

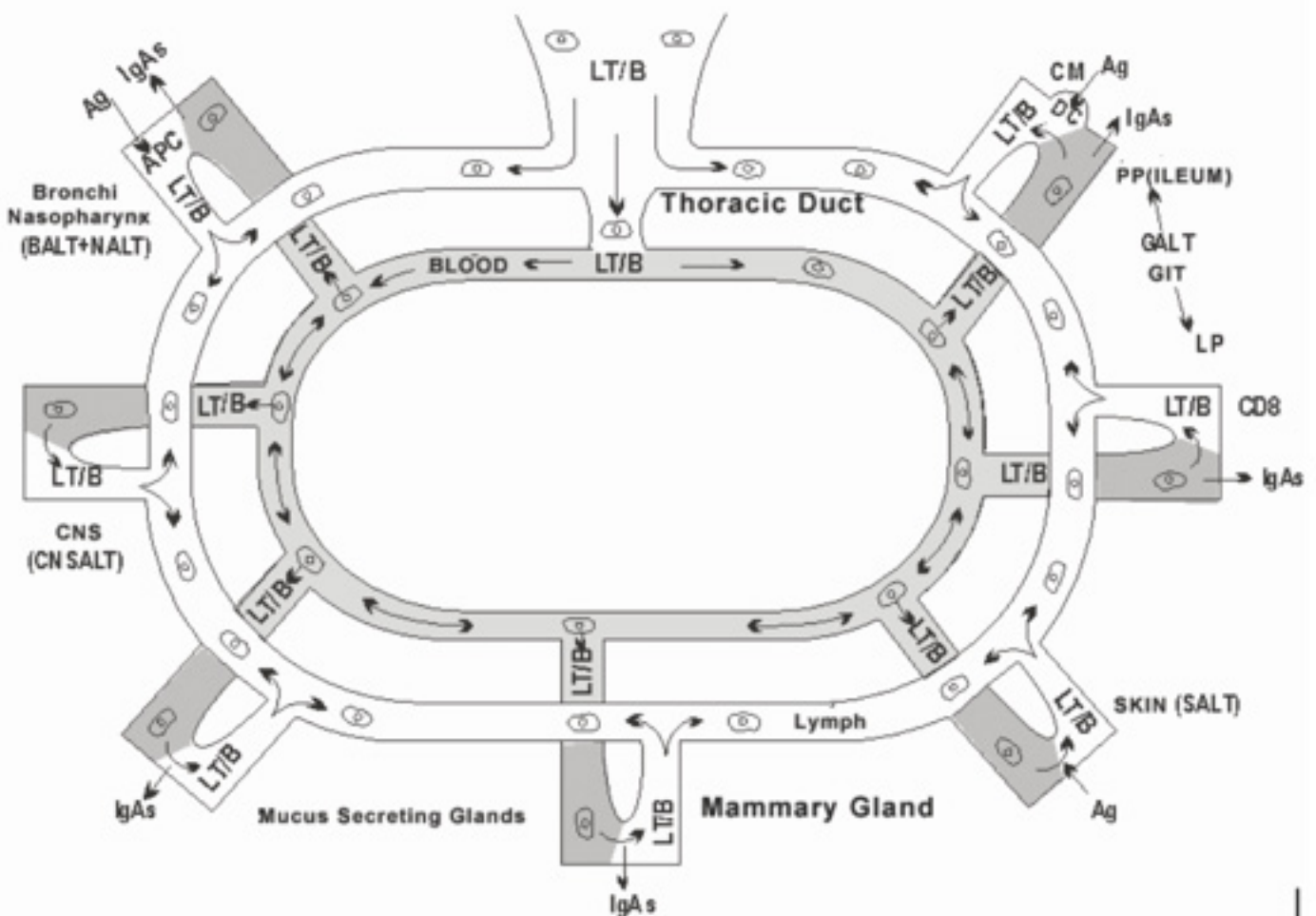
# Journal of FOOD ALLERGY

Official Journal of the Brazilian Society of Food Allergy

Printed Version ISSN 2238-0752

Journal of Food Allergy - Setembro 2013 - Volume 2 - Número 3

## IMUNOPATOLOGIA DA RESPOSTA TH1 E TH2



## EDITORIAL

---

Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Alergia Alimentar - SBAA

## EDITOR-CHEFE

---

Prof. Dr. Aderbal Sabrá  
Universidade Unigrario, Rio de Janeiro, Brasil

## EDITORES CONSULTORES

---

**Katie Allen**  
University of Melbourne, Melbourne, Australia

**Jaime Ramirez Mayans**  
Instituto Nacional de Pediatría, S.S, Mexico

**Joseph A. Bellanti**  
Georgetown University Medical Center, USA

**Jorge Amil Dias**  
Centro Hospitalar S. Joao, Portugal

**Jorge Kalil**  
School of Medicine USP and  
Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

**Giuseppe Iacono**  
Di Cristina Hospital, Italy

**Glenn Furuta**  
Univ. of Colorado Denver School of Medicine,  
USA

**Olivier Goulet**  
University of Paris 5 René Descartes, Paris, France

**John Walker-Smith**  
Emeritus Prof of Paediatric Gastroenterology  
University of London, Londo, United Kingdom

**Marcello Barcinski**  
FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

**Mauro Batista Morais**  
Paulista School of Medicine, Sao Paulo, Brazil

**Simon Murch**  
Warwick Medical School, United Kingdom

**Annamaria Staiano**  
University of Naples, Federico II, Italy

**Maria Del Carmen Toca**  
University of Buenos Aires, Argentina

**Neil Shah**  
Great Ormond Street Hospital  
Institute of Child Health  
University College London, United Kingdom

**Harland Winter**  
Harvard Medical School, USA

---

**Journal of Food Allergy**  
Address: Visconde de Piraja, 330 / 311, 22410-001, Rio de Janeiro, Brazil  
Telephone: + 55 21 2513-2161  
E-mail: [contact@journaloffoodallergy.com](mailto:contact@journaloffoodallergy.com)  
Website: [www.journaloffoodallergy.com](http://www.journaloffoodallergy.com)

## CONTEÚDO

---

Comentário do Editor Aderbal Sabrá.....	021
IMUNOPATOLOGIA DA RESPOSTA TH1 E TH2.....	022

## COMENTÁRIO DO EDITOR

---

O Journal of Food Allergy tem como objetivo primordial publicar artigos originais e de revisão sobre temas da alergia alimentar.

Considerando a escassez de artigos na literatura contemporânea que sistematizam grandes temas sobre a alergia alimentar, este conselho editorial, em trabalho conjunto com a Sociedade Brasileira de Alergia Alimentar, SBAA, adquiriu os direitos de reprodução dos capítulos do livro “Manual da Alergia Alimentar” do Prof. Aderbal Sabrá, de sua segunda edição.

Do volume 1 número 4, de 2012, até o volume 3 número 4, de 2014, apresentamos todas as causas clínicas de alergia alimentar, como aparecem nos respectivos capítulos da segunda edição do livro do Prof Sabra. Deste modo oferecemos aos nossos leitores a totalidade dos temas clínicos que permeiam a alergia alimentar, vistos sob o prisma de uma das maiores autoridades no tema. Em verdade o livro do Prof Aderbal Sabra é único no Mundo, pois não temos hoje nada semelhante na literatura mundial. Na verdade carecemos de especialistas neste tema Alergia Alimentar. Este simples fato justifica a posição de vanguarda tomada pelo conselho editorial do JFA ao solicitar e receber do Prof Aderbal Sabra autorização para expor seus conhecimentos, já publicados e expressos em seu livro, à classe médica internacional.

A primeira parte da segunda edição do livro do Prof Sabra, aquela que descreve os aspectos epidemiológicos e a fisiopatologia da Alergia Alimentar, não apareceram ainda nas páginas do JFA, pois apresentamos até então apenas as doenças que se relacionam com a Alergia Alimentar.

Farta correspondência chegou às nossas mãos desde então, reclamando que apresentássemos os capítulos restantes pois faltam na literatura disponível, trabalhos que sistematizem os aspectos fisiopatológicos da Alergia Alimentar.

JFA está feliz em poder atender aos pedidos de seus leitores e novamente, com aquiescência do autor, Prof Aderbal Sabra, publicar a partir de hoje, em seu primeiro número de 2017, volume 6, nos números de 1 a 4, os capítulos do livro que não foram publicados, todos voltados para o entendimento das bases fisiológicas e patológicas que levam à Alergia Alimentar.

Sequencialmente serão apresentados os temas: 1- Imunologia do desenvolvimento no volume 6 número 1; 2-Imunopatologia Gastrointestinal no volume 6 número 2; 3-Influência do meio ambiente na maturação imunológica- A hipótese higiênica no volume 6 número 3 e 4-Imunopatologia da resposta Th1 e Th2 no volume 6 número 4, encerrando assim uma ampla revisão do tema Alergia Alimentar de autoria do prof Aderbal Sabra.

**Aderbal Sabra, MD, PhD**  
Editor-Chefe  
Journal of Food Allergy

Original Article

**IMUNOPATOLOGIA DA RESPOSTA TH1 E TH2**

Aderbal Sabra1

Os linfócitos Th1 e Th2 não são dois tipos distintos de linfócitos CD4. Na verdade, eles simplesmente representam duas formas polarizadas de linfócitos CD4 altamente heterogêneos. Estes linfócitos se diferenciam principalmente pelos seus produtos, ou seja, as citocinas liberadas por eles durante sua atividade. Aqueles classificados como Th1 são responsáveis pela produção de IL-2, IFN-gama e TNF-alfa, e não produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Os denominados Th2 são caracterizados pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, sem produzirem IL-2, IFN-gama e TNF-alfa.

Atualmente, sabe-se que os linfócitos Th1 e Th2 são provenientes da mesma célula mãe que é conhecida como linfócito Th0. Esta diferenciação ocorre a partir de dois fatores principais: o fator genético (predisposição de cada indivíduo para desenvolver determinada resposta imunológica) e as influências ambientais. Estes fatores podem ser influenciados pelos fatores modulatórios, como: os receptores dos linfócitos (T-cell receptor – TCR), a ativação de moléculas co-estimuladoras, a predominância de uma determinada citocina no ambiente onde está ocorrendo a diferenciação (principal fator modulatório), e o número de divisões celulares pós-ativação. Outro componente que pode ter participação na diferenciação do linfócito é o seu componente genético intrínseco.

Estes fatos dividem a resposta imunológica em dois tempos (Figura 2 – Cap II); no primeiro momento em que há ativação da célula-mãe (linfócito Th0) gerando uma polarização deste em Th1 ou Th2; e no segundo momento os linfócitos polarizados entrarão em contato novamente com o antígeno desencadeando a resposta imune e tendo como consequência manifestações clínicas relacionadas às doenças alérgicas desencadeadas.

Como descrito, o principal fator modulatório responsável pela polarização do linfócito são as citocinas presentes no meio. A IL-12 é de suma importância para o desenvolvimento da via Th1, assim como a IL-4 para a via Th2. Secundariamente, a presença de outras citocinas como o IFN-gama, o TGF-beta e a IL-2 podem também estimular a polarização para a via Th1; assim como a IL-5 estimula a via Th2. Uma vez que estas citocinas entram em contato com o linfócito Th0, inúmeros sinais de transdução e de transcrição são ativados até que o linfócito se transforme em Th1 ou Th2. No linfócito Th1 estes ativadores de transcrição são as moléculas denominadas como STAT4 e o T-bet. No linfócito Th2, as moléculas que participam deste processo são STAT6, GATA3 e C-Maf. A deficiência destas moléculas pode reduzir a polarização de uma destas vias.

Uma vez que os linfócitos encontrem-se polarizados, qualquer novo contato com antígenos, que serão apresentados pelas APCs, irá desencadear resposta imune de acordo com a respectiva polarização (Th1 ou Th2). Quando houver estimulação do linfócito Th2 ocorrerá o que chamamos de resposta humoral. Os linfócitos Th2 liberam citocinas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) que serão responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos (principalmente a IL-5) e pela estimulação do linfócito B (principalmente a IL-4) que produzirá Imunoglobulina E (IgE). Por outro lado, os linfócitos Th1 liberam citocinas (IL-2, IFN-gama, TNF-alfa) que são responsáveis por estimular os linfócitos CD8, dentre outras células e desta forma desencadear a resposta celular.

## O PARADIGMA TH1/TH2 E SUAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS

A diferenciação Th1/Th2 é importante não só para modular o tipo de resposta imune (resposta humoral ou resposta celular), mas permite a sobrevivência do indivíduo e o desenvolvimento de tolerância. Um exemplo disto é a predominância do perfil Th2 durante a vida intra-uterina, que permite a sobrevivência do feto, e o posterior equilíbrio da relação Th1/Th2 durante o primeiro ano de vida.

Devido a estas mudanças na relação Th1/Th2 durante a vida do indivíduo, a exposição à proteínas deve ser cautelosa. Os neonatos, por possuírem um predomínio da resposta imunológica para a via Th2, quando expostos à proteína do leite de vaca, correm o risco de desenvolver uma sensibilização imune ativando a cascata Th2 e tendo como resultado a produção de IgE. Estes eventos no início da vida podem trazer consequências em longo prazo, comprometendo o desenvolvimento de tolerância até que o sistema Th1 possa equilibrar a equação e, com isto, tornar o indivíduo menos susceptível à manifestações alérgicas.

## A RELAÇÃO TH1/TH2 E A ALERGIA ALIMENTAR

Baseado nas alterações imunes descritas anteriormente é possível construir uma provável explicação para as expressões clínicas da Alergia Alimentar (AA), dentre as quais a AA mediada por IgE, a AA não-mediada por IgE e a AA de Mediação Mista. A manifestação clínica da AA é o resultado da alteração imunológica mediada pela interação de antígenos alimentares com elementos dos tecidos linfóides associados à mucosa (Sistema MALT) nos órgãos-alvo. Isto, em última análise, será modulado pela relação Th1/Th2.

Na tabela 1 são apresentadas as desordens clínicas associadas a AA de acordo com seus mecanismos de mediação e classificadas em concordância com o Sistema MALT e com o órgão afetado.

Mecanismo Imunológico	Sistema MALT Afetado	Órgão-Alvo	Desordem Clínica
<b>IgE (humoral)</b>	GALT	Trato Gastrointestinal	Anafilaxia; Hipersensibilidade GI imediata; SÃO
	SALT	Pele	Urticária; Angioedema
	NALT	Nasofaringe	Rinite; Sinusite; Otite
	BALT	Trato Respiratório	Broncoespasmo; Asma
<b>Não-IgE (celular)</b>	GALT	Trato Gastrointestinal	Doença Celíaca; Enteropatia do LV; Enterocolite, Proctocolite e Proctite induzida pela proteína dietética; Colite do Leite Materno;
	SALT	Pele	Dermatite Herpetiforme
	BALT	Trato Respiratório	Síndrome de Heiner
	CNSALT	SNC	Distúrbios do Comportamento
<b>Mediação Mista - (IgE e Não-IgE)</b>	GALT	Trato Gastrointestinal	Esofagite eosinofílica; Gastroenterite eosinofílica; RGE; Dispepsia; Pseudo-obstrução; Constipação
	SALT	Pele	Dermatite Atópica
	BALT	Trato Respiratório	Asma Brônquica induzida pela AA

TABELA 1. CAUSAS DE AA DE ACORDO COM A MEDIAÇÃO IMUNOLÓGICA.

MALT = Tecido Linfóide Associado à Mucosa; GALT = Tecido Linfóide Associado à Mucosa Gastrointestinal; SALT = Tecido Linfóide Associado à Pele; NALT = Tecido Linfóide Associado à Nasofaringe; BALT = Tecido Linfóide Associado à Mucosa Brônquica; CNSALT = Tecido Linfóide Associado ao Sistema Nervoso; GI = Gastrointestinal; LV = Leite de Vaca; SAO = Síndrome de Alergia Oral; RGE = Refluxo Gastroesofágico.

## DESORDENS MEDIADAS POR IGE

As desordens mediadas por IgE se manifestam em quatro sistemas: o GALT, o SALT, o BALT e o NALT. Em cada um destes sistemas observaremos sintomas específicos de acordo com o órgão-alvo afetado. O envolvimento generalizado pode acontecer, desencadeando um processo de anafilaxia à antígenos alimentares. O exercício pode também levar a reação alérgica mediada por IgE em qualquer órgão ou sistema podendo também originar anafilaxia por reação alérgica sistêmica.

A alergia mediada por IgE caracteriza-se pelo seu alto potencial de especificidade. Isto é devido à participação da imunoglobulina que no seu processo de produção promove uma decodificação desta imunoglobulina a um epítipo específico. Trata-se também de uma alergia de curta memória, quando comparada àquela produzida pela via Th1.

### a) Sistema GALT

A Hipersensibilidade Gastrointestinal Imediata é uma reação que se desenvolve de minutos a duas horas depois da exposição do TGI ao antígeno efetor. Clinicamente o indivíduo apresentará, náusea, vômitos, dor abdominal e diarreia. Outra desordem que pode ser manifesta no sistema GALT é a Síndrome de Alergia Oral, em que os sintomas estão confinados à boca e à orofaringe. Os sintomas mais frequentes são: o prurido auricular, o angioedema de lábios, língua e palato, e “inchaço” na garganta.

### b) Sistema SALT

A urticária aguda e o angioedema são típicas manifestações da AA Mediada por IgE. Estas são manifestações que podem persistir por muitos dias e tipicamente têm um padrão migratório.

### c) Sistema BALT

Embora a asma induzida por inalantes seja a mais frequente desordem mediada por IgE do trato respiratório, a AA também pode desencadear o agravo através da ativação do sistema BALT após a proteína alimentar ter sido ingerida e processada. Os principais sintomas manifestos são o broncoespasmo e a secreção das vias aéreas superiores.

### d) Sistema NALT

Assim como no sistema BALT, os antígenos podem ser inalados ou ingeridos para desencadear o processo. Nestes pacientes, as manifestações se restringem ao trato respiratório superior se manifestando através das rinites, sinusites e otites.

## DESORDENS NÃO-MEDIADAS POR IGE

As Desordens não-mediadas por IgE são mediadas pela via Th1. Por este motivo também são conhecidas como Alergias Mediadas por Th1. Neste processo, como já é sabido, há o desenvolvimento de uma resposta celular, e por este motivo, este tipo de alergia é caracterizada por não ter uma especificidade muito grande, contudo possui um grande potencial de memória imunológica.

### a) Sistema GALT

Doença Celíaca, Enteropatia do Leite de Vaca, Enterocolite, Proctocolite e Proctite induzidas pela Proteína Dietética e Colite do Leite Materno são as manifestações clínicas mais comuns da AA não-Mediada por IgE no Sistema GALT. Os sintomas do trato gastrointestinal incluem diarreia que geralmente contém muco e ocasionalmente contém sangue. As estrias de sangue alarmam as mães que amamentam seus filhos. Estes sintomas são produzidos pelos linfócitos Th1 ativados e pelos linfócitos T CD8.

A Doença Celíaca é gerada por uma reação alérgica a gliadina (fração protéica contida no trigo) que provoca uma ativação dos linfócitos Th1 que liberam grandes quantidades de IFN-gama e IL-2, tanto nos tecidos, quanto na circulação sanguínea. Além disso, há influência dos linfócitos TCD8 citotóxicos na perpetuação do processo inflamatório. Em última análise, a ativação do sistema imune desencadeará um processo inflamatório crônico que resulta em atrofia vilositária, perda da capacidade absorptiva e hiperplasia de criptas, na mucosa intestinal.

A Enteropatia do Leite de Vaca é uma enteropatia do primeiro ano de vida. É uma desordem não-IgE classicamente mediada pelo linfócito T, entretanto pode haver uma participação do linfócito B, que pode comumente ser visto na lâmina própria intestinal.

A Colite do Leite Materno, a Enterocolite, a Proctocolite e a Proctite induzidas pela Proteína Dietética são caracterizadas pela presença de sangue nas fezes em bebês saudáveis em aleitamento materno. Acredita-se que as proteínas ingeridas pela mãe, ou diretamente pelas crianças causem estas desordens não-mediadas por IgE nos lactentes. Como nas outras desordens onde há predominância dos linfócitos Th1, observamos um aumento das citocinas IL-2 e IFN-gama.

b) Sistema SALT

A dermatite Herpetiforme é a manifestação de pele da alergia mediada por células. Existe uma grande associação entre este agravo e as manifestações inflamatórias gastrintestinais da Doença Celíaca.

c) Sistema BALT

A Síndrome de Heiner é uma manifestação de doença pulmonar crônica induzida por antígenos alimentares, que evoluiu clinicamente para a hemossiderose pulmonar. É uma patologia rara na infância que deve ser suspeitada nos casos de hemoptise associada a infiltrado pulmonar persistente.

d) Sistema CNSALT

Vários estudos têm mostrado uma ligação entre Hiperatividade, Déficit de Atenção, Hiperplasia Nodular Linfóide e AA não-mediada por IgE. Acredita-se que nestes casos o linfócito ativado faria um "homing" para o Sistema Nervoso Central e promoveria estas alterações.

#### DESORDENS DE MEDIAÇÃO MISTA

Nestas desordens existe participação de componentes Th2 e Th1, portanto, as duas classes de linfócitos estão envolvidas.

a) Sistema GALT

A Gastroenterite Eosinofílica e a Esofagite Eosinofílica são desordens caracterizadas pela infiltração de eosinófilos no esôfago, no estômago e na parede intestinal. Estas patologias apresentam-se com clínica de sintomas persistentes no órgão afetado, refratárias aos tratamentos convencionais na dependência do grau de infiltração eosinofílica na parede do órgão.

b) Sistema SALT

A dermatite atópica com comprometimento na pele, localizado ou difuso é uma manifestação comum da AA engatilhada por ambos mecanismos. É uma condição complexa de difícil controle que muitas vezes melhora espontaneamente por volta dos 2 a 4 anos de idade, momento em que há um importante amadurecimento do sistema imune.

c) Sistema BALT

A asma é classicamente uma desordem mediada por IgE. Contudo, em alguns casos, esta pode ser mediada por mecanismo misto. Nestes pacientes há um elevado risco de deflagração de anafilaxia.

Após esta breve introdução, faremos nos capítulos seguintes um detalhamento de cada uma das condições patológicas descritas anteriormente.



LEITURA RECOMENDADA

- Abbas AK, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
- Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:253-7.
- Ng TW, Holt PG, Prescott SL. Cellular immune responses to ovalbumin and house dust mite in egg-allergic children. *Allergy* 2002; 57:207-14.
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21:479-83.
- Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:395-400.
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:9-18.
- Sabra A, Bellanti JA, Malka-Rais J, et al. IgE and non-IgE food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90(suppl 3):71-76.
- Sampson HA, Anderson JA. Summary and recommendations: classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30(suppl):S87-S94.
- Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, et al. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:24-34.
- Wittmann M, Alter M, Stünkel T, et al. Cell-to-cell contact between activated CD4+ T lymphocytes and unprimed monocytes interferes with a Th1 response. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:965-73.

Submitted for publication: 27/10/2017

Accepted: 28/10/2017

Correspondence address:

Rua Visconde de Pirajá, 330 Gr. 308 – Ipanema – RJ

CEP: 22.410-003

E-mail: [aderbalsabra@globo.com](mailto:aderbalsabra@globo.com)

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

**Submission Manuscripts:** should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the e-mail [submission@journalfoodallergy.com](mailto:submission@journalfoodallergy.com). There is no page limit. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review.

### Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis) and are not currently under consideration by another other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to editor.

### Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and—if not rejected right away—by peer reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors. Article Processing Charges Journal of Food Allergy is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors.

**Title and Authorship Information:** the following information should be included: 1-Paper title 2-Full author names 3-Full institutional mailing addresses 4-Email addresses

**Abstract:** the manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

**Introduction:** this section should be succinct, with no subheadings.

**Materials and Methods:** this part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

**Results and Discussion:** this section may each be divided by subheadings or may be combined.

**Conclusions:** this sections should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

**Acknowledgments:** all acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

**References:** authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., "as discussed by Smith [9]"; "as discussed elsewhere [9, 10]"). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

**General Considerations Related to References:** although references to review articles can be an efficient way to guide readers to a body of literature, review articles do not always reflect original work accurately. Readers should therefore be provided with direct references to original research sources whenever possible. On the other hand, extensive lists of references to original work on a topic can use excessive space on the printed page. Small numbers of references to key original papers often serve as well as more exhaustive lists, particularly since references can now be added to the electronic version of published papers, and since electronic literature

searching allows readers to retrieve published literature efficiently. Avoid using abstracts as references. References to papers accepted but not yet published should be designated as “in press” or “forthcoming”; authors should obtain written permission to cite such papers as well as verification that they have been accepted for publication. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as “unpublished observations” with written permission from the source. Avoid citing a “personal communication” unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Some but not all journals check the accuracy of all reference citations; thus, citation errors sometimes appear in the published version of articles. To minimize such errors, references should be verified using either an electronic bibliographic source, such as PubMed or print copies from original sources. Authors are responsible for checking that none of the references cite retracted articles except in the context of referring to the retraction. For articles published in journals indexed in MEDLINE, the ICMJE considers PubMed the authoritative source for information about retractions. Authors can identify retracted articles in MEDLINE by using the following search term, where pt in square brackets stands for publication type: Retracted publication [pt] in PubMed.

**Reference Style and Format:** the Uniform Requirements style for references is based largely on an American National Standards Institute style adapted by the NLM for its databases. Authors should consult NLM’s Citing Medicine for information on its recommended formats for a variety of reference types. Authors may also consult sample references, a list of examples extracted from or based on Citing Medicine for easy use by the ICMJE audience; these sample references are maintained by NLM. References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the list of Journals Indexed for MEDLINE, posted by the NLM on the Library’s Web site. Journals vary on whether they ask authors to cite electronic references within parentheses in the text or in numbered references following the text. Authors should consult with the journal to which they plan to submit their work.

**Preparation of Figures:** upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

**Preparation of Tables:** tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

**Page-Proofs:** corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

**Copyright:** open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited. The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going

to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Conflict of Interest notification page: to prevent potential conflicts of interest from being overlooked or misplaced, this information needs to be part of the manuscript. The ICMJE has developed a uniform disclosure form for use by ICMJE member journals ([http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf)). Other journals are welcome to adopt this form. Individual journals may differ in where they include this information, and some journals do not send information on conflicts of interest to reviewers. (See Section II. D. Conflicts of Interest.) Ethical Guidelines: new methods and ethically relevant aspects must be described in detail, bearing in mind the following:

1-Human Experiments: all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include: a- A statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject; b- A statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments.

2-Animal Experiments: papers describing experiments on living animals should provide: a- A full description of any anaesthetic and surgical procedure used; b- Evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment; c- Papers describing experiments on isolated tissues must indicate precisely how the donor tissues were obtained.