

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA INTEGRADA
FELIPE BRAVO MACHADO DE ANDRADE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PERIODONTITE E O
POLIMORFISMO GENÉTICO DA LECTINA DE
LIGAÇÃO DA MANOSE (MBL) EM UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

RECIFE-PE
2010

FELIPE BRAVO MACHADO DE ANDRADE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PERIODONTITE E O
POLIMORFISMO GENÉTICO DA LECTINA DE
LIGAÇÃO DA MANOSE (MBL) EM UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

RECIFE - PE
2010

Andrade, Felipe Bravo Machado de.

Associação entre periodontite e o polimorfismo genético da lectina de ligação da manose (MBL) em uma população brasileira / Felipe Bravo Machado de Andrade. – Recife: O Autor, 2010.

51 folhas: fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Periodontite. 2. PCR em tempo real. 3. MBL2. 4. Polimorfismo. I. Título.

616.314.1

CDU (2.ed.)

UFPE

617.632

CDD (20.ed.)

CCS2010-097

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

COLEGIADO

Profa. Dra. Alessandra de Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Etenildo Dantas Cabral

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa. Dra. Silvana Maria Orestes Cardoso

SECRETARIA

Oziclere de Araújo Sena

Ata da 89ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco- Facial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 28 de janeiro de 2010.

Às 9:00(nove horas) do dia 28 do mês de janeiro do ano de dois mil e dez , reuniram-se no Auditório do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO – UFPE, atuando como (presidente) , Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA , atuando como primeiro examinador, Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS , atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“ASSOCIAÇÃO ENTRE A PERIODONTITE E O POLIMORFISMO GENETICO DA LECTINA DE LIGAÇÃO DA MANOSE (MBL) EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA ”**, do CD FELIPE BRAVO MACHADO DE ANDRADE, candidato ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA , sob orientação da professora Dra .RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA e Co-orientação da Prof.Dr. PAULO ROBERTO ELEUTERIO DE SOUZA . Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, membro do Colegiado do Programa da Pós-Graduação em Odontologia abriu os trabalhos, convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópia do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou o mestrando, FELIPE BRAVO MACHADO DE ANDRADE, para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. O candidato expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Ao término da arguição os Examinadores se reuniram em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram ao candidato os seguintes conceitos: Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA - **(APROVADO)**, Prof.Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS **(APROVADO)**, Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO – **(APROVADO)**, o candidato recebeu três conceitos **(APROVADO)** é considerado **(APROVADO)**, devendo o candidato acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso. Face a aprovação, fica o candidato, apto a receber o Grau de Mestre em Odontologia,

cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis para os devidos fins. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar eu, Oziclere Sena de Araújo, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo recém formado Mestre pela UFPE.



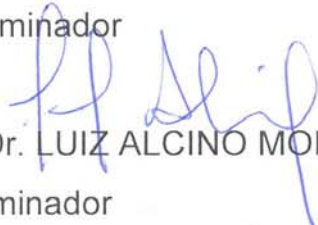
Recife, 28 de janeiro de 2010



Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
Presidente,



Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA
1º Examinador



Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS
2º Examinador





AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

Aos meus pais, Fernando Antônio Machado de Andrade e Maria de Fátima Bravo Machado de Andrade, por me apoiarem em todas as etapas da minha vida, sendo meu esteio e minha fonte de inspiração, exemplo de amor e dedicação à família. Obrigado por tudo que vocês fizeram e que ainda farão por mim.

A minha irmã, Rafaella Bravo, pelo exemplo de caráter e honestidade, dedicação e perseverança que você sempre me passou. Obrigado pelo seu companheirismo durante toda nossa vida.

A minha noiva, Júlia Figueirêdo de Melo, por ter entrado em meu caminho, a quem dedico todo meu amor e carinho. Palavras não conseguirão mensurar a sua importância em minha vida. Espero passar o resto dos meus dias ao seu lado.

À professora Renata Cimões, pela dedicação e paciência, exemplo de docente a ser seguido. Um bom professor é aquele que guia seus alunos, sem enaltecer apenas seus méritos, mas, sobretudo, apontando as falhas no meio do caminho e fornecendo os meios para o aprendizado próprio e a superação dos obstáculos.

As minhas colegas do mestrado Bruna Farias, Talita Ribeiro e Thaís Malheiros, por todo o apoio e companheirismo durante a nossa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro disponibilizado, fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos passados.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, pela fundamental orientação e por sua disponibilidade para nos ensinar.

Aos meus colegas de mestrado Daniela Mendes, Catarina Brasil, Ana Luísa Mariz, Klécio Alves, Raphaela Silva, Michellini Sedycias, Arnaldo Filho, Cláudia Brainer, Natália Carvalho e Camila Arcoverde pelos momentos que passamos, certamente inesquecíveis, e por toda a amizade compartilhada.

Ao meu amigo Felipe Brêda pelo apoio fundamental para a realização da pesquisa.

Aos colegas da especialização em Periodontia da UFPE.

Aos colegas da especialização em Estomatologia da UFPE, em especial aos professores Luiz Alcino Gueiros, Adriana Machado e Alessandra Carvalho.

Aos professores Eduardo Leite e Alfredo Gaspar pela agradável companhia diária na Universidade.

A Oziclere, da Paz e Tânia, funcionárias da pós-graduação da UFPE, pelos momentos descontraídos e apoio no decorrer do curso.

Às alunas de graduação Kadidja Martins e Andrea Senna pelo apoio na realização dos exames e na coleta da amostra.

Aos colegas do Centro Médico do Shopping Boa Vista pelo apoio na coleta das amostras.

Aos pacientes que fizeram parte da amostra, sem os quais seria impossível a realização dessa pesquisa.



RESUMO

RESUMO

Background: Periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes. Este estudo teve como objetivo determinar a presença do polimorfismo genético da lectina de ligação da manose (MBL) e associar à condição periodontal. Participaram 93 pacientes, sendo 47 diagnosticados com periodontite (18 com forma agressiva e 29 com a crônica) e 46 periodontalmente saudáveis. Após o exame clínico, foram coletadas células de descamação da mucosa bucal para posterior extração de DNA e determinação do genótipo pela técnica da PCR em tempo real e análise da temperatura de melting.

Resultados: Os resultados mostraram que o genótipo mutante esteve presente em 47,9% dos pacientes saudáveis e em 51% dos pacientes com periodontite. Entre os indivíduos com doença periodontal, 77,8% portadores da forma agressiva e 34,5% com a forma crônica apresentaram o genótipo mutante, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$). Com relação à frequência alélica, 25% dos pacientes periodontalmente saudáveis apresentaram o alelo “0” mutante. No grupo com periodontite, a presença do alelo mutante esteve em 17,2% dos indivíduos com a forma crônica e em 50% dos pacientes com periodontite agressiva ($p=0,015$).

Conclusões: Os dados obtidos neste estudo mostraram associação entre o polimorfismo do gene da MBL e a periodontite agressiva.

Palavras-Chave: MBL2; Polimorfismos; PCR em tempo real; Periodontite

ABSTRACT

ABSTRACT

Background: Periodontitis is chronic inflammatory disease affecting supportive tissue teeth. This study aimed determined the presence of polymorphism of mannose-binding lectin (MBL) and its association to periodontal condition. Ninety three patients to take part in the study, 47 with diagnostics periodontitis (18 with aggressive periodontitis and 29 with chronic periodontitis) and 46 periodontally healthy. After clinical exam, the collection of scaling cells from the oral mucosa was carried out to DNA extraction and genotyping by PCR real time with melting analysis temperature.

Results: The results shown that mutant genotype were present in 47.9% patients without periodontitis and 51% in patients with periodontitis. Between periodontitis patients, 77.8% with aggressive form and 34.5% those with chronic form presented mutant genotype, this difference was statistically significant ($p=0.002$). In relation to allele frequencies, 25% periodontally healthy patients presented allele “0” mutant, 17.2% of subjects with chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients shown 50% frequency to mutant allele “0”, showing difference significant ($p=0.015$).

Conclusions: Data of this study shown association between presence of MBL-2 polymorphism gene and aggressive periodontitis.

Key words: MBL2; Polymorphisms; Real time PCR; Periodontitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Comparação entre as curvas de <i>melting</i> de três padrões utilizados na genotipagem do gene MBL2.	28
--	----



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação do polimorfismo do gene da MBL2 e a doença periodontal	34
Tabela 2 – Associação do polimorfismo do gene da MBL2 entre as formas agressiva e crônica da periodontite	34
Tabela 3 – Frequência alélica entre os grupos estudados	35
Tabela 4 – Frequência alélica entre os grupos com periodontite agressiva e crônica	35



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

MBL	Lectina Ligadora de Manose
Pg	<i>Porphyromonas gingivallis</i>
Aa	<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
MASP	Manose Associada a Serino Proteases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Q-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SUMÁRIO

Artigo.....	22
Introdução.....	24
Materiais e métodos.....	26
Resultados.....	28
Discussão.....	29
Referências.....	32
Apêndices	36
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	37
Ficha clínica.....	38
Anexos.....	40
Normas BMC Molecular Biology	41
Parecer do Comitê de Ética.....	51



ARTIGO

Associação entre a periodontite e o polimorfismo genético da lectina de ligação da manose (MBL) em uma população brasileira

F. Bravo¹, P.R.E. Souza² e R. Cimões³

¹ Estudante de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Doutor em Biologia, Departamento de Genética, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Doutora em Odontologia, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Os autores participaram de todas as etapas desse trabalho.

Endereço onde o trabalho foi realizado:

Especialização de Periodontia da Universidade Federal de Pernambuco
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife – PE, Brasil. CEP: 50670-901

Autor para correspondência:

Renata Cimões

Endereço: Pós-Graduação em Odontologia

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. 50670-901.

Telefone/Fax: + 55 81 2126-8817. E-mail: renata.cimoes@globo.com.

Introdução

Periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes [1]. A placa bacteriana é considerada o fator de risco primário para o surgimento da doença periodontal, causando lenta destruição do periodonto pela ação do processo inflamatório. A doença periodontal pode se apresentar de várias formas. A periodontite crônica é caracterizada pela perda de inserção clínica causada pela destruição do ligamento periodontal e do suporte ósseo adjacente. Geralmente apresenta progressão lenta e moderada, porém pode apresentar períodos de rápida progressão. Um mesmo paciente pode apresentar regiões saudáveis ou com periodontite. Clinicamente pode apresentar uma combinação de sinais como edema, eritema, sangramento gengival após sondagem e supuração [2-5].

A periodontite agressiva afeta, em geral, pacientes sistemicamente saudáveis com idade inferior a 30 anos, mas pode afetar pacientes mais velhos. Essa entidade diferencia-se da periodontite crônica pela idade de instalação da doença e rapidez na progressão, composição da microbiota, alterações imunológicas do hospedeiro e um componente hereditário importante [6]. Seu diagnóstico é baseado em critérios como menor depósito de cálculo quando comparada a forma crônica e rápida perda de inserção com longos períodos de quiescência [7,8]. A forma localizada da doença apresenta danos localizados nos primeiros molares permanentes e incisivos; e na generalizada, há perda de inserção interproximal em pelo menos três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos. Ambas as formas da doença estão associadas frequentemente à presença do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e anormalidades na função neutrofílica [7].

A periodontite é considerada uma doença complexa e está associada com variações em múltiplos genes. Atualmente, pouco se sabe sobre quais genes e que variações nesses genes podem estar envolvidas na periodontite. Um grande número de polimorfismos genéticos estão sendo investigados e correlacionados com a doença periodontal. A presença de microorganismos no biofilme dentário é necessária, mas não é suficiente para o desenvolvimento de periodontite [8]. A resposta imunoinflamatória do hospedeiro, envolvendo tanto a ativação do sistema imune inato como o adaptativo, sendo a maior responsável pela destruição tecidual local, constitui o principal componente da susceptibilidade à doença periodontal, sendo também o caracterizador do fenótipo biológico individual, contribuindo para a determinação do fenótipo clínico periodontal final [9].

A lectina de ligação à manose (MBL) é um importante componente da imunidade inata [10], e pode desenvolver um papel na defesa contra a invasão bacteriana na periodontite. A MBL é produzida no fígado e pertence a família das colectinas [4]. Com múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos, pode se ligar a grupos de açúcares presentes nas superfícies de diversos microorganismos, como um antígeno do sorotipo predominante do *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) que reside em um polissacarídeo rico em manose, e desse modo fornece a primeira linha de defesa do organismo [11,12]. Quando a MBL se liga à bactéria, interage com serino proteases derivadas do plasma, conhecida como MBL associada à serino proteases (MASPs) e essa interação resulta na formação do complexo MBL. Essa interação é análoga à interação do fator do complemento C1q com os fatores C1s e C1r que dão início a via clássica de ativação do sistema complemento. O complexo MBL com MASP e o carboidrato sobre as bactérias interagem com C4, dessa forma ativam a via clássica do complemento independente de um anticorpo (via MBL), sugerindo-se que MBL pode agir diretamente como uma opsonina [4].

Os genes das colectinas humanas estão todos situados no cromossomo 10 (q21-24). Existem dois genes MBL, no entanto MBL-1 é um pseudogene e só MBL-2 codifica uma proteína como produto. O gene da MBL humana está localizado no braço q11.2-q21 que codifica um produto protéico chamado de MBL-2 e compreende 4 exons e 3 íntrons. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região colagenosa, enquanto o exon 2 codifica o restante da região colagenosa. O exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como “neck” e o exon 4 o CRD (Domínio de Reconhecimento de Carboidrato) [13].

A deficiência de MBL pode estar relacionada com variações genéticas. Alguns polimorfismos têm sido registrados na literatura: três mutações no exon 1 do gene MBL2 (códon -52, -54, e -57) podem causar modificações estruturais na proteína resultando em baixos níveis séricos. Mutações do gene MBL-2 e níveis séricos danificados têm sido associados com diversas infecções em adultos [14].

O gene da MBL2 apresenta sítios polimórficos bem conhecidos. Três deles estão localizados no exon 1: no códon 54, decorrente da troca da glicina pelo ácido aspártico (alelo B); no códon 57, decorrente da troca da glicina pelo ácido glutâmico (alelo C) e no códon 52, decorrente da troca da arginina pela cisteína (alelo D). O alelo normal para a MBL é o A e a designação usual para os alelos variantes é O [13,15]. Indivíduos que são homozigotos (0/0, onde 0 pode ser B, C ou D) para um alelo mutante produzem

MBL em quantidades indetectáveis por ELISA, enquanto os heterozigotos (A/0) para a mutação possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados com indivíduos homozigotos (A/A) para o alelo selvagem [12].

Tendo em vista a importância da imunidade inata na primeira linha de defesa do organismo contra infecções, este trabalho teve como objetivo verificar se há associação entre a presença do polimorfismo do gene da MBL-2 e a periodontite, utilizando a técnica de biologia molecular PCR em tempo real, em uma população localizada em Recife, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Materiais e métodos

População estudada

Um total de 93 pacientes foram avaliados, sendo divididos em três grupos: periodontite crônica (n=29), periodontite agressiva (n=18) e periodontalmente saudáveis (n=46). A amostra foi selecionada de forma randômica de acordo com a demanda da clínica de especialização em Periodontia da Universidade Federal de Pernambuco. O exame clínico foi realizado no período de janeiro a novembro de 2009, por um examinador previamente calibrado, usando uma sonda milimetrada tipo Carolina do Norte - PC15 (Trinity® - São Paulo, SP, Brasil) onde seis sítios por dente foram avaliados (distovestibular, mediovestibular, mesiovestibular, distolingual, mediolingual e mesiolingual), bem como dados de profundidade e sangramento à sondagem, nível de inserção clínica, placa dental e número de dentes presentes. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 389/07) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, após a explicação dos objetivos do trabalho.

Todos os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios definidos pela American Academy of Periodontology (AAP). [2,7]

Crítérios de Inclusão:

- apresentar pelo menos 20 dentes naturais, não ter realizado tratamento periodontal nos últimos seis meses

Crêterios de exclusão:

- estar gr vada ou lactante; não apresentar nenhuma condição sist mica que interferisse no curso da doença periodontal (diabetes, hipertensão, doenças auto-imunes, entre outras; ser fumante; ser portador de HIV; fazer uso de aparelho ortodôntico; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica [2].

Extração do DNA

Realizou-se a coleta das células de descamação da mucosa oral com escovas do tipo cytobrush (Kolplast  – São Paulo, SP, Brasil), posteriormente imersas em 1 ml de solução salina de cloreto de sódio (Laboratory Tayuyna Ltda – Nova Odessa, SP, Brasil). O material coletado foi armazenado em freezer a – 20 . Para extração e purificação de DNA, utilizou-se o kit Geneclean , (GENECLEAN  Kit, BIO 101, La Jolla, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Genotipagem

A detecção do polimorfismo do gene MBL2 foi feita pela técnica da PCR em tempo real (Q-PCR) e análise da temperatura de *melting*. A genotipagem foi realizada utilizando-se os seguintes primers desenhados com o software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): primer “forward” 5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3' e primer “reverse” 5'-CAGAA CAGCCCAACACGTACCT-3'. As reações de amplificação foram processadas com um volume final de 25  l, contendo 12,5  l 1X SYBR Green (**SYBR Green 1-Step QRT-PCR - Kit para 200 reações – LGC Biotecnologia**), 1,0  l do primer “forward” 10Mm, 1,0  l do primer “reverse” 10mM e 3  l de DNA gen mico. Os ciclos apresentaram as seguintes condições: aquecimento inicial a 95  C por 10 min, seguido de 45 ciclos com etapas de 95  C por 30 s, 60  C por 1 min. Após o final da PCR, foi promovido um aquecimento lento e gradativo de 60  C para 95  C com acréscimo de 0,2 C a cada 8 segundos para obtenção dos perfis das curvas de *melting*, utilizando como plataforma o software de dissociação do Rotor Gene Q (Qiagen Sample and Assay Technologies, Duesseldorf, Germany)[17].

A avaliação da temperatura de *melting* auxiliou a distinguir os perfis de *melting* dos três genótipos do gene MBL (AA, A0 e 00). As temperaturas de *melting* são as seguintes: A/A (um pico de $83.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$), A/0 (dois picos de 82.6 ± 0.3 e $80.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$), e 0/0 (um pico de $81.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$)[14] (Figura 1).

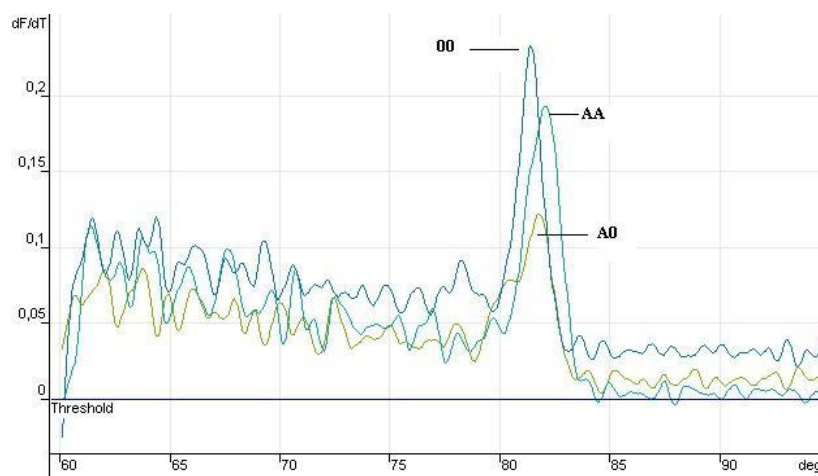


Figura 1. Comparação entre as curvas de *melting* dos três padrões utilizados na genotipagem do gene MBL-2

A genotipagem foi realizada sobrepondo a curva de *melting* dos pacientes com a curva de *melting* de três amostras controles: uma selvagem, uma mutante e uma heterozigota. Quando existia uma sobreposição dessas curvas era possível inferir sobre o genótipo em questão.

Análise Estatística

As frequências genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg. O intervalo de confiança foi de 95%, então apenas valores de “p” menores do que 0,05 foram aceitos. Acima desse valor, o resultado era considerado sem significância. O “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 15.

Resultados

A idade dos indivíduos foi de 25,8 anos, em média, no grupo de pacientes saudáveis periodontalmente, e de 35,6 anos entre os pacientes portadores de periodontite (sendo 25,8 anos a média de idades dos pacientes com a forma agressiva e 41,8 anos a média dos portadores da forma crônica da doença periodontal). Com relação ao sexo, 31% da amostra foi composta por homens (n=29) e 69% por mulheres (n=64).

O estudo da associação do polimorfismo do gene da MBL2 e a doença periodontal está representado na Tabela 1. As frequências dos polimorfismos revelaram que 52,2% dos pacientes periodontalmente saudáveis apresentaram o genótipo do tipo “AA” e 49% dos pacientes com a doença periodontal. O genótipo “A0” estava presente em 45,7% dos pacientes sem periodontite e em 42,5% dos indivíduos com periodontite. Com relação ao genótipo “00”, foi observado em 2,2% dos pacientes sem doença periodontal e em 8,5% dos indivíduos periodontalmente comprometidos. Os dados mostraram-se estatisticamente significantes.

Entre os pacientes que apresentavam doença periodontal, 22,2% dos portadores da forma agressiva apresentaram o genótipo do tipo “AA” contra 65,5% dos pacientes com a forma crônica. O genótipo “A0” estava presente em 55,6% no grupo da periodontite agressiva e em 34,5% do grupo da periodontite crônica. Em 22,2% dos indivíduos com periodontite agressiva foi relatado o genótipo “00”, não havendo portadores desse genótipo entre pacientes com periodontite crônica (Tabela 2).

As tabelas 3 e 4 revelam a frequência alélica da amostra. Os dados revelaram que 50% dos pacientes com periodontite agressiva apresentaram o alelo mutante, contra 25% dos pacientes periodontalmente saudáveis e 17,2% daqueles com periodontite crônica, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Discussão

Baixos níveis séricos de lectina de ligação à manose (MBL) estão associados a um aumento da susceptibilidade à infecção recorrente e três variações do gene da MBL causam baixa produção da proteína [15]. No presente estudo, foi investigada a associação entre a presença do polimorfismo do gene da MBL em pacientes com periodontite quando comparados a pacientes periodontalmente saudáveis.

A MBL é traduzida pelo gene *mbl2* e indivíduos homozigotos para o tipo selvagem são denominados A/A, correspondendo a aproximadamente 60% da população. A deficiência funcional de MBL (baixos níveis de MBL) é causada por mutações do éxon 1 do gene *mbl2*. A nomenclatura A/0 é usada para indivíduos heterozigotos, representada por 30% a 40% da população e pode ter redução moderada nos níveis de MBL. A nomenclatura 0/0 é utilizada para indivíduos homozigotos, que correspondem a 5% a 10% da população com redução moderada ou severa nos níveis de MBL [16-18]. Esta investigação demonstrou que o genótipo selvagem esteve mais

presente em pacientes com periodontite crônica e o genótipo mutante (heterozigoto e homozigoto) apareceu com maior prevalência em indivíduos com a forma agressiva da periodontite, resultados semelhantes aos encontrados por outros autores [17-19]. Os resultados não corroboram com os achados de Arraes et al. [20] que relataram baixa porcentagem de heterozigotos mutantes e alta porcentagem de homozigotos selvagens.

Os resultados deste estudo evidenciaram que a presença de genótipos heterozigotos e homozigotos mutantes foram encontrados em maior número em portadores de periodontite agressiva, enquanto pacientes com a forma crônica tiveram uma maior presença do genótipo homozigoto selvagem. Resultados similares foram encontrados por outros autores [21,22] quando estabeleceram a presença do genótipo mutante em pacientes com periodontite quando comparados a controles saudáveis. Na presente investigação também foi demonstrada que a frequência do alelo mutante (0) foi mais acentuada em portadores de periodontite agressiva, sugerindo assim a associação entre o polimorfismo da MBL com a forma agressiva da periodontite.

Estudos realizados com pacientes diabéticos não relacionaram o polimorfismo do gene MBL2 à doença periodontal. Araújo et al. [23], em um levantamento numa população brasileira com 100 voluntários, encontraram o genótipo mutante A/0 em 54,1% dos pacientes diabéticos com periodontite contra 53,8% daqueles sem a doença periodontal. O alelo mutante “0” esteve presente em 27% dos pacientes de ambos os grupos (com e sem periodontite). Em outro levantamento realizado no ano de 2008 [24], 50 indivíduos foram examinados e o genótipo mutante foi constatado em 56,7% pacientes com periodontite e em 45% dos periodontalmente saudáveis. Dos pacientes com periodontite, 28,3% apresentaram o alelo mutante “0” contra 22,5% do grupo saudável.

Dois estudos avaliaram a relação entre os níveis plasmáticos da MBL e a doença periodontal. Maffei et al. [4] não encontraram associação entre o nível plasmático da MBL e a doença periodontal quando comparados pacientes saudáveis e pacientes com periodontite. Também não houve relação dos níveis de MBL com a severidade da doença periodontal, resultado similar ao encontrado por Louropoulou et al. [22].

Com relação à frequência alélica, indivíduos com periodontite agressiva apresentaram uma maior porcentagem do alelo mutante (0) quando comparados aos outros grupos. Em outro levantamento, Tsutsumi et al. [25] encontraram associação entre o alelo mutante e a severidade da periodontite.

A presente investigação teve como desvantagem um pequeno número de indivíduos por grupo e estudos genéticos apresentam uma dificuldade com relação à variação genética em diferentes grupos étnicos. Neste estudo, apenas Brasileiros do nordeste do país foram avaliados.

Os dados obtidos por esse estudo mostraram uma associação significativa entre a presença do polimorfismo do gene da MBL e a periodontite agressiva em uma população brasileira.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela FACEPE (*Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco*)

Referências

1. American Academy of Periodontology: **Diagnosis of periodontal diseases – position paper.** *J Periodontol* 2003,74:1237-1247.
2. American Academy of Periodontology: **Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support.** *J Periodontol* 2000, 71:853-855.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Cugni MA, Smith C, Kent Jr. RL: **Microbial complexes in subgingival plaque.** *J Clin Periodontol* 1998,25:134-144.
4. Maffei G, Brouwer N, Dolman KM, van der Velden U, Roos d, Loos BG: **Plasma levels of mannan-binding lectin in relation to periodontitis and smoking.** *J Periodontol* 2005, 76:1881-1889.
5. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS: **Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions.** *Periodontol 2000* 1997, 14:216-248.
6. Nagy RJ, Novak KF: **Periodontite agressiva.** In *Periodontia clínica*. 9th edition. São Paulo: Newman, Takei, Carranza; 2004: 363-368
7. American Academy of Periodontology: **Parameter on aggressive periodontitis.** *J Periodontol* 2000, 71:867-869
8. Meyer J, Lallam-Laroye C, Dridi M: **Aggressive periodontitis – what exactly is it ?** *J Clin Periodontol* 2004, 31:586-587.
9. Page RC, Kornman KS: **The pathogenesis of human periodontitis: an introduction.** *Periodontol 2000* 1997, 14:9-11.
10. Dommett RM, Klein N, Turner MW : **Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.** *Tissue Antigens* 2006, 68:193-209.
11. Zambon JJ, Slots j, Miyasaki K et al: **Purification and characterization of the serotype c antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.** *Infect Immun* 1984, 44:22-27.
12. Califano JV, Schenkein HA, tew JG: **Immunodominant antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a and c in high-responder patients.** *Oral Microbiol Immunol* 1991, 6:228-235.
13. Turner MW: **The role of mannose-binding lectin in health and disease.** *Mol Immunol* 2003,40:423-429.
14. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW: **Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults.** *Lancet* 1995, 345:886-889.

15. Garred PHO, Madsen HO, Balslev U: **Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin.** *Lancet* 1997, 349:236-240.
16. Kalil AC: **Can Serum Mannose-Binding Lectin Levels Aid with the Diagnosis of Invasive Aspergillosis?.** *CID* 2009, 49:1492-5.
17. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG: **Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population.** *Scand J Immunol* 2000, 51(2):111-22
18. Mead R, Jack D, Pembrey M, Tyfield L, Turner M: **Mannose-binding lectin alleles in a prospectively recruited UK population.** *Lancet* 1997, 349:1669-70.
19. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A: **Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein.** *J Immunol* 1995, 155(6):3013-20.
20. Arraes LC, Souza PR, Bruneska D: **A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children.** *Braz J Med Biol Res* 2006, 39:719-723.
21. Sato N: **Effect of Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism in Patients with Aggressive Periodontitis.** *Journal of Meikai University School of Dentistry* 2005, 33:173-181.
22. Louropoulou A, Schoenmaker T, Catsburg A, Savelkoul PHM, Loos BG: **Mannose-binding lectin gene polymorphisms in relation to periodontitis.** *J Clin Periodontol* 2008, 35:923-930.
23. Araujo N, Souza PRE, Cimões R: **Associação do polimorfismo genético da lectina de ligação da manose (mbl) e a doença periodontal em diabéticos.** Tese de Mestrado, UFPE (2008)
24. Araújo NC, Bello DMA, Souza PRE, Cimões R: **Association of Polymorphism of the MBL2 Gene in Type 2 Diabetic Patients with Periodontitis: A Preliminary Study.** *Acta Stomatol Croat* 2009, 43(4):290-300.
25. Tsutsumi A, Kobaiashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I, Yoshie H, Sumida T: **Manose binding lectin gene polymorphism and the severity of chronic periodontitis.** *J Clin Immunol* 2009, 32:48-52

TABELAS

Tabela 1 – Associação do polimorfismo do gene da MBL2 e a doença periodontal

Genótipo	<i>Pacientes Saudáveis</i>		<i>Pacientes portadores de Periodontite</i>		Valor de p
	n	%	n	%	
AA	24	52,2	23	49	p ⁽¹⁾ =0,002*
A0	21	45,7	20	42,5	
00	1	2,2	4	8,5	
Total	46	100	47	100	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste qui-quadrado.

Tabela 2 – Associação do polimorfismo do gene da MBL2 entre as formas agressiva e crônica da periodontite

Genótipo	Pacientes Saudáveis		Periodontite				Valor de p
			Agressiva		Crônica		
	n	%	n	%	n	%	
AA	24	52,2	4	22,2	19	65,5	p ⁽¹⁾ =0,002*
A0	21	45,7	10	55,6	10	34,5	
00	1	2,2	4	22,2	--	--	
Total	46	100	18	100	29	100	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste qui-quadrado.

Tabela 3 – Frequência alélica entre os grupos estudados

Alelos	<i>Pacientes Saudáveis</i>		<i>Pacientes portadores de Periodontite</i>		Valor de p
	n	%	n	%	
A	69	75	66	70	p ⁽¹⁾ =0,015*
0	23	25	28	30	
Total	92	100	94	100	

(*) : Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste qui-quadrado.

Tabela 4 – Frequência alélica entre os grupos com periodontite agressiva e crônica

Alelos	Pacientes Saudáveis		Periodontite				Valor de p
			Agressiva		Crônica		
	n	%	n	%	n	%	
A	69	72	18	50	48	82,5	p ⁽¹⁾ =0,015*
0	23	25	18	50	10	17,2	
Total	92	100	36	100	58	100	

(*) : Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste qui-quadrado.



APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Associação do polimorfismo do gene da proteína MBL2 em pacientes com periodontite agressiva.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: **Felipe Bravo Machado de Andrade** (Mestrando em Clínica Integrada UFPE). Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Recife-PE. CEP 50670-901. Fone/Fax: 81 21268818 (Secretaria de Pós-graduação da UFPE)

OBJETIVO: Verificar se existe associação do polimorfismo do gene da proteína MBL com a presença de periodontite agressiva em pacientes atendidos no curso de Especialização em Periodontia da UFPE.

METODOLOGIA: Serão avaliados o sangramento, profundidade de bolsa, perda de inserção através de um exame clínico e coleta de sangue do paciente para avaliar o polimorfismo do gene da MBL.

BENEFÍCIO: os participantes receberão orientações para tratar a doença periodontal presente e prevenir sua progressão. Todos os pacientes receberão tratamento periodontal no Curso de Especialização em Periodontia da UFPE.

RISCO: Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de, durante o exame clínico, constrangimento, sangramento gengival e na coleta de sangue, o risco de hematoma e desconforto.

Eu, _____, RG.Nº. _____

Abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo participar desta pesquisa, para o trabalho de pós-doutorado em Odontologia com área de concentração em Periodontia da USP, bem como autorizo toda a documentação necessária, a divulgação e a publicação da mesma, em periódicos científicos, na área de Odontologia.

DIREITOS:

1. A garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso me traga prejuízo;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito por parte da instrução à saúde, em casos de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
5. O compromisso de proporcionar-me informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar a minha vontade de continuar participando;
6. Caso existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tendo ciência do exposto acima, desejo participar da pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

Assinatura da Testemunha

FICHA CLÍNICA

NOME: _____

SEXO: () Masculino () Feminino DATA: _____

IDADE: _____ PROFISSÃO: _____

ESTADO CIVIL: _____

FONE: _____ CEL: _____

RENDIA (salários): _____

HÁBITO DE FUMAR:

() Nunca fumou

() Ex-fumante: _____ (anos que parou)

() Fumante: _____ (quantos por dia)

DIAGNÓSTICO PERIODONTAL:

() Periodontite agressiva localizada

() Periodontite agressiva generalizada

ESCOLARIDADE:

() Não sabe ler ou escrever

() 1º grau incompleto

() 1º grau completo

() 2º grau incompleto

() 2º grau completo

() Universidade incompleta

() Universidade completa

() Pós-graduação

() Não sei

Há alguém na sua família que apresenta o mesmo problema que você?

R - _____

PRESENÇA DE POLIMORFISMO

() Sim

() Não

GENÓTIPO _____

FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____

DATA:_____

[illegible]

SANGRAMENTO

A large grid of 15 columns and 2 rows of squares, with decorative triangular patterns in the top and bottom borders.

PLACA

[illegible]

Instructions for *BMC Molecular Biology* authors



Preparing main manuscript text

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)
- Publicon Document (NB)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format (after you submit your TEX file, you will be prompted to submit your BBL file). If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted DOC/ PDF/TEX/DVI file.

Article types

When submitting your manuscript, you will be asked to assign one of the following types to your article:

[Research article](#)

[Database](#)

[Methodology article](#)

[Software](#)

Please read the descriptions of each of the article types, choose which is appropriate for

your article and structure it accordingly. If in doubt, your manuscript should be classified as a Research article, the structure for which is described below.

Manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Molecular Biology* should be divided into the following sections:

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Background](#)
- [Results](#)
- [Discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [Methods](#) (can also be placed after Background)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#) (if any)
- [Acknowledgements](#)
- [References](#)
- [Figure legends](#) (if any)
- [Tables and captions](#) (if any)
- [Description of additional data files](#) (if any)

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article. For instructions on use, see [below](#).

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

Title page

This should list: the title of the article, which should include an accurate, clear and concise description of the reported work, avoiding abbreviations; and the full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the

background to the research and its aims. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. They may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

This should be divided into subsections if several methods are described.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the authors' contributions and acknowledgements.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the

standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the *BMC Molecular Biology* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

***BMC Molecular Biology* reference style**

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#) (also suitable for Zotero users)
- [Reference Manager](#)

Article within a journal

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

5. Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

6. Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

10. Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells*

and Tissues. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

12. Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

13. **The Mouse Tumor Biology Database**
[<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Microsoft Word template

Although we can accept manuscripts prepared as Microsoft Word, RTF or PDF files, we have designed a Microsoft Word template that can be used to generate a standard style and format for your article. It can be used if you have not yet started to write your paper, or if it is already written and needs to be put into *BMC Molecular Biology* style.

[Download the template](#) (compatible with Mac and Windows Word 97/98/2000/2003/2007) from our site, and save it to your hard drive. Double click the template to open it.

How to use the *BMC Molecular Biology* template

The template consists of a standard set of headings that make up a *BMC Molecular Biology* Research article manuscript, along with dummy fragments of body text. Follow these steps to create your manuscript in the standard format:

- Replace the dummy text for Title, Author details, Institutional affiliations, and the other sections of the manuscript with your own text (either by entering the text directly or by cutting and pasting from your own manuscript document).
- If there are sections which you do not need, delete them (but check the rest of the Instructions for Authors to see which sections are compulsory).
- If you need an additional copy of a heading (e.g. for additional figure legends) just copy and paste.
- For the references, you may either manually enter the references using the [reference style](#) given, or use bibliographic software to insert them automatically. We provide style files for [EndNote](#) and [Reference Manager](#).

For extra convenience, you can use the template as one of your standard Word templates. To do this, put a copy of the template file in Word's 'Templates' folder, normally C:\Program Files\Microsoft Office\Templates on a PC. The next time you create a new document in Word using the File menu, the template will appear as one of the available choices for a new document.

[return to top](#)

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#),

Formats

The following file formats can be accepted:

- **EPS** (preferred format for diagrams)
- **PDF** (also especially suitable for diagrams)
- **PNG** (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

[return to top](#)

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as

supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

[return to top](#)

Preparing additional files

Although *BMC Molecular Biology* does not restrict the length and quantity of data in a paper, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional information. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission process.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Any additional files will be linked into the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name
- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional datafiles should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See additional file 1: Movie1 for the original data used to perform this analysis'.

Formats and uploading

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MOV (QuickTime)
 - MPG (MPEG)
- Tabular data
 - XLS (Excel spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they

will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article

[return to top](#)

Style and language

General

Currently, *BMC Molecular Biology* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

Gene names should be in italic, but protein products should be in plain type.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be sequentially referenced. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Molecular Biology will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on ["Writing titles and abstracts for scientific articles"](#)

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [MedBioWorld](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They can be defined when first used or a list of abbreviations can be provided preceding the acknowledgements and references.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.

- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Molecular Biology* reference format.
- Footnotes to text should not be used.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full.

Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Units

SI Units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa**

Of. N.º 365/2007 - CEP/CCS

Recife, 07 de dezembro de 2007

Registro do SISNEP FR – 167235

CAAE – 0381.0.172.000-07

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 389/07

Título: "Perfil microbiológico de pacientes com periodontite agressiva"

Pesquisador Responsável: Renata Cimões Jovino Silveira

Senhora Pesquisadora :

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 05 de dezembro de 2007.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A

Profa. Renata Cimões Jovino Silveira

Pós-Graduação em Odontologia – CCS/UFPE