCOLHIDAS PELOS INDIVÍDUOS DA AMOSTRA .....	17
TABELA 5: FREQUÊNCIA DAS ESCOLHAS (AGRADO E DESAGRADO) PARA CADA FRAGRÂNCIA DO TESTE OLFATIVO. (N = 176).....	19
TABELA 6: TABELA DO NÚMERO DE ESCOLHA POSITIVA E NEGATIVA PARA CADA FRAGRÂNCIA, CONSIDERANDO-SE OS ALELOS HLA-A AGRUPADOS EM CREGs.....	35
TABELA 7: TABELA DE QUI-QUADRADO PARA TESTAR A HIPÓTESE DE INDEPENDÊNCIA ENTRE O <u>AGRADO</u> POR DETERMINADA FRAGRÂNCIA E OS GRUPOS CREG. ....	36
TABELA 8: TABELA DE QUI-QUADRADO PARA TESTAR A HIPÓTESE DE INDEPENDÊNCIA ENTRE O <u>DESAGRADO</u> POR DETERMINADA FRAGRÂNCIA E OS GRUPOS CREG. ....	37
TABELA 9: TABELA DO NÚMERO DE ESCOLHA POSITIVA E NEGATIVA PARA CADA FRAGRÂNCIA, CONSIDERANDO-SE OS ALELOS HLA-B AGRUPADOS EM CREGs.....	38
TABELA 10: TABELA DE QUI-QUADRADO PARA TESTAR A HIPÓTESE DE INDEPENDÊNCIA ENTRE O <u>AGRADO</u> POR DETERMINADA FRAGRÂNCIA E OS GRUPOS CREG. ....	39
TABELA 11: TABELA DE QUI-QUADRADO PARA TESTAR A HIPÓTESE DE INDEPENDÊNCIA ENTRE O <u>DESAGRADO</u> POR DETERMINADA FRAGRÂNCIA E OS GRUPOS CREG. ....	40

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO I: NÚMERO DE OCORRÊNCIAS DOS ALELOS HLA-A NOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES NA AMOSTRA. (N=148).....	18
GRÁFICO II: NÚMERO DE OCORRÊNCIAS DOS ALELOS HLA-B NOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES NA AMOSTRA. (N=171).....	18
GRÁFICO III: FREQUÊNCIA DE AGRADO PARA CADA FRAGRÂNCIA DO TESTE OLFATIVO. (N=88).....	19
GRÁFICO IV: FREQUÊNCIA DE DESAGRADO PARA CADA FRAGRÂNCIA DO TESTE OLFATIVO. (N = 88). .....	20
GRÁFICO V: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE BAUNILHA. (N=58) .....	21
GRÁFICO VI: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE BAUNILHA. (N=61) .....	22
GRÁFICO VII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE LIMÃO. (N=25) .....	23
GRÁFICO VIII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE LIMÃO. (N=28) .....	24
GRÁFICO IX: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE ALMÍSCAR. (N=63) .....	25
GRÁFICO X: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE ALMÍSCAR. (N=64) .....	26
GRÁFICO XI: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE LAVANDA. (N=30) .....	27
GRÁFICO XII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE LAVANDA. (N=30) .....	28
GRÁFICO XIII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE SÂNDALO. (N=38) .....	29
GRÁFICO XIV: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE SÂNDALO. (N=39) .....	30
GRÁFICO XV: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE CRAVO. (N=51).....	31

GRÁFICO XVI: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE CRAVO. (N=50)..... 32

GRÁFICO XVII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-A CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE JASMIM. (N=65) ..... 33

GRÁFICO XVIII: GRÁFICO QUE MOSTRA O NÚMERO DE OCORRÊNCIA DOS ALELOS DO GENE HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE DEMONSTRARAM AGRADO E DESAGRADO PELA FRAGRÂNCIA DE JASMIM. (N=70) ..... 34

## RESUMO

Estudos realizados em animais e humanos ressaltam a importância dos genes do MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) na expressão do odor corporal e na escolha preferencial de parceiros. Esse odor corporal manifestar-se-ia através das proteínas (transcritas pelos genes do MHC) eliminadas no suor e/ou outros líquidos corporais, conferindo ao indivíduo um "odortipo". Evidências experimentais sugerem que indivíduos com tipos MHC diferentes estariam preferencialmente se escolhendo como parceiros. Na espécie humana, as preferências femininas pelos indivíduos do sexo masculino seria para os que teriam um tipo HLA diferente do delas, mas semelhante ao tipo HLA dos pais delas. Tais estudos incitaram algumas questões: O sistema HLA influenciaria as preferências olfativas, como por exemplo, a escolha do perfume predileto, que é uma escolha tão particular e personalizada? Essas escolhas seriam iguais se as fragrâncias fossem apresentadas num frasco e depois aplicadas à pele dos indivíduos? As mulheres realmente estariam preferindo os homens da amostra que tivessem o HLA semelhante ao dos pais delas? No presente trabalho foi investigada a influência dos genes HLA-A e HLA-B na escolha por diferentes fragrâncias. Para isso, testes olfativos foram realizados com 88 indivíduos, 48 do sexo feminino e 40 do sexo masculino, cadastrados no bando de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO) e tipados para os genes HLA-A e HLA-B (pelo método PCR-SSP). Durante o teste esses indivíduos deveriam eleger dentre 7 (sete) fragrâncias distintas, não identificadas, a que mais e a que menos lhes agradava. As fragrâncias utilizadas no teste foram de Baunilha, Limão, Almíscar, Lavanda, Sândalo, Cravo e Jasmim, cada uma pertencente a uma família olfativa diferente. Os dados obtidos no teste foram colocados em uma planilha do Microsoft Excel na qual foi aplicado o recurso de auto-filtro para auxiliar a localização e agrupamento dos dados que se pretendia analisar. Como os dados obtidos estavam muito "pulverizados" houve a necessidade de reunir os dados dos alelos de cada locus em grupos de reação cruzada (CREGs) para aplicar o teste de qui-quadrado testando a hipótese de independência entre as escolhas realizadas e os CREGs dos loci HLA-A e HLA-B. Não foi encontrado valor significativo de qui-quadrado, concluindo-se que a hipótese de independência entre os CREGs e as escolhas pelas diferentes fragrâncias deve ser aceita. Concluiu-se, também, que o método utilizado para o agrupamento dos dados foi bastante eficiente para tornar mais ágil a localização das informações e dados de interesse para realização da análise estatística.

## 1. REVISÃO DO ESTADO DE ARTE

### 1.1 INTRODUÇÃO

A descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) se deu através de investigações sobre a base genética do fenômeno da rejeição.

Na espécie humana o MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6 e foi denominado HLA (Human Leucocyte Antigen). Essa região do genoma classifica-se em regiões de Classes I, II e III, de acordo com a estrutura e função dos produtos codificados por esses genes.

Trata-se de um conjunto de genes que à semelhança de seus homólogos em outras espécies, codificam para proteínas polimórficas de superfície celular, que participam da resposta imune adaptativa e da resposta imune inata. A região do genoma onde está situado o MHC também inclui genes não envolvidos com funções imunes e muitos outros com funções ainda não conhecidas (Wedekind et al., 2000).

As proteínas HLA são moléculas complexas constituídas por seqüências de aminoácidos definidos como aloepítomos, pelo fato de serem alvos potencial de reconhecimento pelas moléculas de anticorpos.

Estes aloepítomos podem ser públicos ou privados. Estes últimos são resíduos de aminoácidos que estão presentes exclusivamente em uma única molécula HLA.

Os epítomos públicos são seqüências de aminoácidos compartilhadas por diferentes moléculas HLA e fundamentam o agrupamento dessas moléculas em grupos de reação cruzadas ou CREGs (do inglês, *Cross Reactive Groups*). (TABELA 1)

**Tabela 1: GRUPOS CREGs PROPOSTOS POR RODEY E FULLER**

<b>CREG</b>	<b>ANTÍGENOS</b>
<b>Bw4</b>	A*09, A*23, A*24, A*25, A*32, B*05, B*13, B*17, B*27, B*37, B*38, B*44, B*47, B*49, B*51, B*52, B*53, B*57, B*58, B*59, B*63, B*77
<b>Bw6</b>	B*07, B*08, B*14, B*18, B*22, B*35, B*39, B*40, B*41, B*42, B*45, B*46, B*48, B*50, B*54, B*55, B*56, B*60, B*61, B*62, B*64, B*65, B*67, B*70, B*71, B*72, B*73, B*75, B*76, B*78, B*8101
<b>A01C</b>	A*01, A*36, A*03, A*11, A*29, A*30, A*31, A*8001
<b>A10C</b>	A*10, A*25, A*26, A*34, A*66, A*32, A*33, A*43, A*19, A*74
<b>A02C</b>	A*02, A*28, A*68, A*69, A*09, A*23, A*24, B*17, B*57, B*58
<b>B05C</b>	B*05, B*51, B*52, B*35, B*53, B*18
<b>B07C</b>	B*07, B*08, B*42, B*22, B*54, B*55, B*56, B*27, B*13, B*40, B*60, B*61, B*41, B*47, B*48, B*8101
<b>B08C</b>	B*08, B*14, B*64, B*65, B*16, B*38, B*39, B*18
<b>B12C</b>	B*12, B*44, B*45, B*21, B*49, B*50, B*13, B*40, B*60, B*61, B*37, B*41, B*47
<b>B21C</b>	B*05, B*51, B*52, B*21, B*49, B*50, B*35, B*53, B*15, B*62, B*63, B*70, B*71, B*72, B*73, B*75, B*76, B*77, B*7801, B*17, B*57, B*58

Existem evidências de que alguns genes do MHC influenciam na escolha preferencial por parceiros (seleção sexual) e também na expressão de odores corporais particulares. Embora existam algumas hipóteses explicativas de como este odor corporal particular seria determinado, tais como a “Hipótese da Molécula MHC”, “Hipótese do Peptídeo”, “Hipótese da Microflora”, “Hipótese do Carreador” e a “Hipótese do Peptídeo-Microflora”, nada ainda foi comprovado. Através de experimentos realizados com camundongos observou-se que as fêmeas eram capazes de distinguir as especificidades codificadas pelos genes MHC de outros camundongos através do odor presente em fluidos e secreções (odor-tipo MHC), tais como a urina. Através deste comportamento, as fêmeas de camundongos preferiam se acasalar com machos que tivessem as especificidades MHC diferentes das delas. Em outro estudo observou-se que essa escolha por especificidades MHC diferentes resultava na escolha de especificidades MHC semelhante às especificidades MHC parentais. Tal estratégia é interpretada pelos geneticistas como uma maneira de garantir uma

progênie heterozigota. A heterozigosidade para os genes relacionados à resposta imune determinaria descendentes mais resistentes a patógenos, e conseqüentemente mais adaptados, o que resultaria na manutenção da espécie (Wedekind et al.,2000).

É difícil e um pouco arriscado fazer um paralelo entre animais vertebrados e o ser humano, pois, a estrutura responsável pela olfação no homem é vestigial enquanto que em animais vertebrados é bem desenvolvida, ou seja, a detecção do olfato no homem é insignificante quando comparada a de um camundongo (Yamazaki et al.,1985).

Estudos realizados na espécie humana são sugestivos, apontando que os genes HLA também influenciariam na escolha por parceiros sexuais visando a manutenção da heterozigosidade dos descendentes. Em alguns desses estudos, os parceiros estariam preferencialmente selecionando, através do olfato, indivíduos HLA diferentes (Wedekind et al., 1997).

Os trabalhos, "Sex differences in response to physical and social factors involved in human mate selection: The Importance Of Smell For Women" (Herz et al.,2002) e "Paternaly inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor" (Jacob et al., 2002), ressaltam o fato de que as mulheres estariam sendo as principais responsáveis pela escolha dos parceiros que lhes assegurassem uma prole heterozigota porque seriam elas que biologicamente investiriam mais na gestação e na criação da prole, e portanto, estariam diminuindo o risco de um fracasso através desta escolha.

Muitos trabalhos relatam a influência dos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade no odor do corpo e na escolha preferencial de parceiros. Mas nenhum deles é tão completo como os trabalhos "How Do Major Histocompatibility Complex Genes Influence Odor and Mating Preferences?"(Penn et al., 1998) e "The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes" (Penn et al., 1999). Estes trabalhos são excelentes, com idéias sólidas e muito completos.

No trabalho realizado no LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade) da Universidade Federal do Paraná, publicado em abril do corrente ano no volume 47(4) da revista Hormones & Behavior, com o título: "New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students" (Santos et al., 2005), também foi

observado uma preferência feminina pelo odor do suor masculino que compartilhasse menor número de alelos HLA entre os indivíduos da amostra. O que nos fez ampliar a investigação das escolhas preferenciais por odores determinadas pelos genes HLA através do presente estudo, que investigou a preferência por diferentes fragrâncias.

Trabalhos que tentam realizar a correlação entre fragrâncias e o HLA são desconhecidos com exceção do trabalho “Evidence for MHC-Related Perfume Preferences in Humans” (Wedekind et al., 2001), que se mostrou muito confuso devido ao método de análise utilizado.

Tais idéias precursoras influenciaram na escolha do tema principal do presente trabalho: “Genes HLA influenciariam também na escolha de outros odores que não sejam o do corpo?”, além de provocar outras intrigantes questões.

## **2. OBJETIVOS**

Investigar a influência dos genes HLA-A e HLA-B na escolha preferencial de diferentes fragrâncias.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

A amostra é constituída por 88 indivíduos, sendo 48 do sexo feminino e 40 do sexo masculino, todos doadores voluntários de medula óssea (DVMO) cadastrados no Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea – REDOME – que se dispuseram também a participar do projeto em questão.

Estes indivíduos foram informados sobre o projeto através de um material de divulgação (Anexo I) distribuído nos locais onde eram realizadas as

campanhas para doação de sangue e medula óssea realizadas pela parceria LIGH / HEMEPAR (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná).

As amostras de sangue dos doadores voluntários foram encaminhadas para o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR, onde se realizaram as tipagens HLA de classe I e II, exames que fazem parte da rotina do laboratório.

### 3.2 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE TIPAGEM MOLECULAR HLA-A, -B, -DR

#### 3.2.1 Extração do DNA Genômico

Para realizar a tipagem molecular, inicialmente é preciso isolar os linfócitos das amostras de sangue, de onde será extraído o DNA. Nesse estudo foi utilizado o Buffy Coat (camada de leucócitos), que é obtido através da centrifugação da amostra a 2000 RPM (rotações por minuto) durante 20 minutos. O DNA foi extraído pela técnica de Salting Out. Este DNA concentrado é homogeneizado e centrifugado 1 minuto a 3000 RPM, e depois colocado em tubos eppendorf com diluição de 1:100 em água mili-Q estéril. Após essa diluição ele é homogeneizado e centrifugado novamente, desta vez por 1 minuto a 4000 RPM. Ao final dessas etapas o DNA está pronto para a leitura da densidade óptica (DO), que fornecerá a pureza e a concentração.

#### 3.2.2 A Tipagem Molecular Propriamente Dita

O método PCR-SSP segue o princípio de que oligonucleotídeos iniciadores complementares são mais eficientemente utilizados em amplificar uma seqüência alvo do que os não complementares pela Taq polimerase recombinante. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores são delineados para associar-se a um único alelo ou a um grupo de alelos.

Após a extração do DNA as etapas subseqüentes consistem basicamente de adição de reagentes que irão caracterizar e amplificar os alelos HLA do doador (kits de tipagem SSP-ABDRX - One Lambda).

Através das medidas de DO (densidade óptica) obtidas, a solução de DNA é preparada para ser usada com o kit na concentração e volume adequados. O kit e a Taq-polimerase (enzima extraída de bactérias que suporta altas temperaturas) são retirados do freezer e serão usados quando atingirem a temperatura ambiente. É acrescentado 1 $\mu$ l do diluente do DNA, no caso a água, na posição H1 da placa para controle negativo. Acrescenta-se 5,6 $\mu$ l da Taq-polimerase no tubo D-mix, que contém os oligonucleotídeos, o qual é homogeneizado. Dessa mistura é retirado 9 $\mu$ l e colocado no controle negativo. São acrescentados 111 $\mu$ l da solução de DNA no tubo de D-mix e novamente homogeneizado. Em cada tubo de reação do kit são colocados 10 $\mu$ l dessa mistura final, exceto no controle negativo.

Depois de certificados que os tubos estão com as tampas adequadas e bem vedados para evitar evaporação, o kit de reação é levado para o Termociclador GeneAmp 9700, com o programa de amplificação para esse kit previamente estabelecido. Este processo leva cerca de 1 hora e 30 minutos.

### 3.2.3 Controle da Amplificação

Depois de amplificado, é realizada uma eletroforese para visualização dos alelos que foram amplificados, ou seja, que estão presentes no doador. O gel utilizado é o de agarose a 2,5%. Cobrindo esse gel, é colocado o tampão TBE 1x com brometo de etídeo. As amostras amplificadas são colocadas no mesmo com pipeta de ponteira multicanal. A eletroforese é procedida entre 140 e 150V de 3 a 5 minutos. Posterior à esse processo, o gel é colocado no transiluminador na própria cuba e fotografado, usando abertura 16 por 1 segundo. Com a foto em mãos, é possível visualizar as bandas amplificadas e atribuir o tipo HLA do indivíduo que está sendo tipado.

Essa técnica descrita é a utilizada na rotina do LIGH e também é recomendada pelo fornecedor dos kits.

### 3.3 TESTES OLFATIVOS

Os testes olfativos foram realizados individualmente, respeitando-se as normas técnicas exigidas para esse tipo de realização.

Num estudo prévio a respeito das melhores fragrâncias a serem utilizadas no teste, foram analisadas e escolhidas diferentes famílias de notas olfativas, com preferência para notas bem distintas o que permitiria uma análise mais informativa dos dados e melhor clareza dos resultados. As notas escolhidas para a realização do teste olfativo são as citadas na tabela abaixo.

**Tabela 2:** Família olfativa e nota olfativa escolhida

<b>FAMÍLIA OLFATIVA</b>	<b>NOTA OLFATIVA</b>
CITRUS	Limão
HERBAL	Lavanda
FLORAL	Jasmim
WOOD	Sândalo
MUSK	Almíscar
SPICE	Cravo
SWEET	Baunilha

Cada indivíduo da amostra realizou o teste individualmente e as fragrâncias foram oferecidas uma de cada vez com a utilização de um neutralizador de odor (grãos de café) após experimentarem cada uma delas.

Os participantes não visualizaram a cor e nem o nome da fragrância para que não ocorresse nenhum tipo de influência visual nas escolhas por eles exercidas.

As perguntas realizadas durante teste olfativo foram: "Qual destes perfumes mais lhe agrada?" e "Qual destes perfumes menos lhe agrada?". Caso restasse uma dúvida entre algumas fragrâncias o indivíduo poderia realizar um novo teste com as fragrâncias que selecionasse.

As respostas para as escolhas eram assinaladas pelos participantes do teste em formulários (Anexo II) elaborados com a idéia de omitir a classificação dos frascos que continham as essências.

### 3.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados obtidos com o teste foram tabulados em planilha do software Microsoft Excel juntamente com os resultados das tipagens para cada indivíduo. Montou-se uma planilha "mãe" com os dados de todos os indivíduos e nesta planilha foi aplicada o recurso de auto-filtro, que consiste numa prévia análise pelo programa de todos os dados colocados em uma linha ou coluna e criação de classes para esses dados, e uma posterior possibilidade de exibição de apenas uma classe escolhida, ou uma combinação mais de uma classe.

Com este recurso puderam-se localizar mais facilmente os dados pretendidos, que foram recortados e colados em outras planilhas para serem analisados separadamente.

As planilhas menores, formadas a partir da planilha "mãe", serviram para a confecção dos gráficos que mostram o número de indivíduos que manifestaram agrado ou desagrado por uma determinada fragrância, levando-se em consideração os diferentes grupos alélicos dos genes HLA-A e HLA-B.

Através da metodologia aplicada no tratamento dos dados, visualizou-se uma possível associação das escolhas pelas fragrâncias com os grupos de reação cruzada (CREGs).

Inicialmente, investigar-se-ia a influência dos genes HLA-A e HLA-B na escolha pelas diferentes fragrâncias através dos diferentes grupos alélicos dos genes, porém, desta maneira a análise estatística não traria resultados de peso estatístico, devido a grande pulverização dos dados agrupados.

Optou-se, então, por reunir esses dados levando-se em consideração os CREGs para investigar a influência nas escolhas realizadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TIPAGENS HLA-A E HLA-B DOS INDIVÍDUOS DA AMOSTRA

Os indivíduos participantes da amostra tiveram seu sangue tipado para o cadastro no banco de doadores voluntários de medula óssea, o REDOME. A

partir desse banco de dados foram extraídas as especificidades HLA-A e HLA-B desses indivíduos para a análise dos dados do teste olfativo. (TABELA 3)

**Tabela 3:** Dados das tipagens HLA-A e HLA-B da amostra de indivíduos participantes do experimento. (N = 88 / 48 ♀ e 40 ♂).

N° LIGH	HLA - A		HLA - B		N° LIGH	HLA - A		HLA - B	
5841	01	02	07	58	15126	03	11	56	00
6609	03	11	35	00	15127	02	11	51	56
6610	01	02	08	15	15129	01	68	35	55
6616	02	31	14	40	15131	01	33	08	14
6627	01	00	08	57	15135	24	74	07	37
6658	02	25	14	18	15146	24	29	38	44
7229	02	23	15	50	15148	02	34	08	37
7231	29	68	44	51	15149	02	02	27	41
7279	02	03	27	38	15152	32	68	40	56
7283	02	00	27	51	15154	02	29	38	44
7295	03	23	07	08	15156	23	26	07	49
7591	02	25	18	56	15158	01	02	51	81
9367	23	32	27	35	15159	24	31	35	38
9373	02	03	07	51	15160	23	26	40	50
9385	11	24	07	51	15161	02	02	07	15
9394	30	31	35	39	15162	03	68	35	40
14506	25	31	14	39	15163	02	02	15	40
14510	02	03	14	40	15167	26	33	15	56
14513	03	33	14	51	15172	02	32	44	53
14514	24	29	44	50	15173	24	30	18	49
14515	32	66	14	39	15176	11	26	08	35
14516	01	24	15	57	15178	23	24	53	55
14519	11	26	07	18	15179	68	68	39	40
14520	24	68	15	15	15181	03	32	07	15
14521	02	03	14	35	15182	24	24	07	40
14522	23	26	18	35	15184	01	29	42	44
14524	02	02	15	35	15192	01	02	07	35
14527	31	32	27	39	15198	24	24	27	52
14529	31	68	35	40	15202	02	02	27	39
14530	02	30	41	58	15212	01	03	55	57
14531	03	68	27	47	15213	03	23	07	35
14532	02	29	15	27	15221	31	69	35	56
14533	01	11	08	55	15222	11	66	35	58
14534	02	03	14	14	15227	01	03	35	41
14535	01	03	08	27	15229	02	24	18	56
14536	01	25	08	18	15231	02	29	40	44
14784	01	02	08	35	15233	11	36	35	55
15109	01	03	18	35	15239	24	26	35	40
15110	02	24	35	35	15240	02	74	27	42
15111	11	26	38	56	15241	02	30	13	40
15112	01	02	08	15	15242	01	29	51	57
15113	01	11	08	57	15246	03	24	07	15
15115	24	33	40	44	15255	03	26	07	35
15123	01	29	08	44	15256	24	24	35	52

#### 4.2. ESCOLHAS REALIZADAS PELOS INDIVÍDUOS

Foi montada uma tabela com as escolhas realizadas pelos indivíduos, onde se colocou o código da fragrância de seu agrado e o código da fragrância do seu desagradado. (TABELA 4)

**Tabela 4:** Tabela das fragrâncias de agrado(+) e desagradado (-) escolhidas pelos indivíduos da amostra

N° LIGH	+	-	N° LIGH	+	-	N° LIGH	+	-	N° LIGH	+	-
5841	1	6	14519	1	7	15126	3	5	15179	2	7
6609	4	6	14520	1	6	15127	4	1	15181	2	3
6610	3	5	14521	4	7	15129	6	3	15182	1	7
6616	7	5	14522	3	7	15131	1	5	15184	5	6
6627	5	4	14524	1	3	15135	1	7	15192	5	1
6658	7	6	14527	4	3	15146	3	1	15198	4	1
7229	3	5	14529	4	7	15148	3	6	15202	2	7
7231	7	1	14530	1	7	15149	5	7	15212	4	7
7279	1	7	14531	1	6	15152	1	7	15213	3	6
7283	3	7	14532	1	3	15154	4	5	15221	3	1
7295	3	5	14533	1	4	15156	3	5	15222	3	7
7591	2	5	14534	3	7	15158	4	7	15227	6	7
9367	3	6	14535	5	6	15159	3	1	15229	3	6
9373	3	7	14536	3	4	15160	4	7	15231	7	5
9385	1	7	14784	1	7	15161	2	1	15233	3	2
9394	7	3	15109	3	7	15162	1	6	15239	2	5
14506	2	6	15110	4	7	15163	3	7	15240	1	7
14510	4	6	15111	3	6	15167	3	6	15241	5	6
14513	4	5	15112	2	1	15172	1	6	15242	6	7
14514	3	6	15113	3	6	15173	7	5	15246	1	2
14515	2	5	15115	2	6	15176	3	6	15255	1	3
14516	2	1	15123	2	7	15178	1	7	15256	7	6

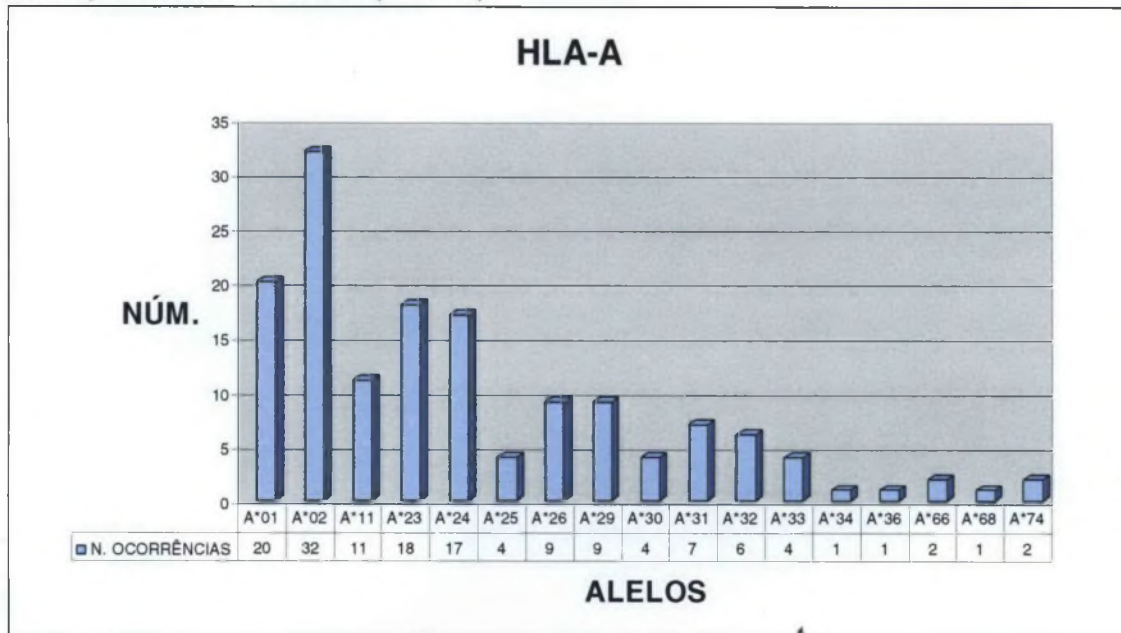
#### LEGENDA

1 = BAUNILHA	5 = SÂNDALO
2 = LIMÃO	6 = CRAVO
3 = ALMÍSCAR	7 = JASMIM
4 = LAVANDA	

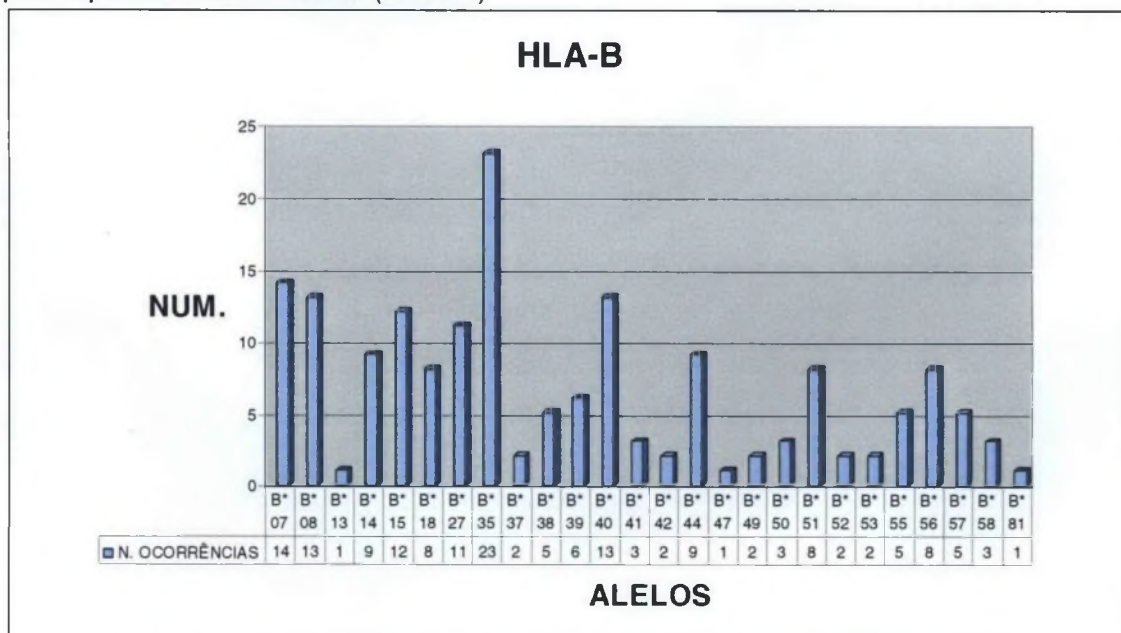
### 4.3. FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA

A partir dos dados das tipagens foi possível construir uma gráfico ilustrativo do número de ocorrências dos diferentes alelos HLA-A e HLA-B entre os participantes da amostra. (GRÁFICOS I e II)

**GRÁFICO I:** Número de ocorrências dos alelos HLA-A nos indivíduos participantes na amostra. (N=148)



**GRÁFICO II:** Número de ocorrências dos alelos HLA-B nos indivíduos participantes na amostra. (N=171)



#### 4.4. RESULTADOS DO TESTE OLFATIVO

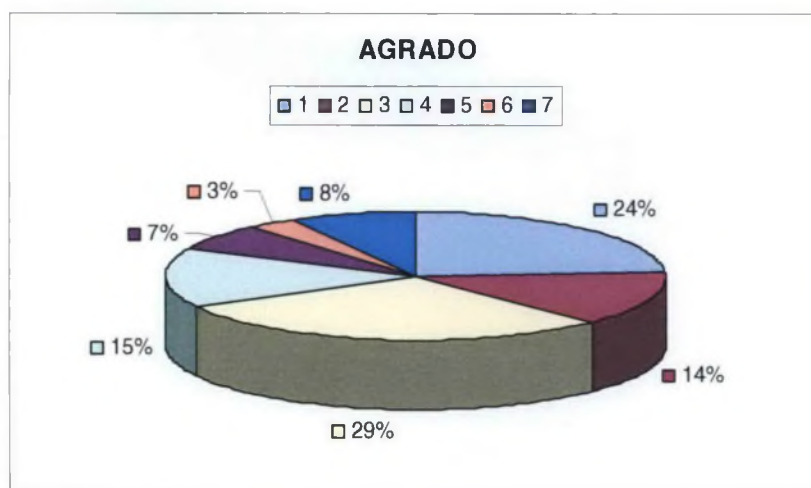
##### 4.4.1. FREQUÊNCIAS DE AGRADO E DESAGRADO DE CADA FRAGRÂNCIA.

Com os dados do teste plotados na planilha do Microsoft Excel foram montadas planilhas com as frequências de agrado e desagrado para cada fragrância (TABELA 5) e o respectivo gráfico (GRÁFICOS III e IV)

**Tabela 5:** Frequência das escolhas (agrado e desagrado) para cada fragrância do teste olfativo. (N = 176).

FRAGRÂNCIA	AGRADO (%)	DESAGRADO (%)
BAUNILHA(1)	24	11
LIMÃO (2)	14	2
ALMÍSCAR (3)	29	8
LAVANDA (4)	15	3
SÂNDALO (5)	7	16
CRAVO (6)	3	26
JASMIM (7)	8	34
<b>TOTAL</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

**GRÁFICO III:** Frequência de agrado para cada fragrância do teste olfativo. (N=88)



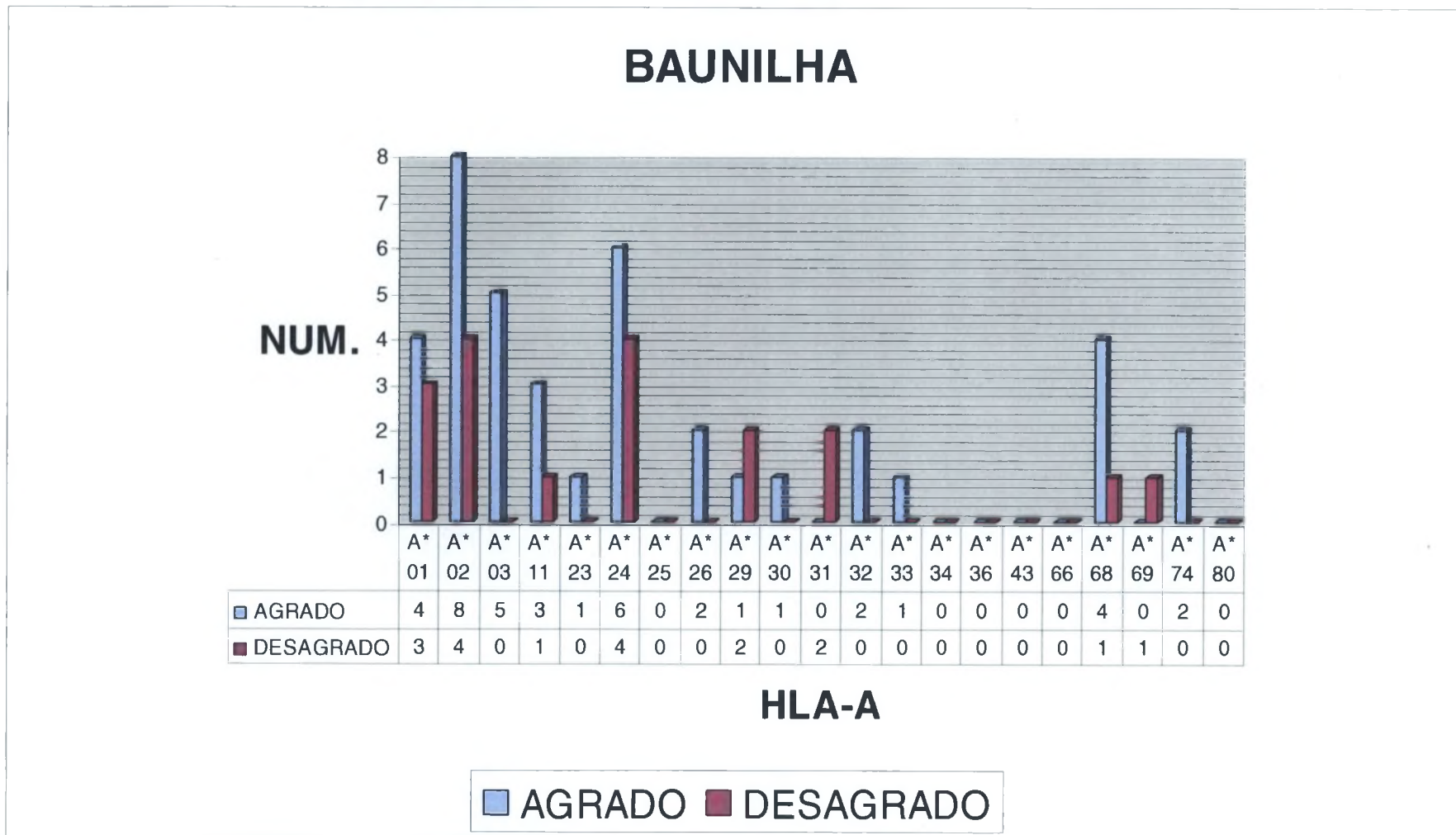
**GRÁFICO IV:** Frequência de desagrado para cada fragrância do teste olfativo. (N = 88).



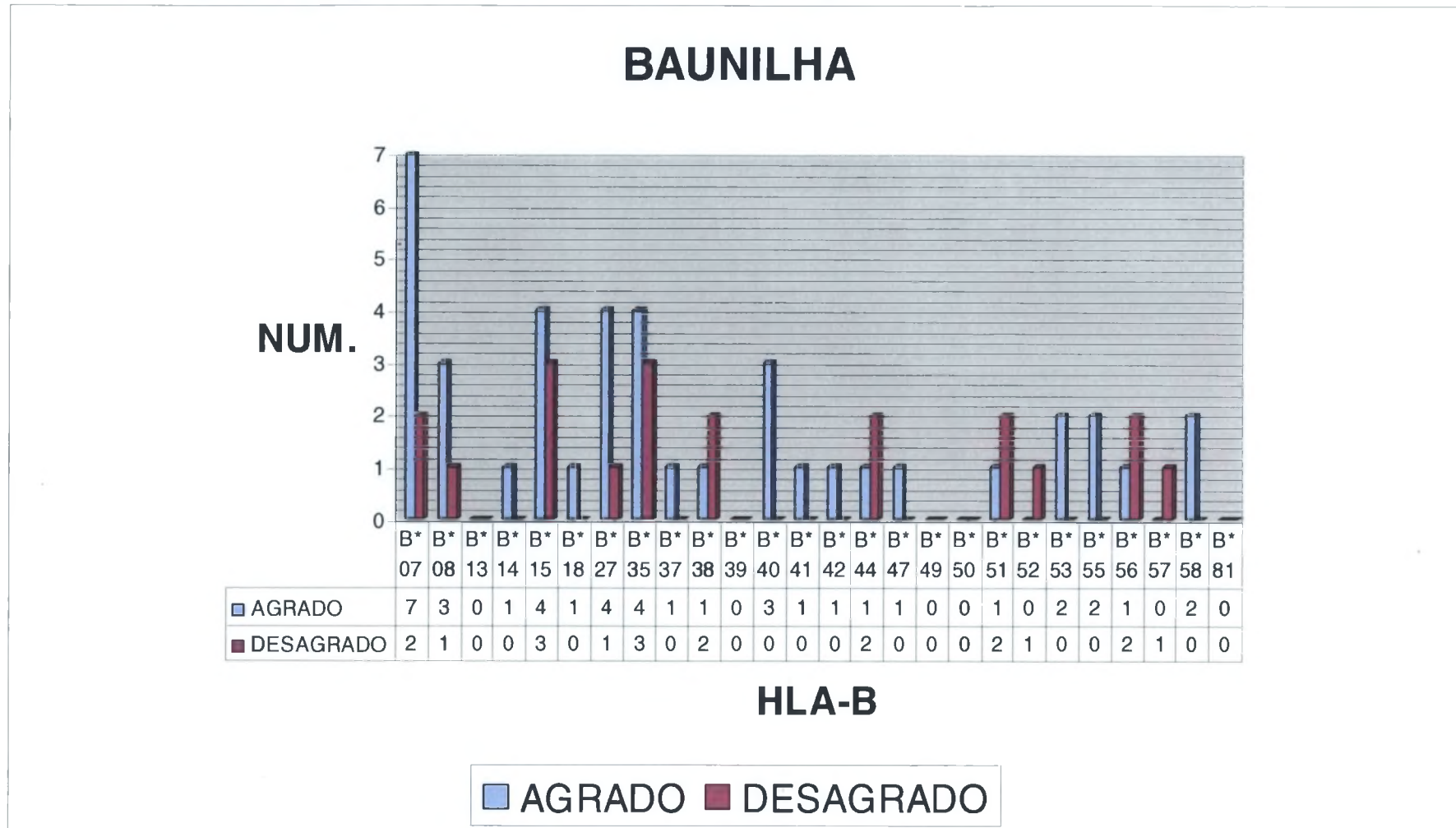
4.4.2. NÚMERO DE OCORRÊNCIAS DOS ALELOS HLA-A E HLA-B CONSIDERANDO-SE OS INDIVÍDUOS QUE AVALIARAM AS DIFERENTES FRAGRÂNCIAS TESTADAS.

Os gráficos a seguir (GRÁFICOS V a XVIII) demonstram o número de ocorrências de cada alelo HLA-A e HLA-B nas avaliações de cada fragrância realizadas pelos indivíduos da amostra. Pode-se perceber facilmente nesses gráficos a diferença do número de indivíduos que sentiam agrado e desagrado por determinada fragrância, considerando-se separadamente cada alelo HLA.

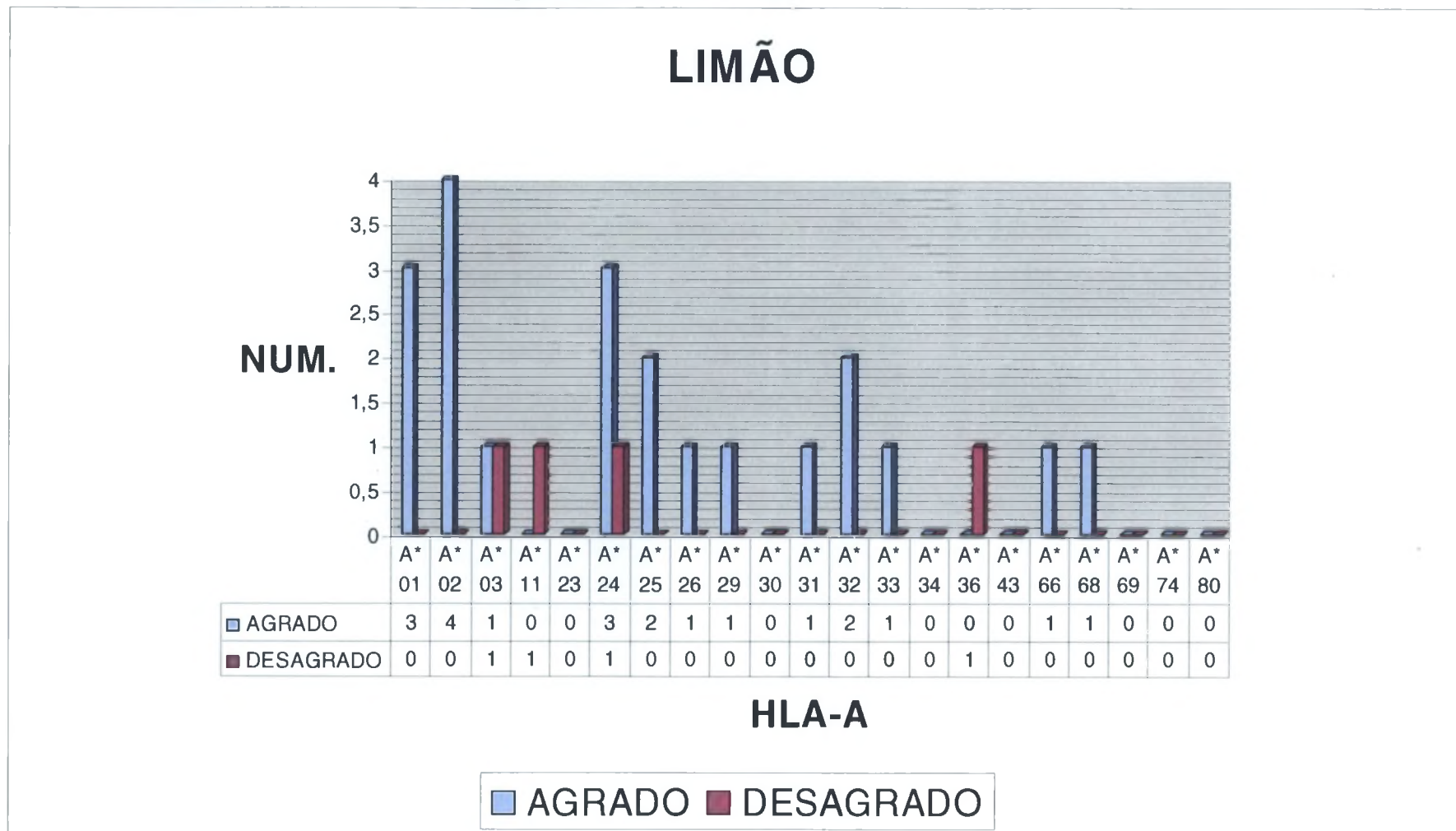
**GRÁFICO V:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de baunilha. (N=58)



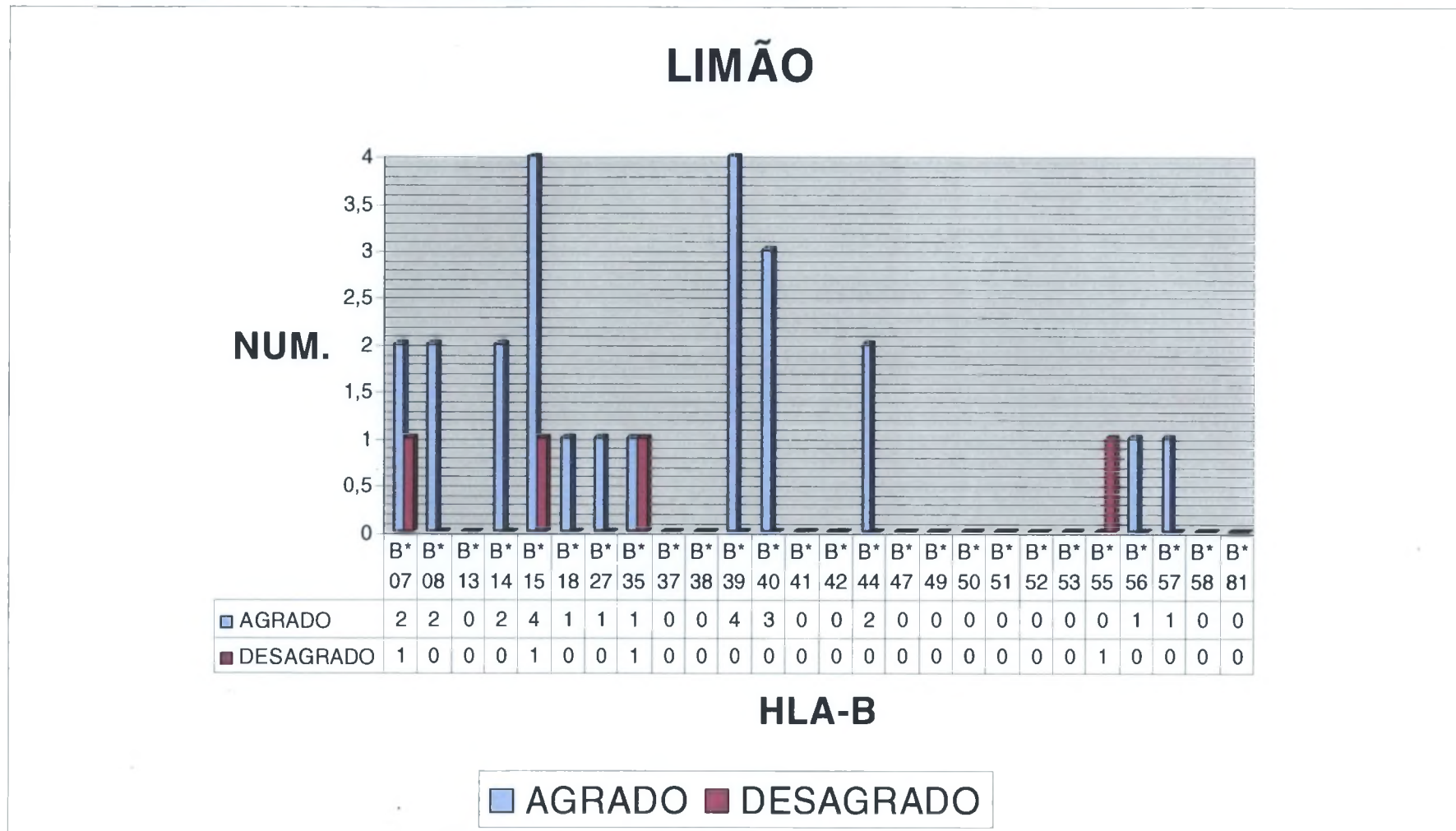
**GRÁFICO VI:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de baunilha. (N=61)



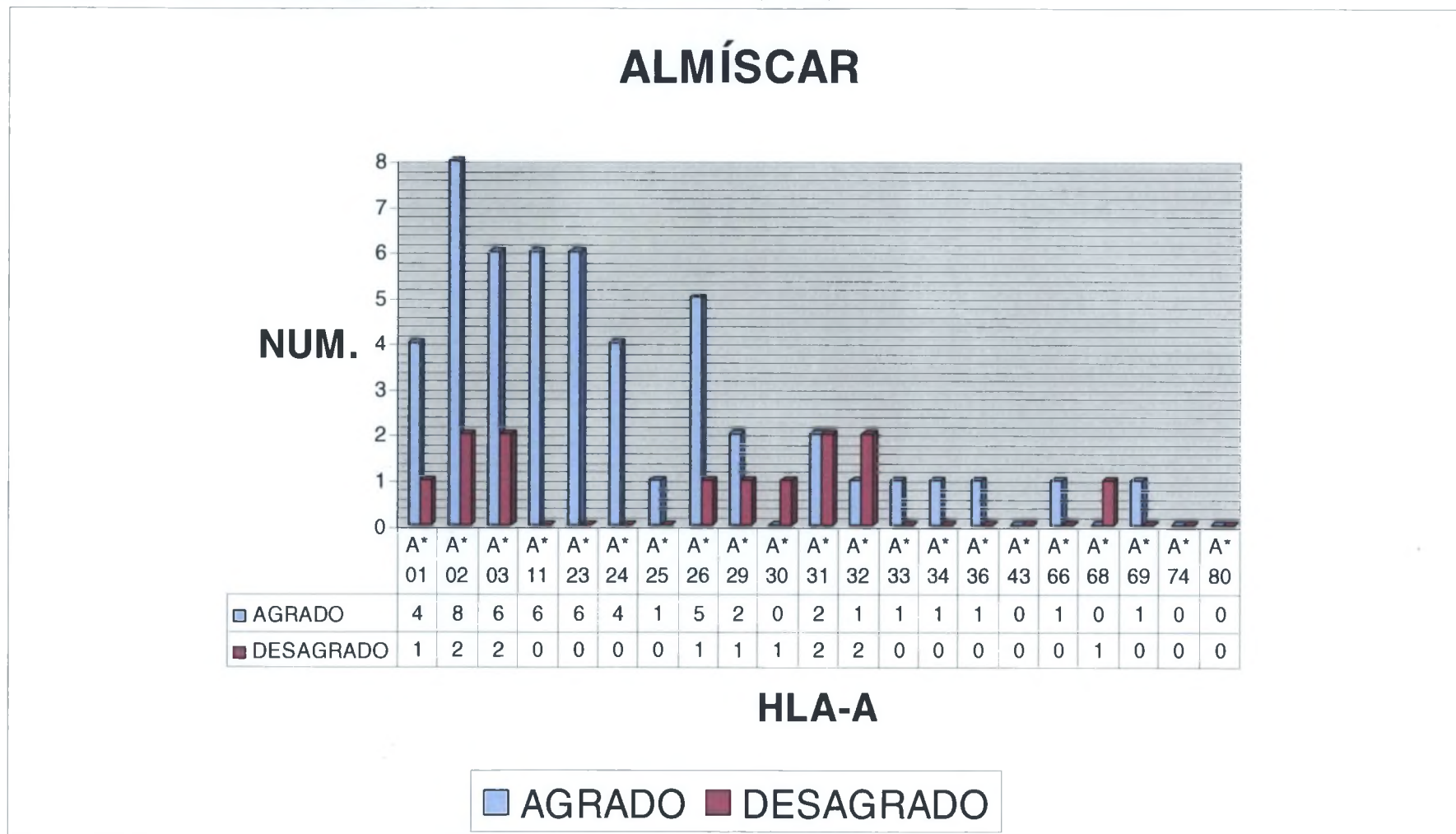
**GRÁFICO VII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de limão. (N=25)



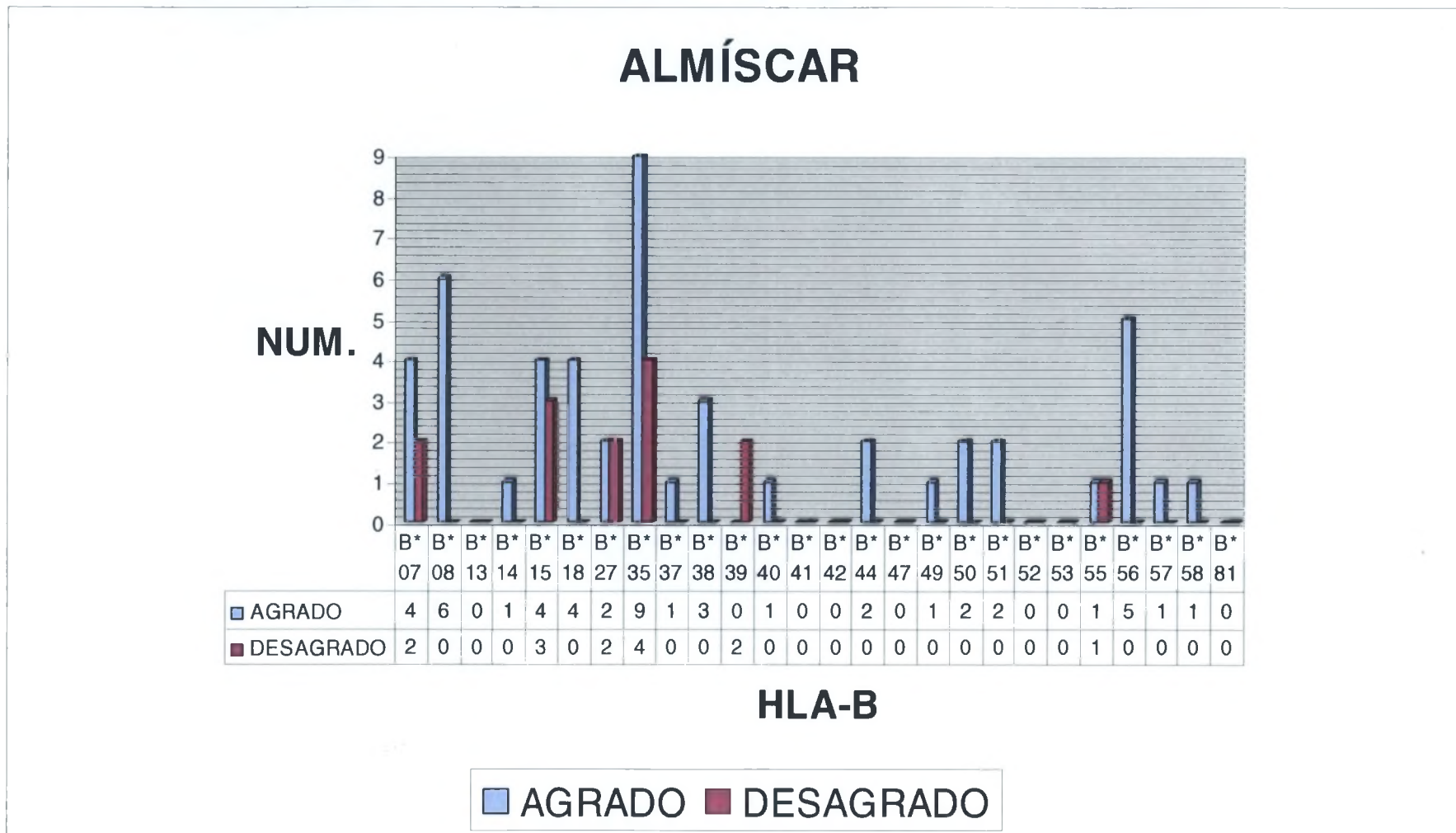
**GRÁFICO VIII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de limão. (N=28)



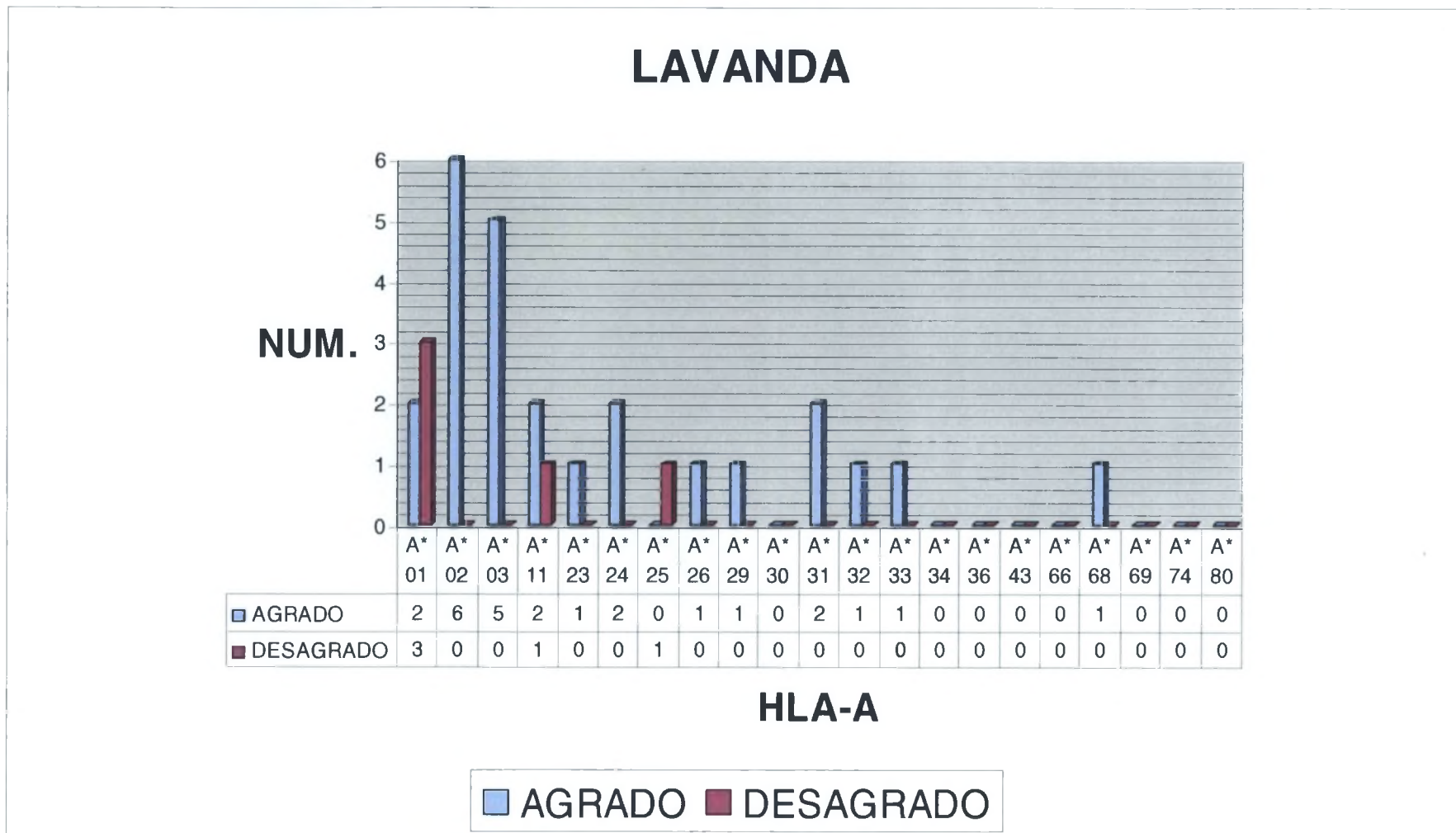
**GRÁFICO IX:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de almíscar. (N=63)



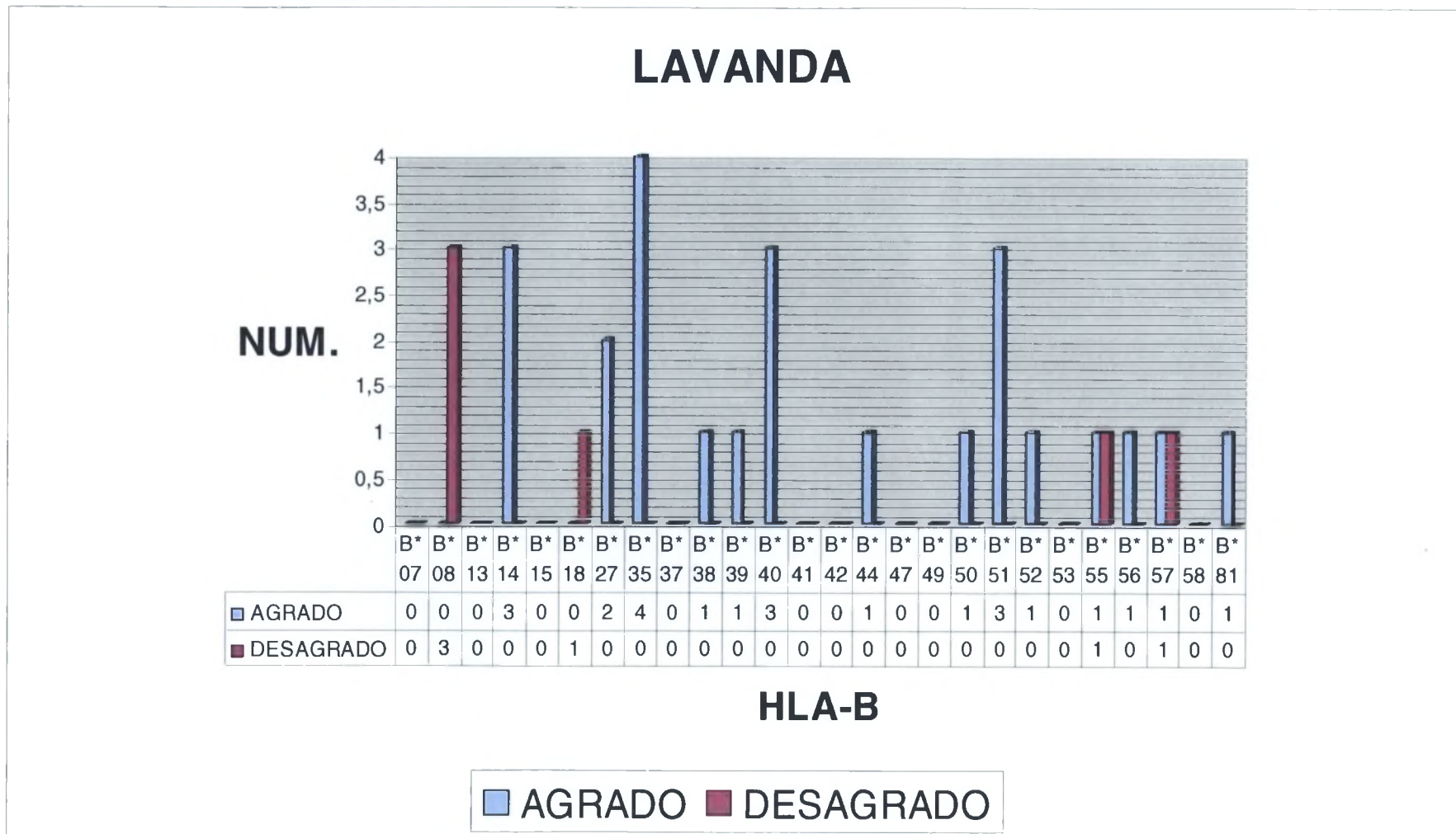
**GRÁFICO X:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de almíscar. (N=64)



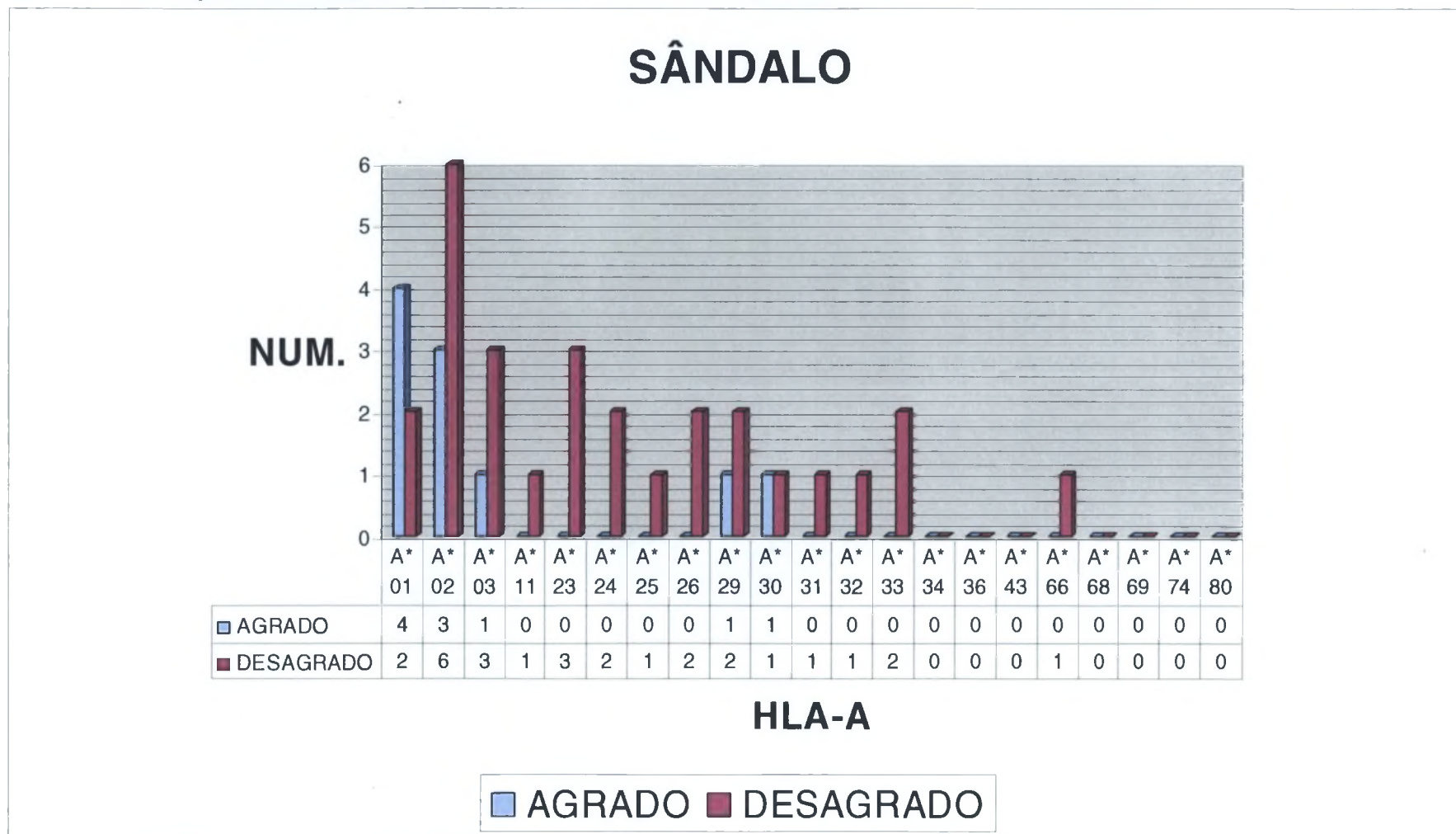
**GRÁFICO XI:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de lavanda. (N=30)



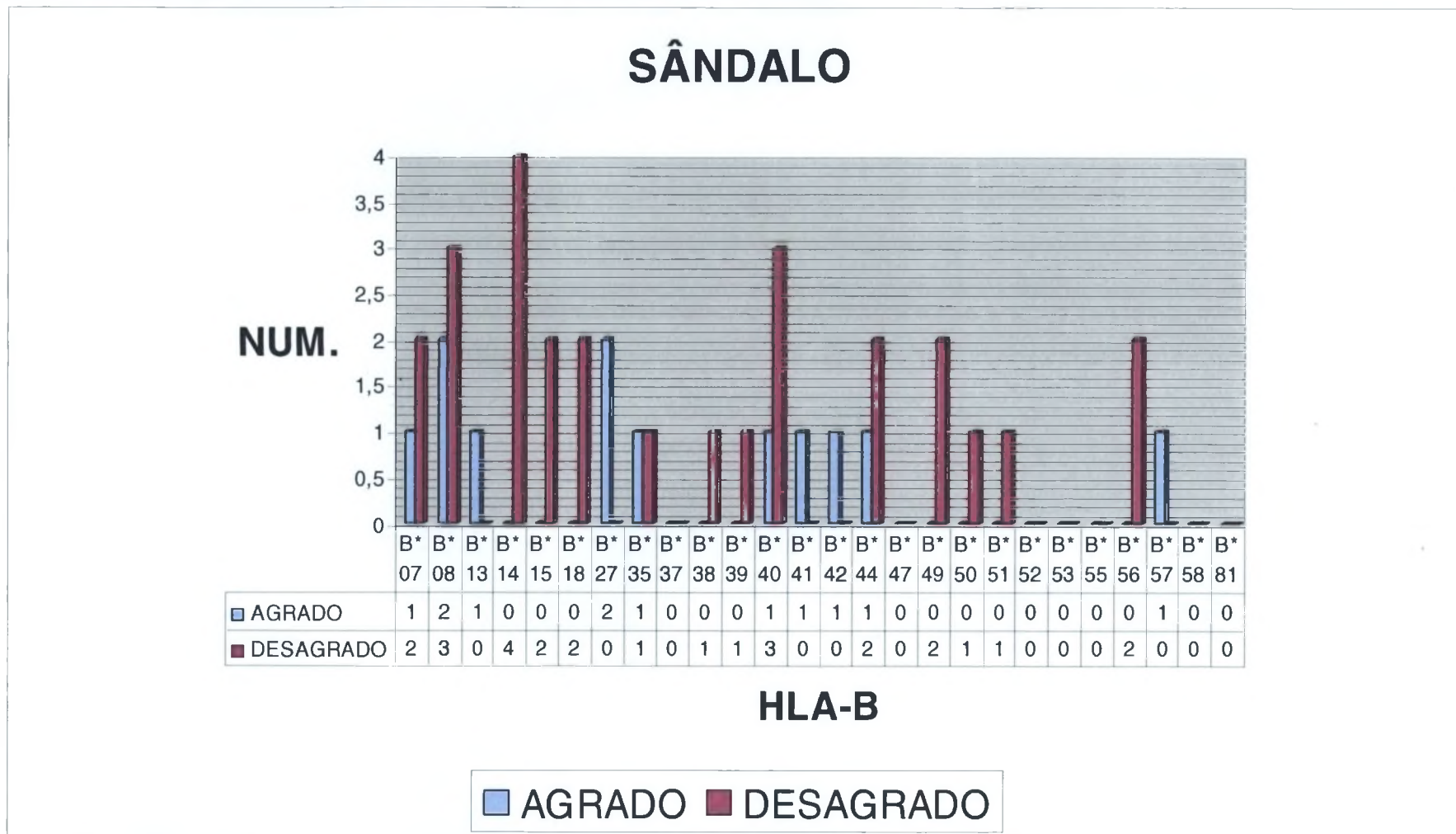
**GRÁFICO XII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de lavanda. (N=30)



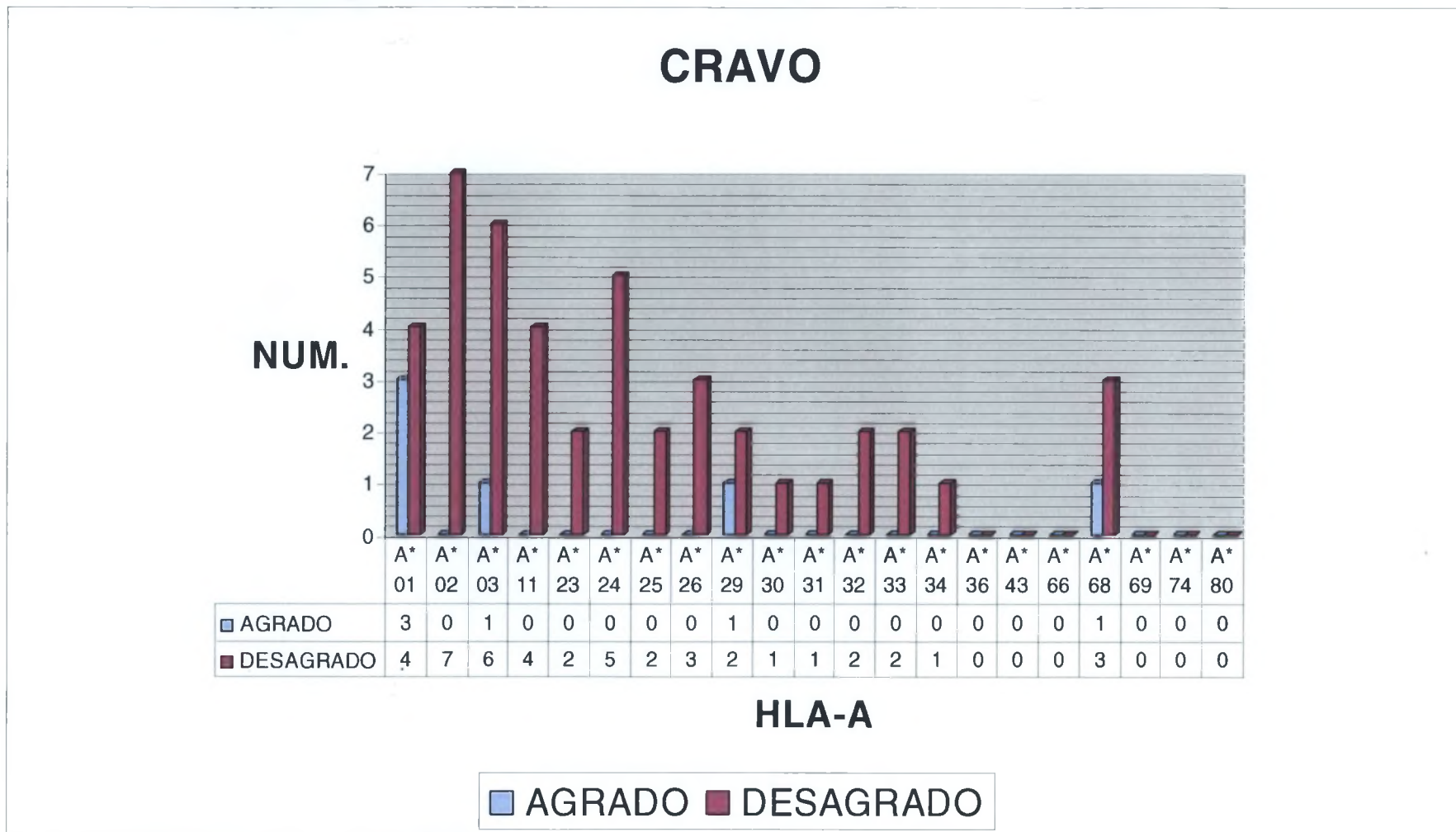
**GRÁFICO XIII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de sândalo. (N=38)



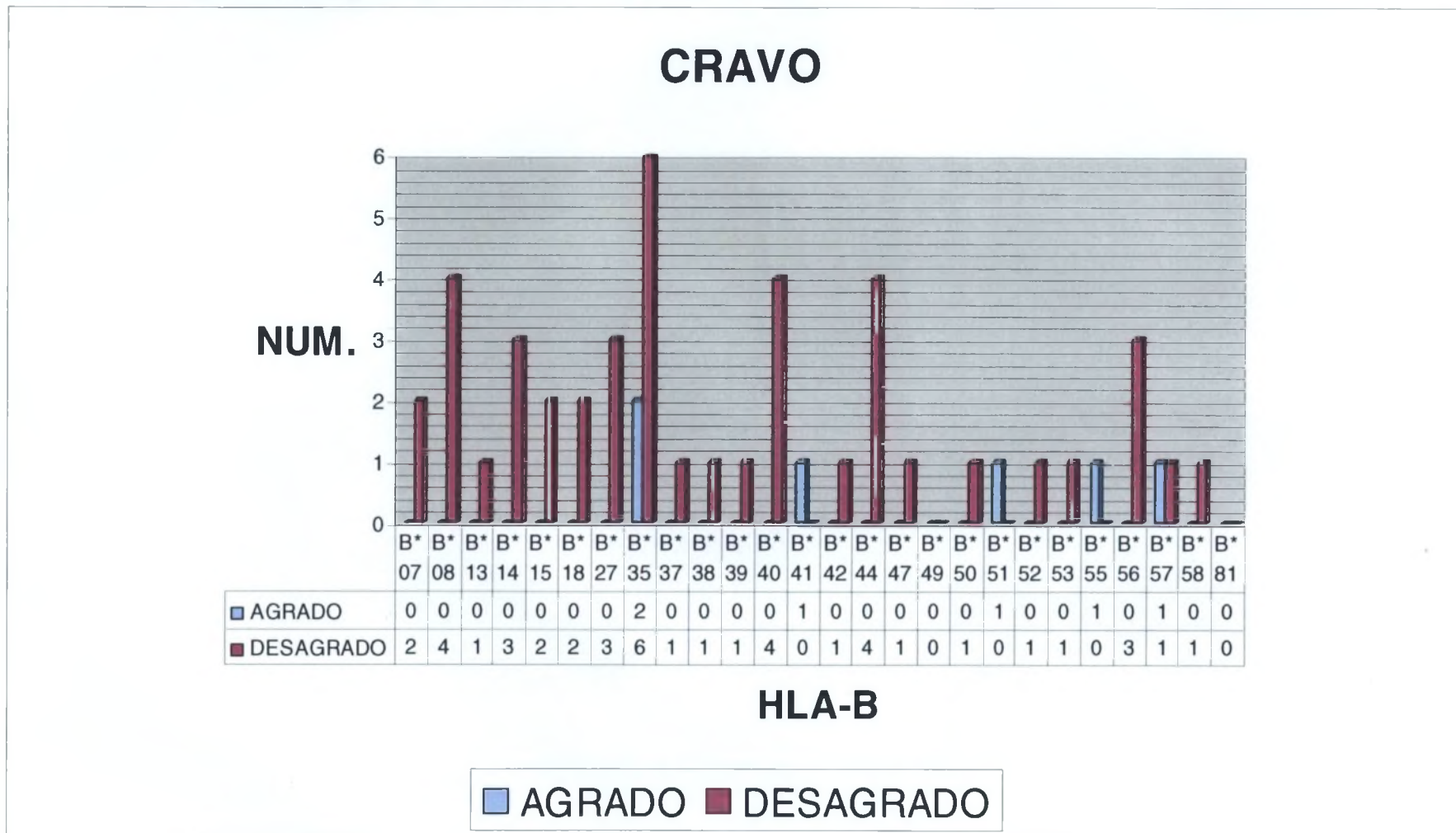
**GRÁFICO XIV:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de sândalo. (N=39)



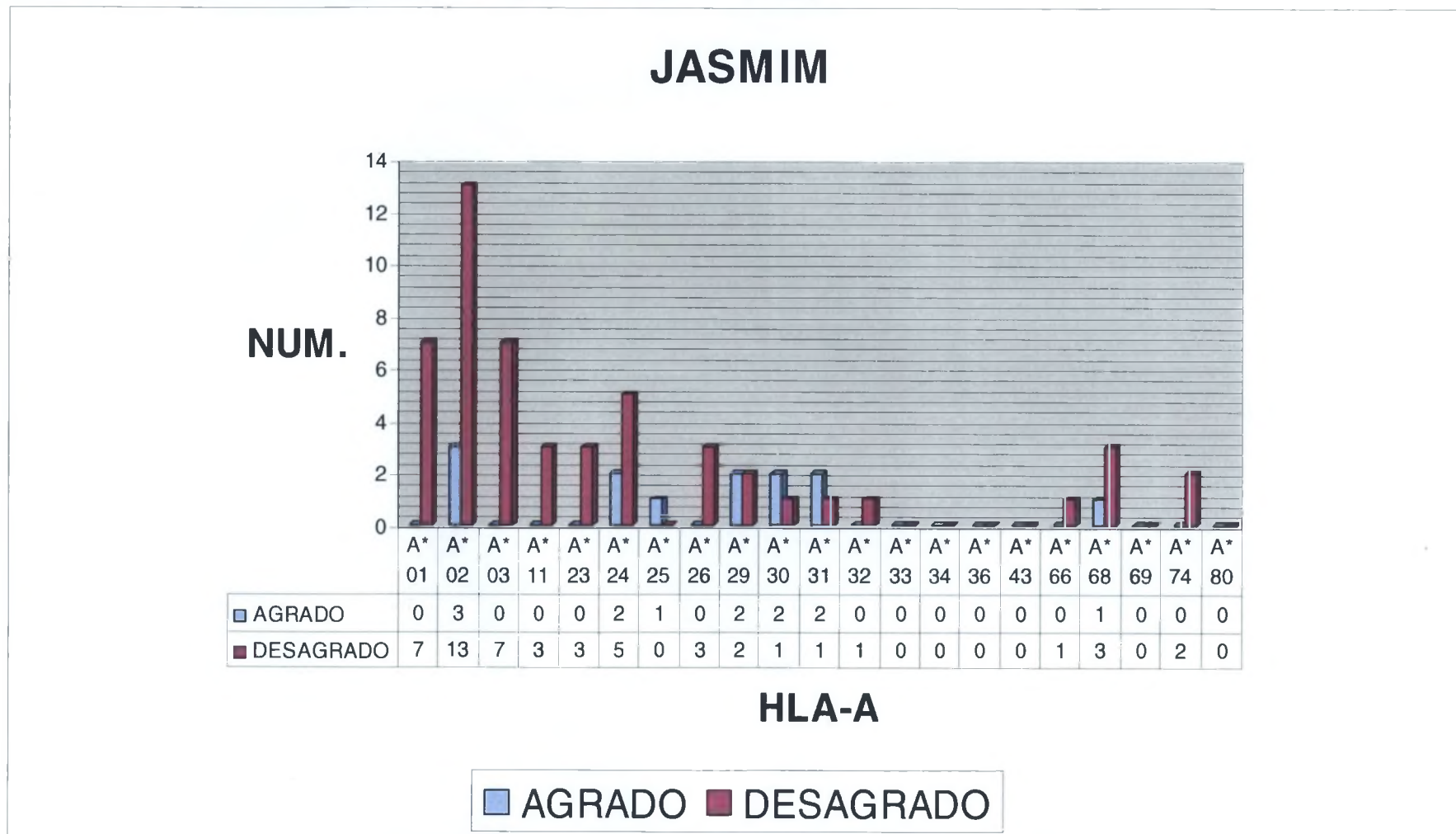
**GRÁFICO XV:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de cravo. (N=51)



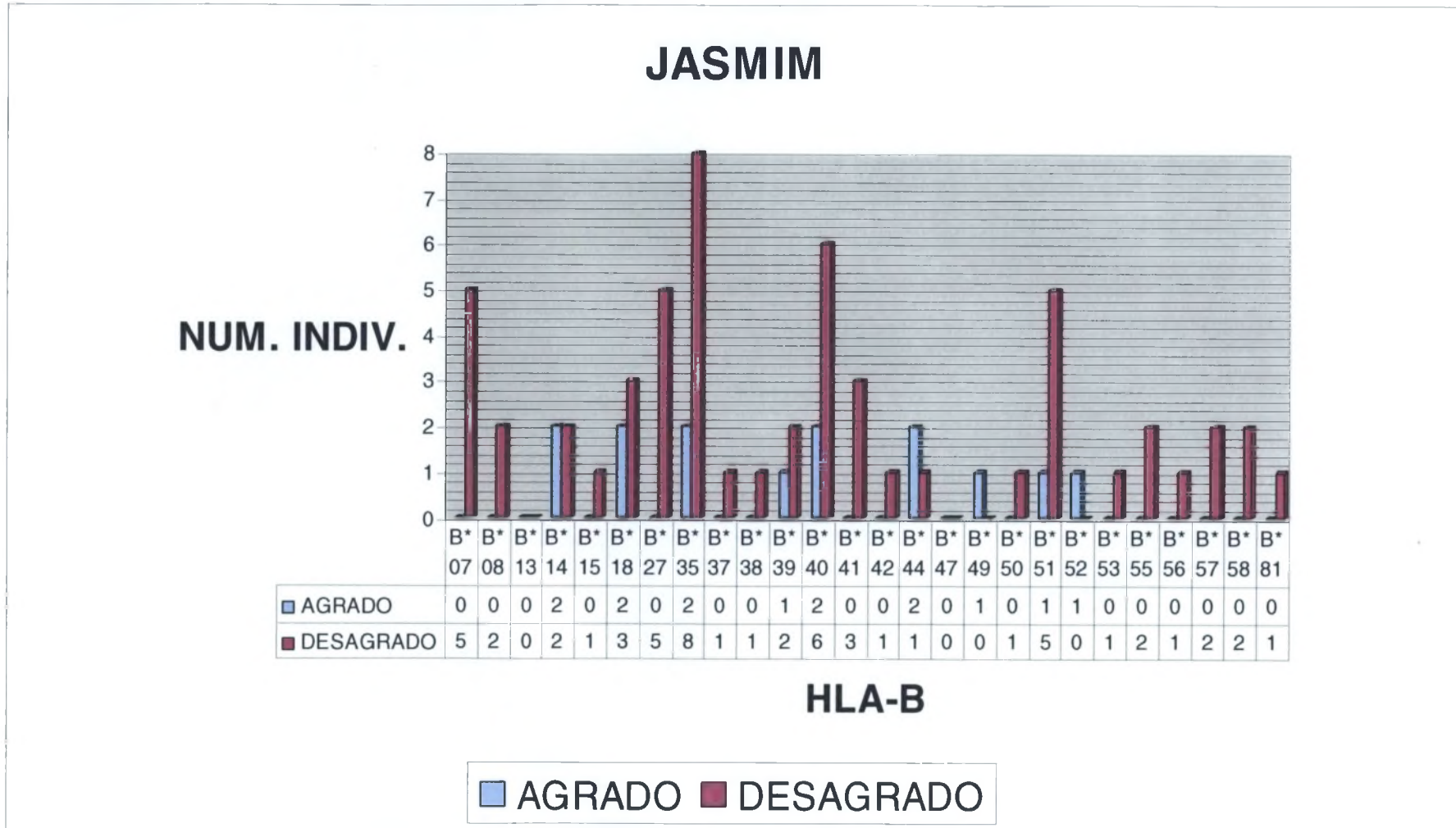
**GRÁFICO XVI:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de cravo. (N=50)



**GRÁFICO XVII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-A considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de jasmim. (N=65)



**GRÁFICO XVIII:** Gráfico que mostra o número de ocorrência dos alelos do gene HLA-B considerando-se os indivíduos que demonstraram agrado e desagrado pela fragrância de jasmim. (N=70)



## 4.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos dados obtidos pôde-se montar uma outra tabela contendo o número de ocorrência para cada alelo HLA-A e HLA-B, que foram agrupados em CREGs, com respectivos sub-totais para efetuar os cálculos estatísticos para cada grupo CREG, de cada gene, testando a hipótese de independência dos CREGs na escolha por determinada fragrância.

**Tabela 6:** Tabela do número de escolha positiva e negativa para cada fragrância, considerando-se os alelos HLA-A agrupados em CREGs.

CREG	fragrâncias HLA - A	baunilha		limão		almíscar		lavanda		sândalo		cravo		jasmim		TOTAL
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
A01C	A*1	4	3	3	0	4	1	2	3	4	2	3	4	0	7	40
	A*3	5	0	1	1	6	2	5	0	1	3	1	6	0	7	38
	A*11	3	1	0	1	6	0	2	1	0	1	0	4	0	3	22
	A*29	1	2	1	0	2	1	1	0	1	2	1	2	2	2	18
	A*30	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	2	1	8
	A*31	0	2	1	0	2	2	2	0	0	1	0	1	2	1	14
	A*36	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	A*80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total		14	8	6	3	21	7	12	4	7	10	5	18	6	21	142
A02C	A*2	8	4	4	0	8	2	6	0	3	6	0	7	3	13	64
	A*23	1	0	0	0	6	0	1	0	0	3	0	2	0	3	16
	A*24	6	4	3	1	4	0	2	0	0	2	0	5	2	5	34
	A*68	4	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	3	1	3	16
	A*69	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Sub-total		19	10	8	1	19	3	10	0	3	11	1	17	6	24	132
A10C	A*25	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1	0	2	1	0	8
	A*26	2	0	1	0	5	1	1	0	0	2	0	3	0	3	18
	A*32	2	0	2	0	1	2	1	0	0	1	0	2	0	1	12
	A*33	1	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	2	0	0	8
	A*34	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	A*43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A*66	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4
	A*74	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
Sub-total		7	0	7	0	10	3	3	1	0	7	0	10	1	7	56
TOTAL		40	18	21	4	50	13	25	5	10	28	6	45	13	52	330

Conforme pode-se observar nas tabelas 7 e 8 a seguir, não foram encontrados valores significativos de qui-quadrado para as hipóteses testadas.

**Tabela 7:** Tabela de qui-quadrado para testar a hipótese de independência entre o agrado por determinada fragrância e os grupos CREG.

<b>FRAGRÂNCIAS</b>	<b>CREGs</b>	<b>O</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>D<sup>2</sup>/E</b>
Baunilha	A01C	14	17,2	-3,2	<b>0,59</b>
	A02C	19	16	3	<b>0,56</b>
	A10C	7	6,79	0,21	<b>0,01</b>
Limão	A01C	6	9,04	-3,04	<b>1,02</b>
	A02C	8	8,40	-0,4	<b>0,02</b>
	A10C	7	3,56	3,44	<b>3,32</b>
Almíscar	A01C	21	21,5	-0,5	<b>0,01</b>
	A02C	19	20	-1	<b>0,05</b>
	A10C	10	8,48	1,52	<b>0,27</b>
Lavanda	A01C	12	10,8	1,2	<b>0,13</b>
	A02C	10	10	0	<b>0</b>
	A10C	3	4,24	-1,24	<b>0,36</b>
Sândalo	A01C	7	4,30	2,7	<b>1,70</b>
	A02C	3	4	-1	<b>0,25</b>
	A10C	0	1,70	-1,7	<b>1,70</b>
Cravo	A01C	5	2,58	2,42	<b>2,27</b>
	A02C	1	2,40	-1,4	<b>0,82</b>
	A10C	0	1,02	-1,02	<b>1,02</b>
Jasmim	A01C	6	5,59	0,41	<b>0,03</b>
	A02C	6	5,20	0,8	<b>0,12</b>
	A10C	1	2,21	-1,21	<b>0,66</b>
<b>G. L. = 12</b>	$\chi^2$ tab=	21,03		$\chi^2$ calc=	<b>14,91</b>

**Tabela 8:** Tabela de qui-quadrado para testar a hipótese de independência entre o desagrado por determinada fragrância e os grupos CREG.

<b>FRAGRÂNCIAS</b>	<b>CREGs</b>	<b>O</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>D<sup>2</sup>/E</b>
Baunilha	A01C	8	7,75	0,25	<b>0,01</b>
	A02C	10	7,20	2,8	<b>1,09</b>
	A10C	0	3,05	-3,05	<b>3,05</b>
Limão	A01C	3	1,72	1,28	<b>0,95</b>
	A02C	1	1,60	-0,60	<b>0,23</b>
	A10C	0	0,68	-0,68	<b>0,68</b>
Almíscar	A01C	7	5,59	1,41	<b>0,36</b>
	A02C	3	5,20	-2,2	<b>0,93</b>
	A10C	3	2,21	0,79	<b>0,28</b>
Lavanda	A01C	4	2,15	1,85	<b>1,59</b>
	A02C	0	2	-2	<b>2</b>
	A10C	1	0,85	0,15	<b>0,03</b>
Sândalo	A01C	10	12	-2	<b>0,33</b>
	A02C	11	11,2	-0,2	<b>0</b>
	A10C	7	4,75	2,25	<b>1,07</b>
Cravo	A01C	18	19,4	-1,4	<b>0,10</b>
	A02C	17	18	-1	<b>0,06</b>
	A10C	10	7,64	2,36	<b>0,73</b>
Jasmim	A01C	21	22,4	-1,4	<b>0,09</b>
	A02C	24	20,8	3,2	<b>0,49</b>
	A10C	7	8,82	-1,82	<b>0,38</b>
<b>G. L. = 12</b>	$\chi^2$ tab=	21,03		$\chi^2$ calc=	<b>14,45</b>

A tabela seguinte (TABELA 9) foi utilizada para a montagem das tabelas 10 e 11 onde se testou através do teste do qui-quadrado a hipótese de independência entre os CREGs dos alelos do gene HLA-B e as escolhas pelas diferentes fragrâncias.

**Tabela 9:** Tabela do número de escolha positiva e negativa para cada fragrância, considerando-se os alelos HLA-B agrupados em CREGs.

CREGS	fragrâncias HLA - B	baunilha		limão		almíscar		lavanda		sândalo		cravo		jasmim		TOTAL
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
B05C	B18	1	0	1	0	4	0	0	1	0	2	0	2	2	3	16
	B35	4	3	1	1	9	4	4	0	1	1	2	6	2	8	46
	B51	1	2	0	0	2	0	3	0	0	1	1	0	1	5	16
	B52	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	4
	B53	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4
Sub-total		8	6	2	1	15	4	8	1	1	4	3	10	6	17	86
B07C	B07	7	2	2	1	4	2	0	0	1	2	0	2	0	5	28
	B08	3	1	2	0	6	0	0	3	2	3	0	4	0	2	26
	B13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
	B27	4	1	1	0	2	2	2	0	2	0	0	3	0	5	22
	B40	3	0	3	0	1	0	3	0	1	3	0	4	2	6	26
	B41	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	6
	B42	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	4
	B47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	B55	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	2	10
	B56	1	2	1	0	5	0	1	0	0	2	0	3	0	1	16
	B81	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
Sub-total		23	6	9	2	19	5	8	4	9	10	2	19	2	26	144
B08C	B08	3	1	2	0	6	0	0	3	2	3	0	4	0	2	26
	B14	1	0	2	0	1	0	3	0	0	4	0	3	2	2	18
	B18	1	0	1	0	4	0	0	1	0	2	0	2	2	3	16
	B38	1	2	0	0	3	0	1	0	0	1	0	1	0	1	10
	B39	0	0	4	0	0	2	1	0	0	1	0	1	1	2	12
Sub-total		6	3	9	0	14	2	5	4	2	11	0	11	5	10	82
B12C	B13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
	B37	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4
	B40	3	0	3	0	1	0	3	0	1	3	0	4	2	6	26
	B41	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	6
	B44	1	2	2	0	2	0	1	0	1	2	0	4	2	1	18
	B47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	B49	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	4
	B50	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1	0	1	6
Sub-total		7	2	5	0	7	0	5	0	4	8	1	12	5	12	68
B21C	B15	4	3	4	1	4	3	0	0	0	2	0	2	0	1	24
	B35	4	3	1	1	9	4	4	0	1	1	2	6	2	8	46
	B49	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	4
	B50	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1	0	1	6
	B51	1	2	0	0	2	0	3	0	0	1	1	0	1	5	16
	B52	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	4
	B53	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4
	B57	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	2	10
	B58	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	6
Sub-total		13	10	6	2	20	7	10	1	2	7	4	13	5	20	120
TOTAL		57	27	31	5	75	18	36	10	18	40	10	65	23	85	500

**Tabela 10:** Tabela de qui-quadrado para testar a hipótese de independência entre o agrado por determinada fragrância e os grupos CREG.

<b>FRAGRÂNCIAS</b>	<b>CREGs</b>	<b>O</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>D<sup>2</sup>/E</b>
Baunilha	B05C	8	9,8	-1,8	<b>0,33</b>
	B07C	23	16,4	6,6	<b>2,66</b>
	B08C	6	9,35	-3,35	<b>1,20</b>
	B12C	7	7,75	-0,75	<b>0,07</b>
	B21C	13	13,7	-0,7	<b>0,04</b>
Limão	B05C	2	5,33	-3,33	<b>2,08</b>
	B07C	9	8,93	0,07	<b>0</b>
	B08C	9	5,08	3,92	<b>3,03</b>
	B12C	5	4,22	0,78	<b>0,14</b>
	B21C	6	7,44	-1,44	<b>0,28</b>
Almíscar	B05C	15	12,9	2,1	<b>0,34</b>
	B07C	19	21,6	-2,6	<b>0,31</b>
	B08C	14	12,3	1,7	<b>0,24</b>
	B12C	7	10,2	-3,2	<b>1,00</b>
	B21C	20	18	2	<b>0,22</b>
Lavanda	B05C	8	6,19	1,81	<b>0,29</b>
	B07C	8	10,4	-2,4	<b>0,55</b>
	B08C	5	5,9	-0,9	<b>0,13</b>
	B12C	5	4,9	0,1	<b>0</b>
	B21C	10	8,64	1,36	<b>0,21</b>
Sândalo	B05C	1	3,10	-2,1	<b>1,42</b>
	B07C	9	5,18	3,82	<b>2,82</b>
	B08C	2	2,95	-0,95	<b>0,31</b>
	B12C	4	2,45	1,55	<b>0,98</b>
	B21C	2	4,32	-2,32	<b>1,25</b>
Cravo	B05C	3	1,72	1,28	<b>0,95</b>
	B07C	2	2,88	-0,88	<b>0,27</b>
	B08C	0	1,64	-1,64	<b>1,64</b>
	B12C	1	1,36	-0,36	<b>0,1</b>
	B21C	4	2,4	1,6	<b>1,07</b>
Jasmim	B05C	6	3,96	2,04	<b>1,05</b>
	B07C	2	6,62	-4,62	<b>3,22</b>
	B08C	5	3,77	1,23	<b>0,4</b>
	B12C	5	3,13	1,87	<b>1,12</b>
	B21C	5	5,52	-0,52	<b>0,05</b>
<b>G. L. = 24</b>	$\chi^2$ tab=	36,41		$\chi^2$ calc=	<b>29,77</b>

**Tabela 11:** Tabela de qui-quadrado para testar a hipótese de independência entre o desagrado por determinada fragrância e os grupos CREG.

<b>FRAGRÂNCIAS</b>	<b>CREGs</b>	<b>O</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>D<sup>2</sup>/E</b>
Baunilha	B05C	6	4,64	1,36	<b>0,40</b>
	B07C	6	7,78	-1,78	<b>0,41</b>
	B08C	3	4,43	-1,43	<b>0,46</b>
	B12C	2	3,67	-1,67	<b>0,76</b>
	B21C	10	6,48	3,52	<b>1,91</b>
Limão	B05C	1	0,86	0,14	<b>0,02</b>
	B07C	2	1,44	0,56	<b>0,22</b>
	B08C	0	0,82	-0,82	<b>0,82</b>
	B12C	0	0,68	-0,68	<b>0,68</b>
	B21C	2	1,20	0,8	<b>0,53</b>
Almíscar	B05C	4	3,10	0,9	<b>0,26</b>
	B07C	5	5,18	-0,18	<b>0,01</b>
	B08C	2	2,95	-0,95	<b>0,31</b>
	B12C	0	2,45	-2,45	<b>2,45</b>
	B21C	7	4,32	2,68	<b>1,66</b>
Lavanda	B05C	1	1,72	-0,72	<b>0,30</b>
	B07C	4	2,88	1,12	<b>0,44</b>
	B08C	4	1,64	2,36	<b>3,4</b>
	B12C	0	1,36	-1,36	<b>1,36</b>
	B21C	1	2,40	-1,4	<b>0,82</b>
Sândalo	B05C	4	6,88	-2,88	<b>1,21</b>
	B07C	10	11,5	-1,5	<b>0,20</b>
	B08C	11	6,56	4,44	<b>3,01</b>
	B12C	8	5,44	2,56	<b>1,20</b>
	B21C	7	9,60	-2,6	<b>0,7</b>
Cravo	B05C	10	11,2	-1,2	<b>0,13</b>
	B07C	19	18,7	0,3	<b>0,01</b>
	B08C	11	10,7	0,3	<b>0,01</b>
	B12C	12	8,84	3,16	<b>1,13</b>
	B21C	13	15,6	-2,6	<b>0,43</b>
Jasmim	B05C	17	14,6	2,4	<b>0,40</b>
	B07C	26	24,5	1,5	<b>0,09</b>
	B08C	10	13,9	-3,9	<b>1,09</b>
	B12C	12	11,6	0,4	<b>0,01</b>
	B21C	20	20,4	-0,4	<b>0,01</b>
<b>G. L. = 24</b>		$\chi^2$ tab=	36,41	$\chi^2$ calc=	26,85

## 5. DISCUSSÃO

O método utilizado para o agrupamento dos dados tornou mais rápida a localização das informações e dados de interesse para se efetuar a análise estatística.

Através da tabulação dos dados nas tabelas 6 e 9 pode-se perceber uma evidente “pulverização” desses dados. Devido a grande quantidade de alelos existente para os dois genes os dados obtidos ficaram muito dispersos diante de tanta variabilidade. Visto isso, os dados de cada alelo HLA (HLA-A e HLA-B) foram agrupados de acordo com grupos de reação cruzada (CREGs) a que pertenciam, possibilitando assim uma análise estatística mais confiável. Além de apontar uma nova vertente para a investigação destes genes.

Verificou-se que com essa ampla distribuição dos dados, quando considerados por alelos, faz-se necessário um maior número de indivíduos na amostra. Este estudo terá continuidade nas futuras campanhas de doação de sangue e cadastramento de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO), visto que sua realização é bastante simples e não requer muito espaço físico podendo-se atingir facilmente o número amostral mínimo que possibilite a análise dos dados considerando-se os alelos individualmente.

Nas tabelas de contingência (Tabelas 7, 8, 10 e 11), verificam-se que os valores obtidos para o qui-quadrado não são significativos, ou seja, tanto para os CREGs dos genes HLA-A quanto para os CREGs dos genes HLA-B não se deve descartar a hipótese de independência na escolha pelas fragrâncias.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se então, através do presente trabalho, que não há uma escolha preferencial por diferentes fragrâncias influenciada pelos genes HLA-A e HLA-B quando analisados de forma agrupada nos CREGs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, J. L. A Theory of Mate Choice Based on Heterozygosity. **Behavioral Ecology**, v.8 p.60-65, 1997.
- BROWN, R. E. SINGH, P. B., ROSER, B. The Major Histocompatibility Complex and the Chemosensory Recognition of Individuality in Rats. **Physiology & Behavior**, v.40, p.65-73, 1987.
- BROWN, R. E. What is the role of immune System in Determining Individually Distinct Body Odours? **Int. J. Immunopharmac**, Vol.17. Nº. 8: 655-661, 1995.
- CAMPBELL, R.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunol. Today**, v.14, p.349-352, 1993.
- EGID, K., BROWN, J. L. The Major Histocompatibility Complex and Female Mating Preferences in Mice. **Animal Behavior**, v.38, p.548-550, 1989.
- HERZ, S. R., INZLICHT, M. Sex differences in response to physical and social factors involved in human mate selection The Importance Of Smell For Women. **Evolucion and Human Behavior**; 23: 359-364, 2002.
- JACOB, S., McCIINTOCK, K. M., ZELANO, B. & OBER, C. Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. **Nature Genetics**, 175 – 179, 2002.
- OBER, C. et al. HLA and Mates Choice in Humans. **American Journal of Human Genetics**, v.61, p.497-504, 1997.
- PENN, D., POTTS, W. How Do Major Histocompatibility Complex Genes Influence Odor and Mating Preferences? **Advances in Immunology**, v.69, p.411-434, 1998.
- PENN, D., POTTS, W. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. **The American Naturalist**, v.153, no.2, p.145-164, 1999.
- PENN, D., POTTS, W. Untrained Mice Discriminate MHC-Determined Odors. **Physiology & Behavior**, v.63, no.3, p.235-243, 1998.
- POTTS, W., MANNING, C., WAKELAND, E. Mating Patterns in Semi-natural Populations of Mice Influenced By MHC Genotype. **Nature**, v.352, p.619-621, 1991.

- SANTOS, P. S. C., SCHINEMANN, J. A., GABARDO, J. BICALHO, M. G. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian Students. **Hormones and Behavior**, v. 47(4), p. 384-388, 2005.
- WEDEKIND, C., MILINSKI, M. Evidence for MHC-Correlated Perfume Preferences in Humans. **Behavioral Ecology**, v.12, no.2, p.140-149, 2001.
- WEDEKIND, C., FURI, S. Body Odour Preferences in Men and Women: Do They Aim for Specific MHC Combination or Simply Heterozygosity? **Proc. R. Soc. Lond. B** 264: 1471-1479, 1997.
- WEDEKIND, C., PENN, D. MHC genes, body odors, and odor preferences. **Nephrol Dial Trasplant** 15:1269-1271, 2000.
- YAMAZAKI, K. Distintive urinary odors governed by the major histocompatibility locus of the mouse. **Proc. Natl. Acad.Sci.**, USA; Vol. 78: 5817-5820, 1981.
- YAMAZAKI, K. Chemosensory Recognition of Mouse Major Histocompatibility Types by Another Species. **Proc. Natl. Acad.Sci.**, USA; Vol. 82: 4186-4188, 1985.

## 8. ANEXOS

**Anexo I - Material de divulgação do projeto distribuído nas campanhas de doação do LIGH/Hemepar para recrutar participantes para a amostra.**

# JÁ FEZ A SUA ESCOLHA??

Não entendeu? Nós explicamos!

O Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – LIGH - da Universidade Federal do Paraná, em conjunto com o Hemepar, está desenvolvendo um projeto de pesquisa que busca investigar a maneira pela qual as pessoas preferem alguns odores a outros.

Alguns estudos anteriormente realizados indicam que essas escolhas feitas através do nosso sentido do olfato não seriam apenas por fragrâncias, mas até mesmo por uma pessoa do sexo oposto com quem nos relacionamos. E tudo isto regulado através dos genes que herdamos de nossos pais, um conjunto de genes denominado Complexo Principal de Histocompatibilidade, ou MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex.

Diante disso, nos propusemos a realizar este projeto de pesquisa, chamado “A INFLUÊNCIA DO MHC NAS PREFERÊNCIAS OLFATIVAS”, para investigar se entre o tipo genético do indivíduo e a sua escolha por determinada fragrância há uma correspondência. E para isso precisamos da sua colaboração!!

Como você pode nos ajudar? É simples.

Ao participar da campanha do Hemepar para doação voluntária de medula óssea, você já terá o seu sangue tipado, ou seja, os genes que estamos querendo investigar já serão conhecidos, basta apenas você realizar também um teste olfativo.

O teste olfativo é muito simples. Você vai simplesmente cheirar algumas fragrâncias e nos dizer qual a que mais lhe agrada e a que menos lhe agrada. Simples, não? Então participe!

Ah, você não é doador voluntário de medula óssea? Não tem problema, você também pode participar.

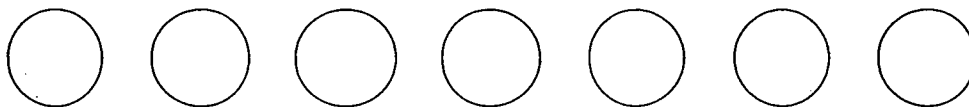
**Anexo II – Formulário utilizado para o teste olfativo.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

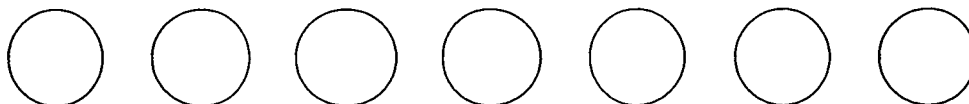
**FORMULÁRIO PARA O TESTE OLFATIVO**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Qual é a fragrância que mais lhe agrada?



Qual é a fragrância que menos lhe agrada?



Você usa algum tipo de contraceptivo? Qual? Por quanto tempo?

---

---

Resultado da tipagem HLA:

HLA-A \_\_\_\_\_ HLA-B \_\_\_\_\_