



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

ELVIA CHRISTINA BARROS DE ALMEIDA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *hBD-1*, *MBL-2*, *IL-6* E *TNF- α*
EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES**

RECIFE
2013

ELVIA CHRISTINA BARROS DE ALMEIDA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *hBD-1*, *MBL-2*, *IL-6* E *TNF- α*
EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES**

Trabalho de Tese apresentado 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 doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a Dr^a Jurema Freire Lisboa de Castro
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Morgana Eli Vianna

RECIFE
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária Mônica Uchoa, CRB4-1010

A447a Almeida, Elvia Christina Barros de.
Análise de polimorfismos dos genes *hbd-1*, *mbi-2*, *il-6* e *tnf-a* em
pacientes com alterações pulpares e perirradiculares / Elvia Christina
Barros de Almeida. – Recife: O autor, 2013.
110 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Jurema Freire Lisboa de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2013.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Polimorfismo genético. 2. Interleucina-6. 3. Fator de necrose
tumoral alfa. 4. Abscesso periapical. 5. Periodontite periapical. I. Castro,
Jurema Freire Lisboa de (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-032)

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *hBD-1*, *MBL-2*, *IL-6* E *TNF- α*
EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES

NOME DO ALUNO(A): Elvia Christina Barros de Almeida

TESE APROVADA EM: 12 de junho de 2013

BANCA:

Profª Drª. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO

Prof. Dr. JEAN NUNES DOS SANTOS

Profª Drª. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

Profª Drª CLÁUDIA CAZAL LIRA

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Profº Drº Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profº Drº Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº Drº Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Profº Drº Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profª Drª Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOCTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Profa.Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof.Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof.Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof.Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Profa.Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof.Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof.Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, primeiramente, por todas as oportunidades, experiências que me proporciona na vida, sejam alegres ou tristes, mas necessárias ao meu adiantamento moral e espiritual. Por seu amor eterno e iluminado, por me conduzir sempre para o caminho do bem, para o caminho da luz.

Ao meu **ANJO DA GUARDA** e meus **BENFEITORES ESPIRITUAIS**, que nos momentos mais difíceis e alegres de toda minha vida, tenho certeza que estão sempre ao meu lado. Dando-me força, coragem e resignação.

Aos meus pais, **ADÃO ALMEIDA E IZAURA BARROS**, por tudo que me proporcionam na vida, pela oportunidade que me deram de estudar, para que eu possa acreditar, lutar e cumprir minha missão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Prof^a Dr^a JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO**, pelo APOIO e INCENTIVO, que desde o início sempre esteve disposta a ajudar-me na realização desta pesquisa, e acima de tudo com sua amizade! Diante das dificuldades no percurso, sempre escutei: “*O SOL VOLTARÁ A BRILHAR!!!*” Muitíssimo obrigada!!!

A **Prof^a Dr^a MORGANA ELI VIANNA**, por ter acreditado em mim, acreditado na idéia da pesquisa, pela FORÇA e APOIO constantes, desde o projeto da pesquisa até agora, e acredito que sempre! Que Deus sempre te abençoe e ilumine em todos os caminhos na vida!!! Só Ele pode retribuir o que fizeste por mim! Nunca vou esquecer: “*SIGA EM FRENTE!!!*” Conte comigo sempre!!! Muitíssimo obrigada!!!

A **Prof^a Dr^a MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COÊLHO**, pela sua ajuda e disponibilidade, que foram fundamentais para realizarmos a parte laboratorial da pesquisa no LIKA/UFPE! Muito obrigada!!!

A **NETÂNIA** e a **VALÉRIA MARANHÃO**, pela ajuda e disponibilidade constantes para fazer a coleta do sangue dos pacientes! Muito obrigada!!!

A **LEIDE**, que cuidava e organizava de todo meu material para os atendimentos aos pacientes, e dava-me força sempre, para continuar na luta! Muito obrigada!!!

Aos **PACIENTES** que foram fundamentais para a realização desta pesquisa, sempre estando dispostos e querendo ajudar! Muito obrigada a todos!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Reitor da Universidade Federal de Pernambuco **Profº Drº ANÍSIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO**.

Ao Vice-Reitor da Universidade Federal de Pernambuco **Profº Drº SÍLVIO ROMERO DE BARROS MARQUES**.

Ao Pró-Reitor da Pós-Graduação **Profº Drº FRANCISCO DE SOUSA RAMOS**.

Ao Diretor do Centro de Ciências da Saúde **Profº Drº NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia **Profª Drª JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO**.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os **PROFESSORES DO DOUTORADO** pelo conhecimento disponibilizado.

A todos meus amigos das duas **TURMAS DO DOUTORADO**, pela ajuda de todos, pelo convívio e, principalmente, pela amizade que fica de cada um.

À **DAYSE VASCONCELOS**, pela ajuda no processamento das amostras na Técnica da qPCR no LIKA/UFPE.

À **RENATA CIMÕES**, por ter me apresentado à Profª Drª Morgana Eli Vianna.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO** em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

“ Tudo o que acontece no Universo tem uma razão de ser.
Nós, como seres humanos só temos uma lição, SEGUIR EM FRENTE ,
com a certeza de que, apesar de, às vezes, estar no escuro, O SOL VOLTARÁ A BRILHAR!”
(Irmã Dulce)

RESUMO

A imunidade inata e a imunidade adaptativa são ferramentas fundamentais de resposta do sistema imune contra a invasão microbiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de polimorfismos nos genes da Beta-defensina-1 (hBD-1), da Lectina de Ligação da Manose 2 (MBL-2), da Interleucina 6 (IL-6) e do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) em pacientes portadores de alterações pulpares e perirradiculares. Foram incluídos no estudo 73 pacientes, sendo divididos em 4 grupos: 13 pacientes com Pulpite Irreversível, 12 pacientes com Abscesso Periapical Agudo, 23 pacientes com Periodontite Apical Crônica e 25 pacientes sem tratamento endodôntico realizado (Grupo Controle). Foi realizada a coleta de sangue dos pacientes e extração do DNA das amostras. A genotipagem dos Polimorfismos de Único Nucleotídeo dos genes da hBD-1, da MBL-2, da IL-6 e do TNF- α foi realizada através da Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados demonstraram que os indivíduos com o genótipo *IL-6* GC possuem 5% menos chance de não ter o quadro clínico de Periodontite Apical Crônica ($p = 0,0113$). Conclui-se que o genótipo *IL-6* (-174G/C) GG mostrou-se associado ao desenvolvimento de alterações perirradiculares crônicas na população estudada. Os Polimorfismos dos genes da hBD1(-44C/G), MBL-2 (codons 52, 54 e 57) e TNF- α (-308) não se mostraram associados ao desenvolvimento de alterações perirradiculares na população estudada. Esta pesquisa sugere que fatores genéticos possam estar relacionados com a susceptibilidade para desenvolver alterações perirradiculares.

Palavras chaves: Polimorfismo genético. Interleucina 6. Fator de necrose tumoral alfa. Pulpite. Abscesso periapical. Periodontite periapical.

ABSTRACT

Innate immunity and adaptive immunity are fundamental tools of immune response against microbial invasion. The aim of this study was to evaluate the presence of polymorphisms in the beta-defensin-1 (hBD-1) of the Mannose-Binding Lectin 2 (MBL-2), Interleukin 6 (IL-6) and Necrosis tumor - alpha (TNF- α) in patients with pulp and periapical changes. The study included 73 patients, divided into 4 groups: 13 patients with Irreversible Pulpitis, 12 patients with Acute Periapical Abscess, 23 patients with Chronic Apical Periodontitis and 25 patients without any endodontic treatment realized (the Control Group) were evaluated. Collecting blood from patients for DNA extraction of samples was performed. The genotyping of the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the genes Beta-defensin 1 (hBD-1), Mannose-Binding Lectin 2 (MBL-2), Interleukin 6 (IL-6), and the tumoral necrosis factor (TNF- α) was realized through the Polymerase Chain Reaction Technique in real time (qPCR). The results demonstrated that individuals with the IL-6 GC genotype possess 5% less chance of not presenting the clinical framework for Chronic Apical Periodontitis ($p=0,0113$). It is to be concluded that the IL-6 genotype (-174G/C) GG showed itself to be associated with the development of chronic periapical alterations in the population studied. The polymorphisms of the genes of hBD1 (-44C/G), MBL-2 (codons 52, 54 e 57) and TNF- α (-380G/A) did not show themselves to be associated with the development of acute and chronic periapical alterations in the population studied. This research suggests that genetic factors are associated with the susceptibility of developing periapical alterations.

Key words: Genetic polymorphism. Interleukin 6. Tumor necrosis factor alpha. Pulpitis. Periapical abscess. Periapical periodontitis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Descrição dos oligonucleotídeos, sequências e perfis térmicos da qPCR.....	67
Tabela 02	Frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes <i>hBD1</i> , <i>IL-6</i> , <i>TNF-α</i> e <i>MBL-2</i> nos pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica	68
Tabela 03	Frequências dos alelos nos genes <i>hBD1</i> , <i>IL-6</i> , <i>TNF-α</i> e <i>MBL-2</i> nos pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva de amplificação referente a amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 GG (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....70
- Figura 2:** Curva de amplificação da amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 CG (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....70
- Figura 3:** Curva de amplificação da amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 CC (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....70
- Figura 4:** Curvas de melting referentes às amostras com os genótipos AA, AO e OO do gene da MBL-2. A imagem que apresenta “pico duplo” refere-se ao genótipo AO (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....71
- Figura 5:** Curva de melting produzidas pela derivada da temperatura e da fluorescência pela temperatura, na análise dos genótipos da IL-6 (GG, CG e CC) (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....71
- Figura 6:** Curvas de melting produzidas pela derivada da temperatura e da fluorescência pela temperatura, na análise dos genótipos do TNF- α (GG, GA e AA) (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).....71

LISTA DE ABREVIATURAS

SNPs	Polimorfismos de Único Nucleotídeo
hBD-1	Beta-defensina humana - 1
MBL-2	Lectina de ligação da manose-2
IL-6	Interleucina 6
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
μ l	Microlitro
μ M	Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MÉTODOS	20
4. REVISÃO DA LITERATURA	24
4.1 MICRORGANISMOS E AS PATOLOGIAS PULPAR E PERIRRADICULAR	25
4.2 DA CÁRIE A PERIODONTITE APICAL	27
4.3 INFECÇÃO ENDODÔNTICA	30
4.4 IMUNIDADE	34
4.5 CITOCINAS	40
4.6 PROTEÍNAS DA IMUNIDADE INATA	44
4.6.1 Beta-defensinas	44
4.6.2 Lectina Ligadora de Manose	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE – ARTIGO - ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES hBD-1, MBL-2, IL-6 E TNF- α EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES	60
Folha de rosto	61
Resumo	62
Introdução	62
Materiais e Métodos	63
Resultados	66
Discussão	72
Conclusões	73
Agradecimentos	73
Referências Bibliográficas	74
ANEXO	77
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética	78
ANEXO B – Normas do periódico - <i>Journal of Clinical Microbiology</i> (JCM)	79

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende em grande parte da eliminação da contaminação microbiana do sistema de canais radiculares, uma vez que os microrganismos desempenham importante papel no desenvolvimento e manutenção das inflamações pulpares e periapicais (KAKEHASHI, STANLEY, FITZGERALD, 1965).

Mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos foram detectadas no interior da cavidade oral, dos quais mais de 50% não foram cultivadas (AAS et al. 2005, SAKAMOTO et al., 2007). Cada indivíduo abriga cerca de 100-200 espécies destas 700 já descritas, sinalizando para uma grande diversidade entre as pessoas (PASTER et al., 2006). Apesar de o dente estar inserido nesta cavidade tão séptica, o espaço endodôntico (câmara pulpar e canal radicular) não contém microrganismos, desde que os revestimentos biológicos, esmalte e cimento estejam preservados (FERRARI & CAI, 2012).

Quando bactérias invadem a polpa dentária, inicia-se um processo inflamatório agudo, inespecífico, ou seja, independente do tipo de agente agressor. Esta resposta tem como objetivo localizar e eliminar o antígeno, remover os tecidos degenerados e preparar a área injuriada para a reparação tecidual (NAIR, 1997).

Quando, no entanto, os agentes biológicos não são retirados, a inflamação pulpar amplia-se e a circulação de retorno compromete-se, o tecido agora necrosado tem enorme potencial de se tornar contaminado. Assim, microrganismos que conseguem ali chegar não encontram resistência imunológica e sim nutrientes, resultando em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (FERRARI & CAI, 2012).

Caso os microrganismos e seus produtos tóxicos não sejam retirados pelo tratamento endodôntico, continuarão agredindo o ligamento periodontal que não terá outra alternativa que não a solicitação de mais células e elementos de defesa, porém, só este espaço do ligamento periodontal não será mais suficiente. Assim, células ósseas clásticas são sinalizadas quimicamente, por meio de macrófagos ativados, os quais liberam mediadores químicos, tais como interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , com a finalidade de reabsorver tecido ósseo, para que mais células do sistema imunológico possam se concentrar formando então a Periodontite Apical ou Lesão Apical (FERRARI & CAI, 2012; VIANNA et al., 2007; MARTINHO, GOMES, 2008; SILVA et al., 2008; MAEKAWA et al., 2011).

Os polimorfismos de uma única base são considerados uma poderosa ferramenta na identificação de genes envolvidos em doenças mendelianas, poligênicas e multifatoriais. Análises de mutações deste tipo vêm sendo usadas com sucesso para um melhor entendimento da patogênese de diversas doenças (MULLIGHAN; MARSHALL; WELSH, 2000). Assim, a tecnologia de genotipagem poderá ser usada em exames para averiguar deficiências genéticas dos pacientes, facilitando a escolha do tratamento adequado para cada indivíduo. Esta terapia teria uma grande vantagem, pois estimularia a resposta imune do próprio indivíduo e apresentaria uma defesa contra vários patógenos, como bactérias, fungos e parasitas (GUIMARÃES, 2007).

Diante do importante papel da imunidade na defesa do organismo contra infecções, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de polimorfismos nos genes da Beta-defensina-1 (hBD-1), da Lectina de Ligação da Manose 2 (MBL-2), da Interleucina 6 (IL-6) e do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) em pacientes portadores de alterações pulpares e perirradiculares.

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores genéticos envolvidos nas alterações pulpaes e perirradiculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 - Detectar a frequência de polimorfismos nos genes da *hBD-1*, *MBL-2*, da *IL-6* e do *TNF- α* ;

4.2.2 - Detectar associações dos polimorfismos nos genes da *hBD-1*, da *MBL-2*, da *IL-6* e do *TNF- α* , com os diagnósticos das alterações pulpaes e perirradiculares.

3. MÉTODOS

Considerações éticas

Esta pesquisa foi realizada em conformidade com as leis atuais do Brasil e cumpriu todos os critérios exigidos pelo Código de Ética Odontológico do Conselho Federal de Odontologia e a declaração de Helsinque (1964), sendo aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo nº 282/10, aprovado em 14 de setembro de 2010, Of. Nº. 244/2010 – CEP/CCS/UFPE - ANEXO 01). Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar da pesquisa de forma livre e voluntária.

Amostra

Foram avaliados 265 pacientes, da Clínica Integrada do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, que necessitavam de tratamento endodôntico, destes 73 pacientes foram incluídos no estudo, sendo divididos em 4 grupos: 48 pacientes foram incluídos nos grupos de estudo, e 25 pacientes, sem tratamento endodôntico realizado, formaram o grupo controle.

Para ser incluído na pesquisa, o paciente deveria apresentar os critérios a seguir: apresentar um dos Diagnósticos Clínico-Radiográfico: Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo ou Periodontite Apical Crônica; idade entre 18 e 65 anos. Como critérios de exclusão: pacientes com alterações sistêmicas; usuário de drogas; pacientes com o sistema imunológico alterado por infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou doenças metabólicas, discrasias sanguíneas, tratamento quimioterápico ou radioterápico e transplante.

Os pacientes do grupo de estudo foram divididos em 3 grupos: Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica. A classificação dos pacientes nos grupos foi baseada nos sinais e sintomas (GUTMANN et al., 2009). No grupo dos pacientes com Pulpite Irreversível, estes apresentavam presença de dor, geralmente, de moderada a grave, espontânea, contínua, persistente, localizada ou difusa. No grupo com Abscesso Periapical Agudo, consistia de indivíduos com sinais e sintomas moderados a severos, que incluíam edema intraoral ou exsudação via canal radicular, ou ambos; inchaço, calor, edema, ocasionalmente febre e/ou linfadenopatia. Dor à percussão vertical, diferentes graus de mobilidade, ausência de sintomatologia ao frio, calor e ao teste elétrico, e no exame radiográfico periapical, havia um ligeiro espessamento do espaço referente ao ligamento periodontal a uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical. No pacientes, que apresentavam Periodontite Apical Crônica, não havia sinais e sintomas como os descritos anteriormente, havia uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical; sem ou com ligeira sensibilidade à percussão vertical; o dente não respondia aos testes térmico e elétrico e o paciente não relatou sintomatologia dolorosa anteriormente. O diagnóstico foi feito em um dente por paciente.

No exame clínico, foi verificada a vitalidade pulpar, através do teste ao frio com o gás refrigerante (*Roeko Endo-Frost*®, Coltène/Whaledent, Ohio, EUA) e ao teste elétrico (*Pulp Tester Digital*®, Odous de Deus, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Uma ficha específica com informações pessoais dos pacientes foi preenchida. Durante os esclarecimentos sobre a pesquisa, foi apresentado aos pacientes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual registraram sua intenção de participar da pesquisa, através da assinatura do Termo.

Nos pacientes dos grupos de estudo, foi realizado o tratamento endodôntico e a coleta do material genético, através da coleta de sangue, com o objetivo de avaliar a presença de Polimorfismos dos genes *hBD-1*, *MBL 2*, *IL-6* e *TNF- α* .

O grupo controle foi formado por pacientes que não apresentavam elementos dentários com tratamento endodôntico realizado, nem alterações sistêmicas. Nos prontuários destes pacientes, foram preenchidos os dados pessoais e os relacionados a sua saúde em geral. Nestes pacientes foi realizada a coleta do material genético, através da coleta de sangue, com o objetivo de avaliar a presença de Polimorfismos nos genes *hBD-1*, *MBL 2*, *IL-6* e *TNF- α* .

Os polimorfismos das proteínas da imunidade inata e das citocinas foram identificados através da PCR em tempo real (qPCR). As técnicas utilizadas através da qPCR foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, PE, Brasil).

Extração do DNA

As amostras clínicas obtidas através da coleta do sangue humano foram colocadas em tubos estéril de 4 mL contendo EDTA, para ser feita a extração do DNA genômico. A técnica utilizada para a extração do DNA foi a de Sambrook & Russell (2001), sendo modificada pela exclusão da proteinase K. Em 400 μ L de amostra de sangue total foram adicionados soluções (300 μ L de Lise de membrana celular - 0,32M Sacarose; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂ 1% Triton-X 0,3% de HCl) e 300 μ L de Lise de núcleo [10 mM Tris (pH = 8,2); 400 mM NaCl; 2mM EDTA]. Esta mistura foi incubada por 1h30 minutos a 55°C. Posteriormente, foi adicionado 300 μ L de fenol equilibrado (pH $\pm$ 8), homogeneizado em vórtex e centrifugado (6500 rpm/15min) por duas vezes. Em outro tubo de 2mL, foi adicionado ao sobrenadante desta centrifugação, isopropanol a 100% (1:1). Em seguida, foi homogeneizado (por inversão, 30x). Esta mistura foi centrifugada (13.000 rpm/15min), em seguida o sobrenadante foi descartado, restando um sedimento no tubo (*pellet*). Este sedimento foi lavado com 200 μ L de etanol a 70% e então novamente centrifugado (13.000 rpm/15min). O sedimento foi ressuspensão com 100 μ L de tampão de reidratação (10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM EDTA, pH 8.0). Após a extração, as amostras armazenadas em temperatura de -20°C. A qualidade do DNA extraído foi avaliado pelo espectrofotômetro *NanoDrop 2000*[™] (Thermo Fisher Scientific - Wilmington, Delaware USA), mostrando-se adequada para análise.

Polimorfismo -44 (G>G) do gen *hBD1*

O gene *hBD1* está localizado no cromossomo 8: 8p23.1-p22. A detecção do polimorfismo do gene da beta-defensina 1 foi realizada pela Técnica de *Harping*, segundo Boniotto et al. (2004), utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), com o *Master Mix Sybr Green 2X* (Ludwig Biotecnologia Ltda, Centro de Biotecnologia da UFRGS, Alvorada, RS, Brasil).

Polimorfismo 54, 57, e 52 do gene *MBL-2*

Os Polimorfismos do gene *MBL-2* estão nos códons 54, 57, e 52, 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). A detecção do polimorfismo do gene da *MBL2* foi identificada através das curvas de Melting, utilizando a qPCR, segundo ARRAES et al. (2006).

Polimorfismo -174 (G>C) do gene *IL6*

A identificação do polimorfismo -174 (G/C) do gene *IL-6* foi realizada pela Técnica *High Resolution Melt* (HRM) – qPCR. Em cada reação utilizou-se *Master Mix 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix* (no ROX) contendo BSA (Albumina Sérica Bovina) (Solis BioDyne®, Tartu, Estônia), 0,7pmol/uL(uM) de cada *primer*, 2 µL de DNA genômico (200ng).

Polimorfismo -308 (G>A) do gene *TNF alfa*

A identificação do polimorfismo -308 (G/A) do gene *TNFα* foi realizada pela Técnica *High Resolution Melt* (HRM) – qPCR. Em cada reação utilizou-se 1x *Master Mix 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix* (no ROX) contendo BSA (Solis BioDyne®, Tartu, Estônia), 0,7pmol/uL(uM) de cada *primer*, 2uL de DNA genômico (200ng).

Para os genes *hBD-1* e *MBL2*, foram utilizados amostras de indivíduos sequenciados e para os genes *IL6* e *TNF-α* foram utilizadas sequências artificialmente construídas para confirmar os polimorfismos, através da técnica HRM. A descrição de todos os oligonucleotídeos dos polimorfismos pesquisados, sequências e perfis térmicos da qPCR estão na Tabela 1. Todos os ciclos de qPCR foram realizados no *Rotor Gene Q* (QIAGEN, Hilden, Germany).

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de cada polimorfismo estudado foi calculado, tanto para os grupos de estudo como para o grupo controle, com auxílio do programa BioEstat 5.3. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* determina a distribuição de genótipos homozigotos e heterozigotos de um polimorfismo em uma determinada população. Neste estudo, os genótipos de cada polimorfismo estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Análise Estatística

As frequências genotípicas foram analisadas para avaliar se as amostras se encontram dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado para *Odds Ratio* (teste de *Mantel-Haenszel*). Esta relação de proporcionalidade foi analisada de acordo com *Odds Ratio* em relação às alterações pulpares/perirradiculares em comparação com indivíduos controles.

O software utilizado para análise dos dados foi o BioStat 5.3, e o alfa adotado foi de 5%.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 MICRO-ORGANISMOS E AS PATOLOGIAS PULPAR E PERIRRADICULAR

O primeiro relato da presença de bactérias em canais radiculares remonta ao século XVII, pelo fabricante amador de microscópios, o holandês Antony van Leeuwenhoek. Em 1697, ele escreveu: *A coroa deste dente estava praticamente toda cariada, suas raízes apresentavam duas ramificações, eram ocas e as cavidades nelas estavam preenchidas com uma matéria amolecida. Eu removi este material dos canais das raízes, misturei com água de chuva limpa e levei ao microscópio para ver se havia tantas criaturas vivas nele quanto eu já tinha observado anteriormente; e devo confessar que todo o material parecia estar vivo.* Entretanto, naquela época, desconhecia-se o papel dos “animáculos” (bactérias) de Leeuwenhoek na indução de doenças. Apenas cerca de 200 anos depois, as suas observações quanto aos canais radiculares foram ratificadas e uma relação de causa e efeito entre bactérias e lesões perirradiculares foi sugerida (SIQUEIRA Jr. et al., 2011).

Isso ocorreu quando Miller, em 1894, relatou a associação entre bactérias e a patologia perirradicular após a análise de material coletado de canais radiculares contendo polpas necrosadas. O estudo bacteriológico foi realizado em 50 dentes com necrose pulpar, e o pesquisador observou formas microbianas diferentes (cocos, bacilos e espiralados) no espaço ocupado por aquele tecido. Ele ressaltou que muitos ali presentes não eram cultiváveis com os métodos disponíveis na época e que diferenças deveriam existir nos distintos terços radiculares (SIQUEIRA Jr. et al., 2011; FERRARI & CAI, 2012).

Todavia, os achados de Miller, embora pioneiros, não eram suficientes para o estabelecimento de uma relação causal entre microorganismos e as patologias de origem endodôntica. Dois eventos que ocorrem simultaneamente não necessariamente representam uma relação de causa e efeito. Cerca de 70 anos após os achados clássicos de Miller, um estudo confirmou definitivamente o papel essencial desempenhado por bactérias na etiopatogenia das doenças pulpares e perirradiculares. Foi apenas com o trabalho de Kakehashi *et al.* (1965) que a importante relação entre bactérias e desenvolvimento de resposta inflamatória periapical ficou demonstrada em estudo envolvendo ratos dotados de microbiota e ratos sem microrganismos (*germ-free*). Os autores expuseram polpas desses animais ao meio bucal, observando a resposta desse tecido por métodos histológicos. Enquanto nos animais convencionais se desenvolveu inflamação grave ou necrose pulpar associada a lesões perirradiculares, nos animais *germ-free* esse tipo de resposta não ocorreu. Na ausência de microorganismos, as polpas de animais *germ-free* se repararam por deposição de dentina neoformada na área de exposição, isolando o tecido pulpar da cavidade oral (FERRARI & CAI, 2012).

Entretanto, em meados da década de 1970, com o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de isolamento e cultivo de anaeróbios estritos, foi gerado um interesse considerável quanto ao papel desses microrganismos na

patogênese das doenças endodônticas. O estudo de Sundqvist (1976) representou um marco na literatura endodôntica, tendo em vista o fato de que seus achados revolucionaram os conceitos vigentes até então. Esse autor avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais de dentes unirradiculares com polpas necrosadas e coroas intactas, sem cáries ou restaurações. A perda da vitalidade pulpar foi resultado de injúria traumática. Não havia doença periodontal, tampouco a existência de fístula. Em 19 dentes foi detectada radiograficamente a presença de lesão perirradicular. Alguns achados mais importantes desse estudo foram: A) bactérias apenas foram encontradas em casos de dentes com lesões perirradiculares associadas. Esse achado confirmou o papel importante desempenhado por bactérias na etiopatogenia dessas lesões, além de ter combatido o conceito de que o tecido pulpar necrosado, mesmo na ausência de microrganismos, fosse um irritante tecidual; B) No total, 88 cepas bacterianas foram isoladas dos 18 canais infectados. Dessas, apenas 5 foram anaeróbias facultativas. Assim, bactérias anaeróbias estritas representaram 94,3% das cepas isoladas. Esse achado modificou o conceito de que os principais patógenos endodônticos eram bactérias facultativas; C) Casos sintomáticos foram diretamente relacionados com um maior número de bactérias no canal; D) O número de espécies no interior dos canais variou de 1 a 12; E) Houve uma correlação positiva entre o tamanho da lesão perirradicular e a densidade e o número de espécies bacterianas presentes no canal. Em outras palavras, quanto maior o diâmetro da lesão perirradicular, maior era o número de células (densidade) e de espécies (complexidade) bacterianas no interior do canal radicular; F) Em 7 casos houve a presença de sinais e sintomas de inflamação aguda perirradicular. Em todos esses casos foi detectada uma espécie do grupo dos bacilos produtores de pigmentos negros, naquela época denominados de *Bacteroides melaninogenicus* (atualmente, membros dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*). Esse foi o 1º estudo a encontrar a associação entre uma determinada espécie bacteriana e algum tipo de sinal ou sintoma de uma doença de origem endodôntica (SIQUEIRA Jr. et al., 2011; FERRARI & CAI, 2012).

À época, as técnicas de cultivo de anaeróbios começaram a ser amplamente empregadas e, em sua pesquisa, tais conhecimentos foram aplicados, resultando na confirmação da existência de população predominantemente anaeróbia estrita, em casos de infecção endodôntica associada à lesão periapical, em dentes não tratados endodonticamente (infecção endodôntica primária ou periodontite apical primária). Até então, a microbiota isolada era somente aeróbia ou anaeróbia facultativa, pois as técnicas para coleta, transporte e isolamento de anaeróbios estritos eram pouco conhecidas (FERRARI & CAI, 2012).

MÖLLER *et al.* (1981) também confirmaram o papel crucial exercido por microrganismos na etiopatogenia de lesões perirradiculares. Esses autores induziram necrose pulpar asséptica ou séptica em dentes de macacos e, após 6 e 7 meses, as análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica evidenciaram que, enquanto nos casos de polpas necrosadas não infectadas os tecidos perirradiculares estavam desprovidos de inflamação e apresentando indícios de reparação, nos casos de dentes contendo polpas infectadas houve sempre o desenvolvimento de lesões perirradiculares. Os estudos citados definitivamente demonstraram a relação causal entre microrganismos e as doenças de origem endodôntica. Estudos moleculares têm evidenciado a presença de bactérias em todos os casos de infecção endodôntica associadas a lesões perirradiculares. Os conceitos então vigentes na atualidade, sustentados por evidências científicas sólidas e irrefutáveis, afirmam que microrganismos exercem um papel-chave no

desenvolvimento das patologias pulpares e perirradiculares e que o tecido pulpar necrosado, na ausência de infecção, não possui a capacidade de estimular, tampouco de sustentar o desenvolvimento de uma lesão perirradicular. Microrganismos colonizando o sistema de canais radiculares estão usualmente organizados em biofilmes. Portanto, as lesões perirradiculares, em regra geral, podem ser incluídas no grupo de doenças causadas por biofilmes bacterianos (SIQUEIRA Jr. et al., 2011).

4.2 Da CÁRIE à PERIODONTITE APICAL

Quando a placa bacteriana é formada sobre a superfície do esmalte e não é mecanicamente removida, pode iniciar-se o processo de desmineralização, como consequência de atividades metabólicas de algumas espécies bacterianas. A evolução natural é a destruição dentinária, o que estimula a formação da dentina esclerosada, a qual tem por finalidade evitar o avanço dos microrganismos e seus subprodutos para dentro do tecido pulpar. No entanto, essa barreira é facilmente destruída pela ação dos irritantes que ali permanecem. Neste momento, a destruição avança pelos tecidos dentais, e a nova barreira a se formar é a dentina reacional, que se constrói em direção ao agressor, diminuindo o volume da câmara pulpar. Caso os microrganismos associados à cárie não sejam adequadamente removidos, a resposta inflamatória instala-se no tecido conjuntivo pulpar. Tal resposta tecidual pode ser de caráter reversível, de reversibilidade problemática ou irreversível e, nesta última, apenas a remoção de todo tecido inflamado, procedimento denominado Pulpectomia, poderá solucionar o dano. Ainda neste momento, a polpa está sem infecção, pois apesar de inflamado, o tecido pulpar apresenta todas as características responsivas de uma estrutura conjuntiva, daí a grande previsibilidade de sucesso no tratamento de polpas vitais. A ausência de microrganismos, tanto no corpo do tecido pulpar quanto a trama dentinária maximizam as possibilidades de reparo (FERRARI & CAI, 2012).

Um dos maiores destaques dentre os agentes agressores da polpa dentária são os microrganismos responsáveis pelo processo de cárie. A velocidade de progressão da cárie influencia na resposta pulpar, que muitas vezes é acompanhada de dor decorrente do processo inflamatório. A inflamação acarreta alterações vasculares fundamentais, como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar, transmigração e quimiotaxia (ESTRELA, 2004).

Alguns aspectos clínicos da inflamação identificam fenômenos caracterizados como sinais cardeais, como dor, rubor, calor, tumor e alteração da função (NEVILLE et al., 2009).

Quando bactérias invadem a polpa dentária, inicia-se um processo inflamatório agudo, inespecífico, ou seja, independente do tipo de agente agressor. Esta resposta tem como objetivo localizar e eliminar o antígeno, remover os tecidos degenerados e preparar a área injuriada para a reparação tecidual. Para isso, uma série de eventos vasculares é iniciada, visando à chegada de células de defesa a região afetada. O aumento da permeabilidade vascular, a quimiotaxia (movimento de células de defesa em direção a uma substância ou mediador) e a exsudação fazem com que neutrófilos e monócitos deixem a corrente sanguínea em direção ao local

afetado. Estas células serão responsáveis pela fagocitose de bactérias, complexos imunes e tecidos degenerados. O processo agudo é rápido, dura de minutos a dois ou três dias e, dependendo da intensidade da agressão, o antígeno será eliminado e os tecidos serão reparados (NAIR, 1997).

Quando, no entanto, os agentes biológicos não são retirados, a inflamação pulpar amplia-se e a circulação de retorno compromete-se, pois os catabólitos produzidos dentro da polpa dental tem dificuldade de drenagem, à medida que os vasos trazendo células e elementos de defesa estão dilatados e a circulação é terminal, envolta por paredes rígidas. Assim, o conjuntivo especializado entra em falência. Então, o tecido agora necrosado tem enorme potencial de se tornar contaminado, pois não mais oferece resistência ao ingresso dos microrganismos e ainda serve como fonte nutricional a eles. Assim, um *habitat* perfeito está construído, um verdadeiro santuário. Nesse momento, bactérias, em geral associadas à lesão da cárie, adentram este espaço e encontram condições de colonização e multiplicação, tais como espaço, temperatura, nutrientes e ausência de defesa do hospedeiro. Inicialmente, as bactérias mantêm-se livres no fluido, estado conhecido como planctônico, e rapidamente se associam, compondo verdadeiras comunidades envoltas por matriz polissacarídica, denominadas biofilme (FERRARI & CAI, 2012).

Essa condição já foi demonstrada tanto por NAIR (1997), em microscopia eletrônica de transmissão, quanto por RICUCCI & SIQUEIRA Jr. (2010), mais recentemente, em microscopia óptica, em cortes histobacteriológicos.

Deve ser ressaltado que, teoricamente, todas as bactérias da cavidade bucal podem invadir o sistema de canais radiculares desprovido de vitalidade, porém, apenas uma pequena fração consegue sobreviver naquele espaço. Fatores como pH, disponibilidade de nutrientes e interações bacterianas são determinantes ecológicos para o estabelecimento deste ecossistema (SUNDQVIST, 1994).

Quando o tecido pulpar se torna necrótico, perde sua circulação e sua capacidade responsiva à agressão biológica. Assim, microrganismos que conseguem ali chegar não encontram resistência imunológica e sim nutrientes, resultando em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Ainda que leveduras e vírus já tenham sido detectados dentro dos canais radiculares, bactérias e seus subprodutos são os principais agentes envolvidos nas alterações pulpares e periapicais (GOMES et al., 2004).

Com o decorrer do tempo, diante de condições adequadas, a população microbiana tende a ocupar o complexo labirinto em que se insere o sistema de canais radiculares, incluindo túbulos dentinários, deltas apicais, istmos e ramificações. Com tal crescimento populacional, produtos tóxicos são gerados, que passam a irritar direta e indiretamente os tecidos perirradiculares. Assim, o conjuntivo ao redor da estrutura dental, definido como ligamento periodontal, para se defender das agressões físicas e/ou químicas, recruta células de defesa, ocupando densamente este espaço, em especial junto às principais saídas do dente [forame(s) apical (is)] e canais laterais, as quais concentram a maior quantidade de irritantes. Caso os microrganismos e seus produtos tóxicos não sejam retirados pelo tratamento endodôntico, continuarão agredindo o ligamento periodontal que não terá outra alternativa que não a solicitação de mais células e elementos de defesa, porém, só este espaço do ligamento periodontal não será mais suficiente. Assim, células ósseas clásticas são sinalizadas quimicamente, por meio de macrófagos ativados, os quais liberam mediadores químicos, tais como interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , com a finalidade de reabsorver tecido ósseo, para que mais

células do sistema imunológico possam se concentrar formando então a Periodontite Apical ou Lesão Apical (FERRARI & CAI, 2012).

Quando os microrganismos colonizam o sistema de canais radiculares e uma inflamação crônica é instalada, há o envolvimento adicional de células imunocompetentes, como os linfócitos T e B, especificamente voltados para a eliminação do agente agressor persistente (NAIR, 1997).

Quando, então, se observa um dente com lesão apical, tecnicamente diagnosticado como Periodontite Apical, o que está sendo visualizado no exame radiográfico deve ser entendido como um aglomerado de células e elementos de defesa, na tentativa de limitar a lesão. Esta representa uma resposta do hospedeiro extremamente positiva, pois, caso tal defesa não fosse elaborada, a disseminação da infecção, para outros órgãos e tecidos, seria um desastre. O epicentro da periodontite apical corresponde sempre a uma grande porta de saída do sistema endodôntico, como forame apical ou canais laterais e a intensidade da resposta inflamatória tem relação direta com a densidade microbiana e a penetração intradentinária. Portanto, quanto maior a lesão apical, maior a carga microbiana presente, e maiores as chances da infiltração microbiana na malha dentinária (FERRARI & CAI, 2012).

Sendo a Periodontite Apical entendida como uma condensação de células de defesa, é muito improvável terem-se microrganismos vivendo no corpo da lesão, pois os mesmos teriam grande dificuldade de sobreviver em meio a tantos “soldados e armamentos” (NAIR, 1987). Dois estudos comprovaram a produção de anticorpos específicos contra patógenos endodônticos em casos de lesão perirradicular associada, o que indica que o hospedeiro elabora uma resposta imune contra microrganismos específicos, que colonizam o sistema de canais radiculares (KETTERING, TORABINEJAD, JONES, 1991; BAUMGARTNER et al., 1992).

NAIR (1987), avaliando microscopicamente 31 dentes extraídos que mantinham a lesão apical apenas ao ápice radicular, observou a diversidade da microbiota dentro do canal radicular, sua intimidade com as paredes dentinárias. A população bacteriana separava-se da lesão apical por uma densa camada de neutrófilos polimorfonucleares ou por um *plug* epitelial junto ao forame.

No entanto, quando microrganismos conseguem adentrar os tecidos perirradiculares, por queda de resistência do hospedeiro ou por procedimentos técnicos do profissional, as células de defesa competentes buscam eliminar os irritantes, desencadeando o quadro clínico de Abscesso Periapical Agudo. Esta condição traduz o momento ideal para uso dos antibióticos, os quais objetivam auxiliar o hospedeiro no controle da infecção extrarradicular, impedindo sua disseminação. Tendo os microrganismos ocupado também uma posição extrarradicular, região abundantemente irrigada, a droga de perfil antimicrobiano alcança facilmente o alvo. Com certeza, a redução da microbiota intracanal também deve ser realizada por procedimentos endodônticos locais, visando combater a causa primária (FERRARI & CAI, 2012).

4.3 INFECÇÃO ENDODÔNTICA

A infecção endodôntica assume uma situação única, diferente da infecção que ocorre em outros sítios do nosso organismo, visto que sedea em área originalmente estéril e agora inacessível às células e aos elementos de defesa, devido à falta de circulação local. Assim sendo, o combate à infecção, contempla ações locais com atuações mecânicas e uso de substâncias químicas, não se restringindo à administração de antibióticos, que em geral é o suficiente no controle de infecção em outros órgãos e tecidos, em conjunto com o sistema imunológico do indivíduo (FERRARI & CAI, 2010).

Mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos foram detectadas no interior da cavidade oral (AAS et al. 2005), e acredita-se que mais de 50% ainda não tenham sido identificadas (SAKAMOTO et al., 2007). Cada indivíduo abriga cerca de 100-200 espécies destas 700 já descritas, sinalizando para uma grande diversidade entre as pessoas (PASTER et al., 2006). Apesar de o dente estar inserido nesta cavidade tão séptica, o espaço endodôntico (câmara pulpar e canal radicular) não contém microrganismos, desde que os revestimentos biológicos, esmalte e cimento estejam preservados (FERRARI & CAI, 2012).

As principais vias de destruição dos tecidos de revestimento são representadas por lesões de cárie, instalação de doença periodontal e traumatismo dental, porém, pode-se incluir a falta de coalescência entre esmalte e cimento e mesmo a via hematogênica, como potentes caminhos à contaminação da cavidade endodôntica. Dentre essas, o estabelecimento da doença cárie é o principal motivador de alterações pulpares e periapicais (FERRARI & CAI, 2012).

A integridade dos revestimentos dentais, tais como esmalte e cimento, atua como verdadeira barreira ao ingresso dos microrganismos às estruturas endodônticas. Assim, quando esmalte e/ou cimento são perdidos por cárie, traumatismo ou mesmo doença periodontal, o tecido pulpar, se não protegido, evolui para necrose e os microrganismos ganham a oportunidade de invadir o sistema endodôntico, via túbulos dentinários, ou mesmo por exposição direta da região desprovida de defesas (BAUMMANN, ESTRELA, 2004).

Teoricamente, qualquer microrganismo da cavidade bucal pode colonizar o espaço endodôntico sem tecido vital, porém um grupo restrito de espécies tem sido identificado nos canais radiculares infectados. A razão para tal ocorrência é o próprio ambiente endodôntico, que é extremamente seletivo em função de fatores ecológicos aí existentes, tais como disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio e interações bacterianas (SUNDQVIST, 1994).

Com o avançar das pesquisas, mais conhecimento foi agregado à microbiota do sistema de canais radiculares e estudos sobre a dinâmica da infecção endodôntica mostraram que, com o decorrer do tempo, há um predomínio de bactérias anaeróbias estritas sobre os microrganismos anaeróbios facultativos (MÖLLER et al., 1981; FABRICIUS et al., 1982).

Tal fato é explicado pelo consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono e hidrogênio pelos colonizadores primários, os anaeróbios facultativos, favorecendo então o crescimento de anaeróbios estritos. Outro fator importante na determinação da microbiota é a presença e qualidade de nutrientes. Inicialmente, a disponibilidade de carboidratos fermentáveis favorece o crescimento de bactérias sacarolíticas. Em função do consumo desses nutrientes e da presença de proteínas,

bactérias proteolíticas passam a dominar este estágio da infecção. Proteínas e glicoproteínas advêm não só da degradação do tecido pulpar, mas também do fluido periapical produzido pela própria ação irritante da bactéria. A dinâmica da infecção endodôntica também é atribuída às relações positivas ou antagonistas estabelecidas entre os microrganismos dentro dos canais radiculares. Algumas bactérias produzem como catabólito final substâncias essenciais ao desenvolvimento de determinadas espécies, explicando o motivo de se isolar, com frequência, uma espécie bacteriana associada a uma outra. Além dessas associações positivas, outras bactérias também podem produzir proteínas semelhantes a antibióticos (bacteriocinas), capazes de inibir o crescimento de outras, configurando assim relações negativas (FERRARI & CAI, 2010).

Nos quadros infecciosos mais intensos, com envolvimento periapical pode ocorrer um quadro de Abscesso Periapical Agudo, o qual apresenta aspectos clínicos característicos: presença de dor intensa, localizada, dor à palpação, percussão e mobilidade dentária. O grau de tumefação é variável, dependendo da extensão, evolução e difusão do abscesso. Além da dor e do edema, pode ocorrer comprometimento sistêmico com febre e debilidade. O Abscesso Periapical Agudo sem fístula pode ser avaliado em 3 diferentes fases de evolução: Abscesso Inicial, Abscesso em Evolução e Abscesso Evoluído (ESTRELA, 2004).

Infecções sintomáticas são tipicamente caracterizadas pela presença de uma periodontite apical aguda ou de um abscesso perirradicular agudo. Tem sido sugerido que algumas bactérias anaeróbias gram-negativas podem estar relacionadas com o desenvolvimento de lesões sintomáticas (SAKAMOTO et al., 2006). Entretanto, vários estudos têm relatado frequências similares das mesmas espécies em casos sintomáticos e assintomáticos (BAUMGARTNER et al., 1999; FOUAD et al., 2002; HAAPASALO et al., 1986; SIQUEIRA Jr. et al., 2000; SIQUEIRA Jr. et al., 2001).

Assim, outros fatores além da mera presença de uma espécie potencialmente patogênica podem influenciar o desenvolvimento de dor. Esses fatores incluem: a) Presença de tipos clonais virulentos: a presença de tipos clonais mais virulentos de uma determinada espécie no canal pode ser um fator predisponente a dor; b) Interações bacterianas aditivas ou sinérgicas: é inteiramente plausível que casos sintomáticos abriguem combinações mais virulentas; c) Número de células bacterianas: a carga bacteriana é um fator relevante para a indução da doença; casos sintomáticos podem apresentar um maior número de células bacterianas quando comparados a casos assintomáticos; d) Sinais do microambiente: estudos revelam que sinais do microambiente influenciam a expressão de genes e proteínas de vários patógenos orais; se as condições microambientais no canal forem favoráveis à expressão de genes de virulência, essa pode ser aumentada e levar à indução de sintomas; e) Resistência do hospedeiro: é sobejamente conhecido que diferentes indivíduos apresentam também diferentes padrões de resistência à infecção e tais padrões podem variar mesmo durante a vida de um determinado indivíduo. Teoricamente, indivíduos com reduzida resistência podem ser mais propensos a desenvolver dor; f) Infecção concomitante por herpesvírus: esse fator pode estar associado à reduzida resistência do hospedeiro. Infecções por HCMV e EBV foram significativamente associadas a quadros de dor, sugerindo que esses vírus podem iniciar ou contribuir para a ocorrência de sintomas (SIQUEIRA Jr. et al., 2011).

Denomina-se Periodontite Apical Primária ou Infecção Endodôntica Primária o dente portador de necrose pulpar com evidência radiográfica de perda óssea e não submetido ao tratamento endodôntico. Esses dentes podem ter sua cavidade endodôntica exposta ou não ao meio bucal e serem sintomáticos (agudos) ou assintomáticos (crônicos). Microrganismos sediados no sistema endodôntico buscam alcançar outras áreas pelos principais acessos, tais como forame apical, foraminas, canais laterais, dentre outros e isso leva o organismo a solicitar cada vez mais células de defesa para essas regiões, gerando um concentrado de elementos e células defensivas, formando a lesão periapical ou lesão perirradicular ou periodontite apical. O desenvolvimento da periodontite apical faz-se em decorrência não apenas da tentativa dos microrganismos desejarem avançar além do endodonto, mas também pela liberação de produtos bacterianos intra e extracelulares, tais como enzimas, toxinas ou restos celulares lançados nos tecidos periapicais. Merece destaque o lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas (FERRARI & CAI, 2010).

O LPS é considerado uma endotoxina, que causa lesões no organismo do hospedeiro, e capaz de produzir lesão apical sem a necessidade de outros estímulos antígenicos (TANOMARU et al., 2003).

Essa molécula tóxica pode ser liberada quando a bactéria morre ou se multiplica, causando efeitos biológicos que levam à resposta inflamatória e reabsorção óssea periapical por intermédio da estimulação dos macrófagos a produzirem mediadores químicos tais como TNF (fator de necrose tumoral) e interleucinas 1, 6 e 8 (VIANNA et al., 2007; MARTINHO, GOMES, 2008; SILVA et al., 2008; MAEKAWA et al., 2011), contribuindo para a perpetuação da Periodontite Apical (VIANNA et al., 2007).

Os pacientes portadores de Periodontite Apical Crônica (Assintomática) apresentam inflamação crônica, de longa duração, em que o aspecto radiográfico varia de pequeno alargamento de espaço da membrana periodontal à reabsorção da lâmina dura do osso periapical (ESTRELA, 2004).

Não há dúvida de que o desenvolvimento da lesão periapical ou periodontite apical é uma resposta de defesa do hospedeiro na tentativa de recrutar células e elementos de defesa, impedindo a disseminação da infecção para outros sítios. Conhecer os agentes biológicos envolvidos nos diferentes tipos de infecção do sistema de canais radiculares é imperioso para definir o protocolo terapêutico, prever o prognóstico e lançar mão de medidas adicionais no combate à infecção, caso necessário (FERRARI & CAI, 2010).

O conhecimento do perfil da microbiota que habita os canais radiculares pode ser adquirido através de coletas microbiológicas, normalmente realizadas com cones de papel absorvente esterilizados, e posterior processamento laboratorial. A identificação pode ser feita por métodos dependentes da Cultura ou por técnicas de Biologia Molecular (FERRARI & CAI, 2012).

Tradicionalmente, a identificação dos microrganismos em amostras endodônticas é baseada em Métodos de Cultura que envolve isolamento, crescimento e identificação laboratorial, valendo-se da morfologia microbiana e testes bioquímicos. Entretanto, a prevalência de alguns patógenos orais pode ser subestimada por essa técnica, pois, por conter várias etapas, pode fracassar no isolamento e crescimento de algumas bactérias, principalmente as mais fastidiosas, como as espiroquetas (VIANNA et al., 2005).

Estudos utilizando o Método de Cultura demonstraram definitivamente o papel essencial de microrganismos na etiologia das diferentes formas de lesões

perirradiculares. Mais recentemente, com o advento de métodos sofisticados de Biologia Molecular, várias limitações do Método de Cultura foram significativamente contornadas ou resolvidas. Estes métodos moleculares podem detectar e identificar microrganismos baseados em informações genômicas, diretamente na amostra clínica e sem a necessidade de cultivo em laboratório. A aplicação de métodos moleculares na pesquisa endodôntica não só confirmou os achados da maioria dos estudos anteriores usando cultura, como também tem expandido significativamente a lista de patógenos endodônticos putativos. Essa nova tecnologia tem permitido o reconhecimento de novos patógenos que jamais haviam sido identificados em canais pelos Métodos de Cultura. Outrossim, muitas espécies que já possuíam o status de patógenos endodônticos suspeitos em razão de suas altas prevalências relatadas por métodos de cultura têm sido encontradas ainda com maior frequência por métodos moleculares, reforçando a associação com as lesões perirradiculares (SIQUEIRA Jr. et al., 2011).

A década de 1990 trouxe muitos avanços nos métodos moleculares de diagnóstico, principalmente com o surgimento de técnicas baseadas na hibridização DNA-DNA e no PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Uma das principais vantagens desses métodos é detectar microrganismos incultiváveis, levando a uma caracterização mais acurada. A sensibilidade da cultura é de aproximadamente 10^4 a 10^5 células microbianas para uma determinada espécie usando meios não seletivos, e 10^3 usando meios seletivos, enquanto para o PCR varia de 10 a 10^2 células, dependendo da técnica usada. Por exemplo, o Nested PCR pode detectar espécies na presença de 10 células. Já o limite de detecção da hibridização DNA-DNA varia de 10^3 a 10^4 células. A detecção das espécies associadas às infecções endodônticas baseadas na estrutura do DNA bacteriano tem sido realizada por meio da amplificação com a reação e PCR (PR Simples, Nested PCR, Multiplex PCR) ou hibridização DNA-DNA (*Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). Existem ainda métodos que permitem a quantificação de ácidos nucleicos, como por exemplo, PCR em Tempo Real (*Real-Time Quantitative PCR*) (GOMES & MONTAGNER, 2010).

Na tentativa de transpor as limitações do cultivo de microrganismos, técnicas baseadas no DNA bacteriano foram desenvolvidas, ampliando, substancialmente, o conhecimento do universo microbiológico. Cerca de 500 espécies bacterianas já foram associadas às infecções endodônticas. Os gêneros mais representativos são: *Prevotella*: 39 espécies; *Eubacterium*: 27 espécies; *Streptococcus*: 26 espécies; *Lactobacillus*: 21 espécies (SIQUEIRA Jr. & RÔÇAS, 2009).

O conhecimento da microbiota, que habita o sistema de canais radiculares em diversas condições clínicas, deve ser adquirido para que, conhecendo a causa da doença infecciosa, manobras terapêuticas adequadas possam ser convenientemente aplicadas (FERRARI & CAI, 2012).

O sistema de diagnóstico das alterações pulpares pode ser uma combinação dos dois principais tipos, o sistema de classificação histopatológica e o sistema de classificação clínica. Como o processo de inflamação pulpar apresenta uma evolução contínua com o tempo, o estágio da doença muda ao longo do tempo, portanto, há um grande número de potenciais descritores histopatológicos dos estágios da alteração pulpar. Clinicamente, no entanto, apenas um número limitado de condições das alterações pulpares pode ser descrito com base nos resultados dos exames dos pacientes. Vários estudos têm mostrado que há pouca ou nenhuma relação entre os achados clínicos de diagnóstico e a fase histopatológica da polpa. Porém, como o diagnóstico histopatológico da polpa não é disponível ao clínico

endodôntico e é necessário realizar o diagnóstico para o tratamento clínico, indica-se seguir a classificação clínica. A classificação clínica baseia-se na utilização de uma metodologia de diagnóstico para produzir dados que podem ser interpretados para desenvolver um diagnóstico pulpar. A Pulpite Irreversível é caracterizada pela presença de dor geralmente de moderada a grave, espontânea, contínua, persistente, localizada ou difusa. O Abscesso Periapical Agudo caracteriza-se por apresenta sinais e sintomas moderados a severos, que incluem edema intraoral ou exsudação via canal radicular, ou ambos; inchaço, calor, edema, ocasionalmente febre e/ou linadenopatia. Dor à percussão vertical, diferentes graus de mobilidade, ausência de sintomatologia ao frio, calor e ao teste elétrico, e no exame radiográfico periapical, há um ligeiro espessamento do espaço referente ao ligamento periodontal a uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical. Na Periodontite Apical Crônica, não há sinais e sintomas como os descritos anteriormente, há uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical; sem ou com ligeira sensibilidade à percussão vertical e o dente não responde aos testes térmico e elétrico (GUTMANN et al., 2009).

4.4 IMUNIDADE

O termo Imunidade é derivado da palavra latina *immunitas*, que se referia à isenção de vários deveres cívicos e processos legais oferecidos aos senadores romanos durante o seu mandato. Historicamente, a Imunidade significava proteção contra doenças, em particular contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o Sistema Imunológico, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de Resposta Imunológica. A Imunologia é o estudo da imunidade em sua acepção mais ampla, ou seja, dos eventos celulares e moleculares que ocorrem depois que o organismo encontra microrganismos e outras macromoléculas estranhas (HÖFLING et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

A Imunologia consiste no estudo da resposta imune, isto é, estudo dos mecanismos pelos quais um organismo tem capacidade de reconhecer, neutralizar e eliminar as substâncias estranhas, assim como de se tornar resistente a reinfecções (HÖFLING et al., 2006).

A maneira mais simples de evitar uma infecção é impedir que os microrganismos tenham acesso ao meio interno do corpo. Se os microrganismos conseguirem penetrar no corpo, entram em ação duas importantes operações de defesa: o efeito destrutivo de fatores químicos solúveis, como as enzimas bactericidas, e o mecanismo da fagocitose – que literalmente significa “ação de comer”. O corpo humano possui um ambiente interno muito complexo, de modo que os fagócitos deparam-se continuamente com uma extraordinária variedade de diferentes células e moléculas solúveis. Assim, devem desenvolver mecanismos que permitam distinguir entre esses componentes próprios aliados e os agentes microbianos hostis e potencialmente perigosos – como *Charlie Janeway* soube tão bem expressá-lo: devem ser capazes de discriminar entre “o próprio não-infeccioso e

o não-próprio infeccioso". A infecção não apenas precisa ser reconhecida, como também deve desencadear um sinal indicando "perigo" (ROIT, DELVES, 2010).

O homem mantém contato direto com uma grande quantidade de microrganismos com características biológicas muito variadas (vírus, bactérias, fungos, parasitos), muitos das quais podem causar um desequilíbrio fisiológico focal ou generalizado, causando o estado de doença. Graças à vigilância imunológica, o organismo mantém a sua integridade, agindo contra agentes agressores e substâncias endógenas ou exógenas. Para tanto, o homem utiliza diferentes mecanismos de defesa. Os diferentes mecanismos têm como base de ação o reconhecimento do próprio do não-próprio, desencadeando processo imune contra o não-próprio. O mecanismo de reconhecimento do próprio do não-próprio pode ser inespecífico (fagocitose de partículas por neutrófilos e macrófagos) ou específico (cada linhagem de linfócito age contra um agente agressor específico) (HÖFLING et al., 2006).

A defesa contra microrganismos é mediada pelas reações iniciais da Imunidade Natural e as respostas tardias da Imunidade Adquirida. A Imunidade Natural (Imunidade Inata ou Nativa) é a primeira linha de defesa contra as infecções, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecção. Esses mecanismos reagem apenas contra microrganismos (e os produtos das células lesadas) e respondem essencialmente da mesma maneira a sucessivas infecções. Os principais componentes do sistema imunológico natural são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; (2) células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos) e células exterminadoras naturais (NK - *natural killer*); (3) proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e (4) proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade natural. Os mecanismos da imunidade natural são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos semelhantes e não conseguem distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas (HÖFLING et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

Em contraste com a imunidade natural, existem outras respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um microrganismo em particular. Como essa forma de imunidade se desenvolve em resposta a infecções e se adapta à infecção, é chamada de Imunidade Adaptativa ou Adquirida. As características que definem a imunidade adquirida incluem uma especificidade extraordinária para distinguir as diferentes moléculas e uma habilidade de se "lembrar" e responder com mais intensidade a exposições subsequentes ao mesmo microrganismo. O sistema imunológico adquirido é capaz de reconhecer e reagir a um grande número de substâncias, microbianas ou não. Além disso, ele tem uma incrível capacidade para distinguir entre os diferentes microrganismos e moléculas, incluindo até mesmo aqueles que apresentam uma grande semelhança, sendo por isso também chamado de Imunidade Específica. Ele também é denominado Imunidade Adquirida para enfatizar o fato de que as intensas respostas protetoras são "adquiridas" por experiência. Os principais componentes da imunidade adquirida incluem os linfócitos e seus produtos, como os anticorpos. As substâncias estranhas que induzem respostas imunológicas específicas ou são o alvo de tais respostas são chamadas de antígenos (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune adquirida ou específica contra um agressor é realizada por meio da participação de agentes celulares e agentes humorais. Tem como característica básica o poder discriminatório, a especificidade e a apresentação de mecanismos de memória. Em contraste com a imunidade inata, os mecanismos de defesa são altamente evoluídos – a magnitude e capacidade defensiva aumentam em cada exposição sucessiva aos agentes infecciosos (ou macromoléculas estranhas) (HÖFLING et al., 2006).

As respostas Imunológicas Natural e Adquirida são componentes de um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual várias células e moléculas funcionam em coordenação. Entre as respostas inatas e adquiridas existem importantes laços. O primeiro é que a resposta imune inata para eliminar os microrganismos estimula as respostas imunes adquiridas e influencia na natureza das respostas específicas. O segundo é que a resposta imune adquirida, por sua vez, utiliza muitos mecanismos efetores da resposta inata para eliminar os agentes infecciosos, e esses funcionam, muitas vezes, para facilitar as atividades antimicrobianas dos mecanismos de defesas da imunidade inata (HÖFLING et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

A Imunidade Natural desempenha duas importantes funções: (1) A imunidade natural é a resposta inicial aos microrganismos que impede, controla ou elimina a infecção do hospedeiro. A importância da imunidade natural na defesa do hospedeiro é ilustrada por estudos mostrando que a inibição ou eliminação de qualquer um dos vários mecanismos da imunidade natural aumenta de forma marcante a suscetibilidade a infecções, mesmo quando o sistema imunológico adquirido está intacto e funcional; (2) A imunidade natural aos microrganismos estimula as respostas imunológicas adquiridas e pode influenciar na natureza das respostas adquiridas para torná-las otimamente eficazes contra os diferentes tipos de microrganismos. Assim, a imunidade natural não apenas desempenha funções defensivas logo após a infecção, mas também proporciona o “aviso” de que uma infecção está presente, contra a qual uma resposta imunológica adquirida tem de ser montada. Além disso, diferentes componentes da resposta imunológica natural frequentemente reagem de modos distintos a diferentes microrganismos (p. ex., bactérias *versus* vírus) e, desse modo, influenciam no tipo de resposta imunológica adquirida que se desenvolve (ABBAS et al., 2008).

Os componentes da imunidade natural reconhecem estruturas que são características de patógenos microbianos e não estão presentes nas células dos mamíferos. As substâncias dos microrganismos que estimulam a imunidade natural são chamadas de Padrões Moleculares associados a Patógenos (PAMPs). Estes padrões são conservados, isto é, têm pouca probabilidade de sofrer mutação, compartilhados por um grande grupo de agentes infecciosos, prescindindo da necessidade de um grande número de receptores e claramente distinguíveis dos padrões próprios. Os PAMPs ligados a infecções extracelulares incluem: o lipopolissacarídeo (LPS) dos microrganismos Gram-negativos, o ácido lipoteicóico dos microrganismos Gram-positivos, as mananas da parede celular das leveduras e os glicolípídios micobacterianos. Os receptores que se ligam a essas estruturas preservadas são chamados de receptores de reconhecimento de padrão (Receptor semelhante a Toll; Receptor a N-formil-metionil; Receptor a manose e Receptor varredor- *scavenger*). Devido a essa especificidade para as estruturas microbianas, os sistema imunológico natural é capaz de distinguir o “próprio” do “não-próprio” (ABBAS et al., 2008; ROIT, DELVES, 2010).

Na Imunidade Inata, existe a participação de fatores de defesa externos, que envolvem as barreiras físicas e químicas, e os fatores de defesa internos, que são constituídos por componentes protéicos (complemento, citocinas e outras proteínas) e por componentes celulares. As barreiras físico-químicas estão em funcionamento constante, mesmo antes da instalação da infecção. Os outros componentes da resposta inata normalmente estão inativos, mas respondem rapidamente à presença dos patógenos. Os componentes da resposta inata e suas principais funções são: 1) *Barreiras físico-químicas*: impedem a entrada de microrganismos e matam alguns micróbios que conseguem penetrá-las; 2) *Componentes Protéicos*: a) Complemento: morte e opsonização de micróbios; b) Citocinas (RNF, IL-1, IL-2, IL10, IL15, TGF- β , IFN- α , β , γ e quimicinas): estimulação e controle da inflamação, resistência à infecção viral, ativação de macrófagos, proliferação de células exterminadoras naturais); c) Outras proteínas: Lectina ligadora de manose (colectina) e Proteína C-reativa (pentraxina): opsonização de micróbios e ativação do complemento; Fatores de coagulação: bloqueio dos tecidos infectados. 3) *Componentes celulares*: a) Neutrófilos: fagocitose inicial e morte dos microrganismos; b) Macrófagos: fagocitose eficiente e morte de microrganismos, secreção de citocinas que estimulam a inflamação; c) Células exterminadoras naturais (EN): lise das células infectadas e ativação dos macrófagos (HÖFLING et al., 2006).

Como barreiras físico-químicas estão as superfícies epiteliais intactas, que formam barreiras físicas entre os microrganismos no ambiente externo e os tecidos do hospedeiro. Os epitélios, como alguns leucócitos, produzem peptídeos que possuem uma função de antibiótico natural. As duas famílias estruturalmente distintas de peptídeos antimicrobianos são as Defensinas e as Catelicidinas. As Defensinas são pequenos peptídeos catiônicos, constituídos por 29 a 34 aminoácidos, que contêm três laços dissulfeto intracadeia. Três famílias de defensinas, chamadas de α , β e ϕ , são distinguidas pela localização desses laços. As defensinas são produzidas pelas células epiteliais de superfícies mucosas e por leucócitos que contêm grânulos, incluindo neutrófilos, células NK e linfócitos T citotóxicos. Algumas defensinas são produzidas constitucionalmente por alguns tipos de células, mas a sua secreção pode ser aumentada por citocinas ou produtos microbianos. Em outras células, defensinas são produzidas em resposta a citocinas e produtos microbianos. As ações protetoras das defensinas incluem tanto a toxicidade direta aos micróbios, incluindo bactérias e fungos, quanto à ativação de células envolvidas na resposta inflamatória aos micróbios (ABBAS et al., 2008).

Muitos microrganismos aderem efetivamente à superfície dos fagócitos e muitos deles fornecem espontaneamente o sinal apropriado de iniciação da membrana. Entretanto, nossos numerosos adversários microbianos estão continuamente sofrendo mutação, produzindo novas espécies capazes de sobrepujar nossas defesas. O organismo resolveu esses problemas com a extrema facilidade que provém dos alguns milhões de anos de evolução ao desenvolver o Sistema Complemento. Complemento é o nome dado a uma complexa série de cerca de 30 proteínas que, juntamente com a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a formação de cininas, formam um dos sistemas enzimáticos deflagrados encontrados no plasma. Tipicamente, esses sistemas produzem uma resposta rápida e altamente amplificada a um estímulo de deflagração, mediada por um fenômeno em cascata, onde o produto de uma reação é o catalisador enzimático da reação seguinte. O complemento pode mediar uma reação inflamatória aguda. Os processos de dilatação capilar (rubor), exsudação de proteínas plasmáticas e líquido (edema),

devido a alterações das pressões hidrostáticas e osmóticas e o acúmulo de neutrófilos, são denominados, em seu conjunto, de resposta inflamatória aguda (ROITT e DELVES, 2010).

O Sistema Complemento é composto por mais de 25 proteínas diferentes, produzidas por diferentes tecidos e células, incluindo hepatócitos, macrófagos e células epiteliais do intestino. Essas proteínas são ativadas por uma variedade de agentes, e sua ativação ocorre por diferentes vias, em uma cascata de eventos que resultará em lise. Consequentemente, a ausência de um dos componentes na via de ativação pode romper a cascata e finalizar a reação. A ativação do sistema complemento pode ser dividida em três vias: clássica, da lectina e alternativa. Na via da lectina, a ativação de C4 pode ocorrer sem a participação de anticorpos (imunidade inata) e de C1 por meio da via da lectina. Essa via é iniciada por três proteínas: uma proteína ligadora de manose (MBP, também conhecida como lectina ligadora de manose – MBL) e duas proteases séricas associada à MBP (MASP, MASP2), todas presentes no soro normal. A MBP liga-se a certos resíduos de manose presentes em muitas bactérias e com subsequente interação com MASP e MASP2. O complexo MBP-MASP-MASP2 é análogo ao complexo Ac-C1qrs e leva a ativação de C4, C2 e C3 independente de anticorpo. Se os microrganismos entrarem na circulação, serão combatidos pelas proteínas do plasma. As principais proteínas circulantes da imunidade inata são as proteínas do sistema complemento, Lectina ligadora de manose – MBL2 (colectina), Proteína C-reativa (pentraxina) e proteínas do sistema de coagulação. A Lectina ligadora de manose (MBL2) pertence à família da colectina e funciona como uma opsonina, pois liga os carboidratos encontrados na superfície microbiana à manose. Essa, por sua vez, se ligará ao receptor de manose dos macrófagos. Além disso, a Lectina ligadora de manose pode interagir com duas outras proteínas do complemento, ativando a via clássica, como a proteína C-reativa (pentraxina). Os fatores de coagulação são as proteínas do plasma, cuja função principal é evitar a hemorragia. No entanto, a coagulação também pode servir para bloquear as infecções bacterianas, evitando a disseminação dos microrganismos (HÖFLING et al., 2006).

As principais células efetoras da imunidade natural são os neutrófilos, os fagócitos mononucleares e as células *natural killer* (NK). Essas células atacam microrganismos que romperam as barreiras epiteliais e entraram nos tecidos ou na circulação. Cada um desses tipos celulares desempenha um papel distinto na resposta aos microrganismos. Algumas das células da imunidade natural, especialmente macrófagos e células NK, secretam citocinas que ativam os fagócitos e estimulam a reação celular da imunidade natural, chamada Inflamação. A inflamação consiste no recrutamento de leucócitos e no extravasamento de várias proteínas plasmáticas em um local de infecção e na ativação dos leucócitos e proteínas para eliminarem o agente infeccioso. Se microrganismos entram na circulação, eles são combatidos por várias proteínas plasmáticas. As principais proteínas circulantes da imunidade natural são as proteínas do sistema complemento e outras proteínas plasmáticas que reconhecem estruturas microbianas, tais como a Lectina de Ligação à Manose (MBL) (ABBAS et al., 2008).

As mais numerosas células efetoras do sistema imunológico natural são células derivadas da medula óssea que circulam no sangue e migram para dentro dos tecidos. Estas incluem células da linhagem mielóide, incluindo neutrófilos, fagócitos mononucleares e células dendríticas, e células da linhagem linfocítica, incluindo as células *natural killer*, bem como as células T $\gamma\delta$ e as células B B-1. Os fagócitos, incluindo os neutrófilos e os macrófagos, são células cuja função principal

é identificar, ingerir e destruir microrganismos. As respostas funcionais dos fagócitos na defesa do hospedeiro consistem em passos sequenciais: recrutamento ativo das células para os locais de infecção, reconhecimento dos micróbios, ingestão dos micróbios pelo processo de fagocitose e destruição dos micróbios ingeridos. Além disso, os fagócitos produzem citocinas que servem a muitos papéis importantes nas respostas imunes naturais e adquiridas e na reparação tecidual. Essas funções efetoras dos fagócitos são importantes não somente na imunidade natural, mas também nas fases efetoras das respostas imunes adquiridas (ABBAS et al., 2008; ROIT, DELVES, 2010).

Os neutrófilos, também chamados de leucócitos polimorfonucleares, são a população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes (cerca de 62%) e medeiam as fases mais iniciais das respostas inflamatórias. Os neutrófilos circulam como células esféricas com cerca de 12 a 15 μm de diâmetro, com numerosas projeções de membrana. O núcleo de um neutrófilo é segmentado em três a cinco lóbulos conectados, daí o termo *leucócitos polimorfonucleares*. O citoplasma contém grânulos de dois tipos. A maioria, os chamados grânulos específicos, é preenchida por enzimas tais como lisozima, collagenase e elastase. Esses grânulos não se coram fortemente nem com corante básico nem com corante ácido (hematoxina e eosina, respectivamente), o que distingue os grânulos dos neutrófilos daqueles basófilos e eosinófilos, respectivamente. Os demais grânulos dos neutrófilos, chamados azurófilos, são lisossomos que contêm enzimas e outras substâncias microbicidas, inclusive defensinas e catelicidinas (HÖFLING et al., 2006; ABBAS et al., 2008; ROIT, DELVES, 2010).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e se originam de uma linhagem em comum com os fagócitos mononucleares. A produção de neutrófilos é estimulada pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Um ser humano adulto produz mais de 1×10^{11} neutrófilos por dia, e cada um circula no sangue por apenas 6 horas. Os neutrófilos podem migrar para locais de infecção dentro de poucas horas após a entrada de microrganismos. Se um neutrófilo circulante não for recrutado para um local de inflamação desse período, ele sofre morte celular programada (apoptose) e é normalmente fagocitado por macrófagos residentes no fígado ou baço. Mesmo depois de entrar nos tecidos, os neutrófilos funcionam durante algumas horas e a seguir morrem (ABBAS et al., 2008).

O sistema dos fagócitos mononucleares consiste em células que têm linhagem comum cuja função principal é fagocitose e que desempenham papéis centrais na imunidade natural e adquirida. As células do sistema fagocitário mononuclear se originam na medula óssea, circulam no sangue e maturam e são ativadas em vários tecidos. O primeiro tipo celular que entra no sangue periférico depois de deixar a medula é incompletamente diferenciado e é chamado de monócito. Uma vez que entrem nos tecidos, essas células maturam e se tornam macrófagos. Os macrófagos podem assumir diferentes formas morfológicas após ativação por estímulos externos, como micróbios. Alguns desenvolvem citoplasma abundante e são chamados de células epitelioides, em virtude da sua semelhança a células epiteliais da pele. Os macrófagos ativados podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas. Macrófagos em diferentes tecidos receberam nomes especiais para designar localizações específicas. Por exemplo, no sistema nervoso central, são chamados de células microgliais; quando revestem os sinusoides vasculares do fígado, são chamados de células de Küpffer; nas vias aéreas pulmonares, são chamados de macrófagos alveolares; e os fagócitos multinucleados no osso são chamados de osteoclastos. Os macrófagos respondem

tipicamente aos microrganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, mas persistem por muito mais tempo nos locais da inflamação. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos não são terminalmente diferenciados e podem sofrer divisão celular em um local inflamatório. Portanto, os macrófagos são as células efetoras dominantes nos estágios mais tardios da resposta imunológica natural, 1 ou 2 dias após a infecção (ABBAS et al., 2008; ROIT, DELVES, 2010).

As células dendríticas desempenham papéis importantes nas respostas naturais a infecções, e na conexão de respostas imunes naturais e adquiridas. Elas possuem longas projeções membranosas e capacidades fagocíticas, e são amplamente distribuídas nos tecidos linfóides, epitélio mucoso e parênquima dos órgãos. As células dendríticas são derivadas dos precursores da medula óssea, e a maioria é relacionada em linhagem com os fagócitos mononucleares. Elas expressam receptores de reconhecimento de padrão e respondem aos micróbios secretando citocinas (ABBAS et al., 2008).

Apesar do potencial antimicrobiano das células fagocíticas, existem obstáculos que precisam ser reconhecidos; nosso temido arsenal de armas é inútil, a não ser que o fagócito possa: (i) “ser guiado” automaticamente até o microrganismo, (ii) aderir a ele, e (iii) responder através da ativação da membrana, que desencadeia o processo de fagocitose. Algumas bactérias produzem substâncias químicas, como o peptídeo formil.Met.Leu.Phe, que atrai direccionalmente os leucócitos – um processo conhecido como quimiotaxia. Os microrganismos são ingeridos por células fagocíticas ativadas. Após a aderência do microrganismo à superfície do neutrófilo ou do macrófago através do reconhecimento de um PAMP, o sinal resultante dá início à fase de ingestão, ao ativar um sistema contrátil de actina-miosina que emite pseudópodes ao redor da partícula; à medida que receptores adjacentes ligam-se sequencialmente à superfície do microrganismo, a membrana plasmática avança em torno da partícula, à semelhança de um “fecho eclair” até ser totalmente circundada dentro de um vacúolo (fagossoma). A partir dessa etapa, os eventos ocorrem rapidamente, e, dentro de 1 minuto, os grânulos citoplasmáticos fundem-se com o fagossoma e descarregam seus conteúdos em torno do microrganismo aprisionado, que se torna o alvo de uma formidável bateria de mecanismos microbicidas (ROITT e DELVES, 2010).

4.5 CITOCINAS

O lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano, componente básico da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e o ácido lipoteicoico, estrutura de superfície nas bactérias Gram-positivas, desempenham significativa função no processo de agressão ao hospedeiro, estimulando complexas reações orgânicas. O LPS apresenta a propriedade de ativar os macrófagos a produzirem mediadores (polipeptídeos ou glicoproteínas) denominados citocinas. Citocina constitui um termo coletivo preferido para proteínas reguladoras de células. As citocinas são proteínas liberadas por células na maioria do sistema imune, que atuam como mediadores intercelulares na promoção da resposta imune (ESTRELA, 2004).

As citocinas são responsáveis por uma miríade de efeitos biológicos, dentre eles as fases efetoras das respostas inflamatórias inespecífica e imunológica específica. São inicialmente liberadas na maior parte pelos macrófagos, mas também podem ser produzidos por muitas células nucleadas como os monócitos, fibroblastos e células epiteliais. As principais citocinas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias são: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α). A IL-1 é encontrada nas formas α e β , tem a capacidade de ativar macrófagos e estimular a biossíntese de prostaglandinas por macrófagos e fibroblastos. Pode agir sobre os fibroblastos, promovendo o reparo ou a destruição da matriz celular. A IL-6 funciona como fator de crescimento para linfócitos B, age na produção de imunoglobulinas, exacerba a inflamação. Associada a IL-1, ativa a produção dos linfócitos T *helper* e apresenta ação na reabsorção óssea. As citocinas sinalizam outras células, como os fibroblastos, a produzirem prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (MMPS). As prostaglandina E₂ (PGE₂) tem diversos efeitos pró-inflamatórios e imunomodulatórios. As PGE₂ têm sido associadas com destruição óssea, e as MMPS podem induzir degradação do tecido conjuntivo (MARTINS e RUSSO, 2004; SALLUM et al., 2004).

As respostas do sistema imune inato são mediadas pela liberação de citocinas, pelos fagócitos ou células *killer*. As respostas imunes adaptativas são mediadas pela geração de células antígeno-específicas T e B. As células T originárias induzem a expansão e diferenciação em células efetoras T, que produzem várias citocinas ou provocam citólise para eliminar células alvo. As células B secretam imunoglobulinas, que são responsáveis pela eliminação extracelular dos microrganismos. As células T (CD4) são importantes na determinação do resultado das respostas imunológicas das células T contra patógenos. As células efetoras T (CD4) são classificadas em T helper (Th)1 e T helper (Th)2. As células Th1 secretam IL-2, IL-12, Interferon (IFN)- γ , Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e TNF- β , que são decisivos na erradicação de patógenos intracelulares, enquanto que as células Th2 produzem Interleucinas, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e fator de crescimento tecidual β (TGF- β), que são essenciais para produção de anticorpos e eliminação de microrganismos extracelulares (MARTINS e RUSSO, 2004; AZUMA, 2006). Quando as células mononucleares (monócitos e linfócitos) situados próximos ao osso alveolar são ativados, produzem certos mediadores químicos (PGs, IL-1, TNF e IL-6) que estimulam a atividade osteoclástica, tornando-se, portanto, potentes indutores de reabsorção óssea (MARTINS e RUSSO, 2004).

A IL-6 media a comunicação entre um grande número de tipos celulares estabelecendo uma regra na proliferação e diferenciação de linfócitos B, plasmócitos e hibridomas, progenitores hematopoiéticos, hepatócitos e linfócitos T. Outras atividades se sobrepõem às da IL-1 e TNF- α e, assim, a IL-6 é considerada um dos principais mediadores imunes e inflamatórios. Fibroblastos aparecem para produzir IL-6 como um fator de crescimento autócrino. Quando a IL-6 não induz à proliferação das células B normais, ela colabora na diferenciação destas células (EBERSOLE, 2001).

A IL-6 estimula a reabsorção óssea, e é responsável ainda pela formação de células com fenótipos de osteoclastos. Células ósseas também têm a habilidade de produzir IL-6, que parece ser maior quando estimuladas por outras citocinas (SCHWARTZ et al., 2001).

O gene humano que codifica a IL-6 está localizado no braço curto do cromossomo 7 e consiste de 5 exons e 4 introns. Na posição -174 do seu promotor, foi descrito um SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina (G) por

uma base C (citosina) (OLOMOLAIYE et al., 1998), que resulta em alterações na transcrição da IL-6 e aumento dos seus níveis plasmáticos (FISHMAN et al., 1998). Ainda não foi esclarecido de que maneira este polimorfismo modula os níveis de IL-6 (CAMPOS et al., 2007).

Campos et al. (2007) avaliaram a ocorrência dos polimorfismos dos genes *IL-1A* (889C/T), *IL-1B* (-511C/T), *IL-1B* (+3953C/T), *IL-1RN* VNTR (intron 2), *IL-6* (174G/C) e *TNF- α* (-308G/A) em 92 pacientes com sinais imaginológicos de alterações degenerativas da ATM e em 102 indivíduos controles. Considerando o polimorfismo *IL-6* (-174G/C), indivíduos portadores do alelo C e do genótipo C/G apresentaram um risco 1,60 e 1,98 vezes maior em desenvolver DTM, respectivamente. O presente estudo mostra que polimorfismos nos genes da IL-1 e IL-6 estão associados ao desenvolvimento de DTMs na população estudada e corrobora evidências anteriores de que fatores psicológicos, locais e sistêmicos devem atuar em conjunto no desenvolvimento de DTMs.

Sá et al. (2007) avaliaram a associação entre pacientes com abscesso periapical agudo e os polimorfismos de genes envolvidos com a resposta imune. Os polimorfismos analisados foram: CD14 (-260C/T), IL1B (+3954 C/T), IL-6 (-174 G/C), IL-10 (-1082 G/A) e *TNF- α* (-308 G/A). O DNA genômico foi obtido através do material coletado da mucosa oral com um swab de 45 pacientes com abscesso periapical agudo e 53 pacientes com lesões periapicais inflamatórias assintomáticas. O material obtido foi submetido à análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA genômico (RFLP) para determinar o genótipo de cada paciente. Os resultados demonstraram uma associação significativa entre a ocorrência do genótipo GG ou a expressão do alelo G do locus -174 (G/C) do gene *IL-6* e a presença de abscesso periapical agudo em mulheres e em pacientes com idade ≤ 35 anos. Os autores sugeriram que fatores genéticos estão associados com a susceptibilidade em desenvolver abscesso periapical agudo.

O Lupus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune crônica, que envolve a inflamação de vários órgãos após a deposição de complexos imunes e é caracterizada por hiperatividade das células B não controlada. No presente estudo, 100 pacientes com LES e 100 controles da Malásia foram avaliados a fim de determinar a associação dos polimorfismos existentes na região promotora do gene de IL-6 com o início do LES. O genótipo homozigoto G foi encontrado em quantidade significativa em pacientes com LES (chi (2) = 33,754, P = 0,00000000625), enquanto o genótipo G/C heterozigótica foi significativo nos controles (chi (2) = 25,087, P = 0,000000548). Os autores sugerem que o alelo C pode ter um efeito de mascaramento do alelo G, quando ambos os alelos estão presentes em indivíduos heterozigóticos. No entanto, não foi observada associação significativa do alelo homozigoto C com o início do LES ou com proteção contra a doença (chi (2) = 1,684, P = 0,194366) (CHUA et al., 2009).

Kalburgi et al. (2010) avaliaram a prevalência do SNP do gene *IL-6* na posição -174 G>C na população de 30 índios, através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Amostras de sangue foram coletadas de 15 pacientes com periodontite crônica e 15 controles saudáveis. Os resultados mostraram que o genótipo G/G foi significativamente mais frequente no grupo com periodontite crônica e que o genótipo C/C foi significativamente mais frequente no grupo controle (P = 0,0069 para ambos). O alelo G foi mais frequente em pacientes com periodontite crônica (76,67%), enquanto que o alelo C foi mais frequente no grupo de controle (73,33%). Entre os pacientes com periodontite crônica, a chance de ter o alelo G, em comparação com os controles, foi de 9.04. Nesta população, a presença

do genótipo de IL-6 (-174) G/G pode aumentar a susceptibilidade a periodontite, enquanto que o genótipo C/C pode ter um efeito protetor.

A susceptibilidade entre polimorfismos da Interleucina-6 (IL-6) e doença arterial coronariana (CAD) tem sido amplamente investigada. Um total de 19 estudos foram incluídos na metanálise. Os autores indicaram que a associação entre o gene IL-6 e risco de CAD foi leve e moderada para os polimorfismos -174 G/C e -572 G/C. No entanto, esta relação requer investigação adicional através de estudos bem desenhados com amostras maiores (YANG et al., 2013).

O câncer de próstata é um dos mais frequentes diagnósticos de câncer maligno que afetam os homens. Devido a importante relação entre a IL-6 e os diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos, o polimorfismo da IL-6 pode modular o risco ao câncer de próstata. Através de uma metanálise, os autores verificaram esta associação e concluíram que não houve associação significativa entre o polimorfismo -174 G/C IL-6 e o risco maior de câncer de próstata. No entanto, a presença do alelo C e do genótipo CC foi associada significativamente com a diminuição do risco ao câncer de próstata, em relação ao polimorfismo -636 G/C IL-6 (MAGALHÃES et al., 2013).

Song et al. (2013) avaliaram se os polimorfismos dos genes promotores -308 A/G, -238 A/G *TNF- α* e -174 G/C e -572G/C IL-6 conferem susceptibilidade à doença periodontal em diferentes populações étnicas, através de uma metanálise. Dezessete estudos de polimorfismo do -308 A/G *TNF- α* e 16 do -174 G/C IL-6 foram considerados para a metanálise. Análises após estratificação por etnia indicou que o alelo A *TNF- α* -308 foi associado à periodontite em populações brasileiras, asiáticas e turca (OR = 0,637, IC de 95% = 0,447-0,907, p = 0,013, OR = 0,403, 95%, IC = 0,204-0,707, p = 0,009, OR = 1.818, 95%; CI = 1,036-3,189, p = 0,037). A meta-análise mostrou uma associação do polimorfismo -174 G/C do gene IL-6 com periodontite em populações brasileiras (ou GG+GC = 2,394, IC = 1,081-5,302, p = 0,031, 95%). Esta meta-análise demonstra que o polimorfismo A/G -308 *TNF- α* confere susceptibilidade a periodontite em populações brasileiras, asiáticas e turcas. O polimorfismo -174 G/C IL-6 pode conferir suscetibilidade à periodontite em brasileiros, e o polimorfismo -572 G/C IL-6 do pode ser associado com susceptibilidade à periodontite em europeus.

O *TNF- α* é um mediador do processo inflamatório que atua com a IL-1. É produzido por macrófagos após sua ativação por componentes de bactérias gram-negativas, especialmente LPS. Esse mediador tem um amplo espectro de ação em leucócitos, células endoteliais e células do tecido conjuntivo. O *TNF- α* aumenta a resposta dos leucócitos a agentes quimiotáticos e facilita a degranulação de neutrófilos e a aderência de leucócitos na parede de células endoteliais. Aumenta também a permeabilidade vascular e estimula as células endoteliais a produzir IL-1. Apesar de não ser tão potente como a IL-1, pode estimular a proliferação de precursores de osteoclastos, atuando nos osteoclastos maduros e estimulando a reabsorção óssea, sendo sinérgicos na capacidade de aumentar a reabsorção óssea. O *TNF* induz a expressão de outros mediadores que amplificam e sustentam a resposta inflamatória, tais como as prostaglandinas; estimula a produção de enzimas líticas como metaloproteinases da matriz; aumenta a morte bacteriana e a atividade fagocítica; bem como pode limitar o reparo através da indução da apoptose de células produtoras de matriz (MARTINS e RUSSO, 2004).

O gene *TNF- α* , responsável pela codificação do *TNF- α* , está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região de classe III do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e contém 4 exons e 3 introns (MAKHATADZE,

1998). Na posição –308 de sua região promotora, foi descrito um SNP, no qual há substituição de uma base guanina (G) por uma base adenina (A) (WILSON *et al.*, 1992). O alelo A foi relacionado à maior transcrição gênica (KROEGER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997) e produção elevada de TNF- α *in vitro* (LOUIS *et al.*, 1998). Este alelo parece também estar associado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e degenerativas, como a artrite reumatóide (RODRIGUEZ-CARREON *et al.*, 2005), lupus eritematoso sistêmico (ROOD *et al.*, 2000) e febre reumática (SALLAKCI *et al.*, 2005).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica, com efeitos sobre a apoptose e ativação de células-alvo envolvidas na amplificação de processos celulares imunológicos. Entre os vários genes polimórficos do TNF- α , o SNP localizado na posição nucleotídica 308 (G ou A) tem mostrado afetar diretamente a expressão do TNF- α . O genótipo AA tem sido significativamente associado com maior produção de TNF- α , e em alguns casos, com o aumento da morbidade e mortalidade em sepse, malária, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), leishmaniose, lúpus eritematoso sistêmico (LES), hepatite auto-imune tipo 1 e outras doenças mediadas pelo sistema imunitário (asma e dermatite de contato) (DETTOGNI *et al.*, 2013).

4.6 PROTEÍNAS DA IMUNIDADE INATA

4.6.1 BETA-DEFENSINAS

Defensinas humanas são peptídeos catiônico multifuncional ricos em arginina (massas moleculares variando 3,5-6 kDa) caracterizadas por três pontes de dissulfureto intramoleculares, que estabilizam a estrutura. São codificadas por um gene localizado no humano cromossoma 8p22-23. As defensinas exibem atividade microbicida contra um largo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus (DOMMISCH *et al.*, 2007; NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ e DEPTUŁA, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2009; CASTAGNINI *et al.*, 2012).

As defensinas, importantes efetores da imunidade inata, são peptídeos catiônicos pequenos produzidos principalmente pelos leucócitos e células epiteliais. De acordo com o tamanho e os padrões de ligação, as defensinas são subdivididas em α , β e γ . No entanto, as beta-defensinas têm sido detectadas em monócitos, macrófagos e células dendríticas, e assim elas não são exclusivamente associadas às células epiteliais (FREGUJA *et al.*, 2012).

As beta-defensinas apresentam estrutura pequena, com menos de 100 aminoácidos, e além de desenvolverem atividade antibacteriana, contribuem na imunidade adaptativa, através da indução da migração e maturação das células imunes (DOMMISCH *et al.*, 2007).

As beta-defensinas fazem parte do sistema imunológico inato, e agem como a primeira linha de defesa. Atualmente, mais de 30 genes de beta-defensinas estavam conhecidos, mas apenas quatro deles são extensamente estudados. O gene da beta-defensina 1 (DEFB1) é constitutivamente expresso numa grande

variedade de tecidos, onde o produto do gene apresenta relação direta como processo inflamatório, graças à sua atividade quimiotática em células dendríticas imaturas e Células T. Além disso, as evidências sugerem que a expressão do gene *DEFB1* pode variar entre os indivíduos, devido à presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) localizada na região do gene regulador (GUIMARÃES et al., 2009).

Variações genéticas podem explicar a susceptibilidade genética a alguns eventos biológicos, estes incluem a predisposição às doenças e a resposta farmacológica (KRUGLYAK, 1997). Os polimorfismos de uma única base (SNPs) são o tipo mais comum de variação e estão presentes em aproximadamente a cada 300 pares de bases através do genoma. Os SNPs podem alterar a transcrição e translação assim como mudar a sequência de aminoácido, e consequentemente, a estrutura e/ou a função da proteína. Estes podem ser utilizados como marcadores para estudos genéticos em humanos para comparar a variação entre as populações, para analisar haplótipos, para determinar a ligação do desequilíbrio entre genes e como marcadores para associação com doenças (JUREVIC et al., 2002).

A hBD-1 é o peptídeo antimicrobiano mais importante do epitélio humano contra infecção e sua expressão é observada na maioria dos tecidos (BARNEA et al., 2008). Vários genes α e β -defensinas são localizados no cromossomo 8p22-23. O gene da beta-defensina-1 (*DEFB1*) está localizado na porção 8p23.2-p23.1 e sua extensão é aproximadamente 8kb (DÖRK; STUHRMANN, 1998; OCA et al., 2006; CAGLIANI et al., 2008).

Um grupo de genes que codificam os peptídeos defensina (α e β) localiza-se no cromossomo 8p23. Os genes *DEFB1* e *DEFB2* codificam os peptídeos hBD-1 (beta-defensina humana 1) e hBD-2 (beta-defensina humana 2), apresentam uma estrutura simples com dois exons apoiados em um íntron. O exon 1 codifica a sequência sinal e o exon 2 codifica os pró-peptídeos e o peptídeo maduro (LIU et al., 1997).

Dois tipos de polimorfismos têm sido identificados nos genes codificadores das defensinas, polimorfismos dos números de cópias (CNPs) e polimorfismos de uma única base (SNPs) (KALUS et al., 2009). O gene *DEFB1* apresenta alguns polimorfismos conhecidos: 322 (-379; T→A), 668 (-44; C→G), 692 (-20; A→G), 1654 (G→A; V371), 1741 (T→A; C66S) e 1836 (A→G; local poly A). Os números entre parênteses referem-se à posição em relação ao início da sequência da proteína (ATG) (JUREVIC et al., 2003).

As β -defensinas além de possuírem atividades antimicrobianas, apresentam ações que providenciam a ligação entre as respostas imune inata e adaptativa, agindo como fator quimiotático das células dendríticas e células T memória (BISSEL et al., 2004), através da ativação do receptor de quimiocinas CCR6. Estudos recentes indicam que os Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) do gene da Beta-defensina podem influenciar na susceptibilidade/resistência a infecções por agentes patógenos; estes SNPs não induzem alterações de aminoácidos, mas podem afetar a expressão gênica (JUREVIC et al., 2003). Três destes SNPs, o rs1800972 C>G, rs1799946 G>A e rs11362 G>A, têm mostrado envolvimento no risco de transmissibilidade do vírus HIV-1 entre mãe e filho e a infecção de recém-nascido pelo HIV-1 (FREGUJA et al., 2012).

Os seres humanos produzem naturalmente vários peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas derivadas do epitélio que tem atividade contra *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Candida sp in vitro*. Alguns microrganismos como *Treponema denticola*, *P. gingivalis* e *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans apresentam algumas cepas que são resistentes às β -defensinas (BRISSETTE; LUKEHART, 2007).

Os polimorfismos da Beta-defensina têm sido estudados para verificação da relação entre eles e algumas patologias, como a Dermatite Atópica (SEGAT *et al.*, 2010), a proteção em relação à transmissibilidade do vírus HIV-1 entre mãe e filho e a infecção de recém-nascido pelo HIV-1 (AGUILAR-JIMÉNEZ *et al.*, 2011; FREGUJA *et al.*, 2012), o Lúpus eritematoso (SANDRIN-GARCIA *et al.*, 2012).

A expressão de três beta-defensinas (hBD-1, hBD-2 e hBD-3) tem sido relatada na mucosa oral, gengiva e glândulas salivares. Bissell *et al.* (2004) avaliaram a expressão do RNAm da hBD-1, hBD-2 e hBD-3 em gengivas saudáveis e com doença periodontal. Tecido gengival descartado de procedimentos periodontais foi obtido de 20 locais periodontalmente saudáveis e de 29 periodontalmente doentes. O RNA total foi isolado e avaliado pela Reação de Polimerase em Cadeia – Transcriptase Reversa (PCR-RT). Todas as 49 amostras demonstraram expressões básicas do RNAm de hBD-1, hBD-2 e hBD-3. Significativamente, maiores níveis de expressões de HBD-3 foram encontrados em tecidos sadios quando comparado aos doentes. Além disso, houve também uma sugestão de maior expressão de hBD-2 em tecidos saudáveis. Os autores concluíram que altos níveis de expressão do RNAm da hBD-3 em tecidos saudáveis, sugere um papel importante de proteção das defensinas na resposta imune a infecções pelos patógenos periodontais.

Infecções da córnea com *Pseudomonas aeruginosa* resulta em perfuração da mesma em ratos susceptíveis, mas não em ratos resistentes. Wu *et al.* (2009) exploraram a relação de duas importantes defensinas (BD1 e BD2) no sistema de defesa imunológica ocular. O RNAm e o nível de expressão da proteína foram testados pela Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (qPCR) e *Western blot*, respectivamente. Para determinar se cada defensina desempenha um papel na resistência, ratos resistentes foram tratados com BD1 ou BD2 pela injeção subconjuntival juntamente com aplicação tópica. A opacidade da córnea aumentada e a agravamento da doença foram exibidos após redução da BD2, mas não da BD1. A BD2 parou também o aumento da contagem bacteriana e de infiltração de neutrófilos polimorfonucleares nas córneas resistentes. Os dados da PCR em tempo real demonstraram que a BD2, não a BD1, modulou diferentemente a expressão do RNAm das moléculas das citocinas pró-inflamatórias. Os dados fornecem evidências que a BD2, mas não a BD1, é requerida para a resistência contra a *P. aeruginosa* nas infecções induzidas de córnea.

Embora a expressão das beta-defensinas 2 (hBD-2) nos odontoblastos de polpas dentárias humanas tenha sido relatado, a produção das hBD-2 e sua regulação permanece pouco compreendida. Kim *et al.* (2010) avaliaram os efeitos das citocinas na indução de produção de hBD-2 e seus mecanismos nas células de polpas dentárias humanas. Após estimulação das células com Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 1 α (IL-1 α), os efeitos destas citocinas na produção de hBD-2 foram avaliados com a Reação de Polimerase em cadeia Transcriptase Reversa (RT-PCR), *Western blot* e teste *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Os resultados mostraram que o TNF- α e IL-1 α , sinergicamente, aumentaram os níveis de RNAm, a expressão da proteína e a atividade da hBD-2. A regulação da hBD-2 pelas citocinas foi atenuada pelo pré-tratamento com inibidores de PKC, JNK, p38, ERK, MAPK, fator nuclear-kB e AMPK. Estes resultados sugerem que o TNF- α e IL-1 α regulam a expressão da hBD-2 nas células de polpas dentária humanas, através dos caminhos da PKC, JNK,

MAPK, p38, ERK, NF- κ B e AMPK. Deste modo, a indução de hBD-2 pelas citocinas inflamatórias podem regular o sistema de defesa da polpa dental.

O papel de β defensina-1 humana (HBD-1) é notável porque o seu gene *DEFB1* é constitutivamente expresso e a sua atividade antimicrobiana é potenciada no ambiente de baixo oxigênio (KELLY et al., 2013).

4.6.2 LECTINA LIGADORA de MANOSE

Há 60 anos, Frank Burnet e John McCrea identificaram três inibidores plasmáticos capazes de inativar o vírus *Influenza*. Hoje, sabe-se que um desses inibidores era uma proteína chamada de Lectina ligadora de manose (MBL), um componente do sistema imune inato (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

A unidade estrutural básica da MBL é um homotrímero, constituído de um polipeptídeo dividido em quatro domínios distintos: um pequeno N-terminal rico em cisteína, seguido por um domínio de colágeno. O terceiro domínio corresponde a uma porção α -hélice, conhecida como “neck”, e finalmente, um domínio C-terminal dependente de cálcio que reconhece oligossacarídeos presentes na superfície dos patógenos. Este domínio é chamado de CRD (*Carbohydrate-Recognition Domain*). Três polipeptídeos idênticos se associam para formar subunidades. A MBL funcional circulante tem eficiência gradativa de acordo com o número de subunidades associadas, ou seja, um hexâmero será mais ativo que um pentâmero, que por sua vez terá atividade maior que um tetrâmero, sucessivamente. Esse aumento na atividade deve-se a uma maior interação entre o domínio CRD da MBL com os oligossacarídeos presentes na superfície dos patógenos, resultando em uma mudança conformacional da proteína e ativação de moléculas associadas à MBL, MASP (*Mannose-Associated Serine Proteases*) (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

A MBL é um dos mais versáteis componentes do sistema imune inato. Há evidências de que a proteína possua pelo menos quatro funções distintas, dentre as quais a ativação do complemento tem sido a mais estudada. 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 manose do complemento independente de um anticorpo (via MBL), sugerindo-se que MBL pode agir diretamente como uma opsonina. A ativação do complexo MBL/MASP ocorre após a ligação da molécula aos resíduos de carboidratos presentes na superfície de diversos microorganismos (GARRED et al., 1997).

Mutações na região que codifica a MBL quebram o conjunto ou a estabilidade dos multímeros, reduzindo a atividade da MBL (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

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 peptídio 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) (TURNER, 2003).

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 MBL2 e níveis séricos danificados têm sido associados com diversas infecções em adultos (SUMMERFIELD et al., 1995). Os sítios polimórficos estão localizados no exon 1: no códon 54 (Gly54Asp), decorrente da troca da glicina pelo ácido aspártico (alelo B); no códon 57 (Gly57Glu), decorrente da troca da glicina pelo ácido glutâmico (alelo C) e no códon 52 (Arg52Cys), 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 (GARRED et al., 1997; ARRAES et al., 2006). Indivíduos que são homozigotos (O/O, onde O pode ser B, C ou D) para um alelo mutante produzem MBL em quantidades indetectáveis por ELISA, enquanto os heterozigotos (A/O) para a mutação possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados com indivíduos homozigotos (A/A) para o alelo selvagem (CALIFANO e SCHENKEIN, 1991).

Tais polimorfismos de uma única base (SNPs) provocam uma redução dos níveis da proteína funcional no soro chegando determinadas circunstâncias não apresentar virtualmente nenhuma MBL sérica (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

Guimarães (2007) avaliou a relação entre polimorfismos de uma única base (SNPs) de dois genes, *MBL2* e *IL-18*, e a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, realizando a genotipagem dos pacientes com a PCR em tempo real. Mutações nesses genes podem aumentar a susceptibilidade às infecções recorrentes. SNPs de 56 pacientes brasileiros HIV positivos foram investigados. Do mesmo modo, foram estudados SNPs em 165 e 104 controles saudáveis, para *MBL2* (exon 1) e *IL-18* (região promotora), respectivamente. Os resultados do gene *MBL2* mostraram frequências diferentes entre os grupos infectados e controle, respectivamente: selvagem (52% vs. 67%), heterozigoto (37% vs. 27%) e mutante (11% vs. 6%). As frequências genotípicas do *IL-18* não mostraram diferenças significativas entre os grupos infectado e controle, respectivamente: selvagem (54% vs. 56%), heterozigoto (34% vs. 36%) e controle (12% vs. 8%). A presença do alelo mutante do gene *MBL2* indica um aumento na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 em pacientes brasileiros. Os autores reportaram que estes resultados podem ser utilizados no desenvolvimento de tratamentos individuais e vacinas contra essa infecção.

Considerações Finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conclusão deste trabalho resultou em um artigo orientado pela Prof^a Dr^a Jurema Freire Lisboa de Castro e co-orientação da Prof^a Dr^a Morgana Eli Vianna, o qual está disposto no apêndice.

REFERÊNCIAS

- AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, 2005.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro Elsevier, 6 edição, 2008, p.3-47.
- AGUILAR-JIMÉNEZ, W.; ZAPATA, W.; RUGELES, M.T. Differential expression of human beta defensins in placenta and detection of allelic variants in the DEFB1 gene from HIV-1 positive mothers. **Biomédica**, v. 31, p. 44-54, 2011.
- ARRAES, L.C.; SOUZA, P.R. de; BRUNESKA, D.; CASTELO FILHO, A.; SOUZA CAVADA, B.; LIMA FILHO, J.L. de; CROVELLA, S. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 719-723, 2006.
- AZUMA, M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. **Journal Periodontal Research**, v. 41, p. 361-373, 2006.
- BARNEA, M.; MADAR, Z.; FROY, O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 452–456, 2008.
- BAUMGARTNER, J.C.; CUENIN, P.R. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **Journal of Endodontic**, v.18, p. 605-12, 1992.
- BISSEL, J.; *et al.* Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 33, p. 278-285, 2004.
- BONIOTTO, M; HAZBÓN, MH; JORDAN, WJ; LENNON, GP; ESKDALE, J; ALLAND, D; GALLAGHER, G. Novel Hairpin-Shaped Primer Assay To Study the Association of the -44 Single-Nucleotide Polymorphism of the *DEFB1* Gene with Early-Onset Periodontal Disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 766–769. 2004.
- BRISSETTE, C.A.; LUKEHART, S.A. Mechanisms of Decreased Susceptibility to β -Defensins by *Treponema denticola*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2307–2315, 2007.
- BULTINK, I.E. *et al.* Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Arthritis Research Therapy**, v. 8, p. R183, 2006.
- CAGLIANI, R.; *et al.* The signature of long-standing balancing selection at the human defensin β -1 promoter. **Genome Biology**, v. 9, n. 9, p. R143, 2008.

CALIFANO, J.V.; SCHENKEIN, H.A.; TEW, J.G. Immunodominant antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and c in high-responder patients. **Oral Microbiology Immunology**, v.6, p. 228-235, 1991.

CAMPOS, M.I.G.; LINE, S.R.P.; CAMPOS, P.S.F. **Análise de polimorfismos genéticos em pacientes com alterações degenerativas da articulação temporomandibular.** / Maria Isabela Guimarães Campos. Piracicaba, SP: [s.n.], 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

CASTAGNINI, M.; PICCHIANTI, M.; TALLURI, E.; BIAGINI, M.; DEL VECCHIO, M.; DI PROCOLO, P.; NORAI, N.; NARDI-DEI, V.; BALDUCCI, E. Arginine-Specific Mono ADP-R Ribosylation In Vitro of Antimicrobial Peptides by ADP-Ribosylating Toxins. **PLoS ONE**. v. 7, n 8, p. 1-7, 2012.

CEDZYNSKI, M.; *et al.* Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, p. 304–311, 2004.

CHUA, K.H.; KEE, B.P.; TAN, S.Y.; LIAN L.H. Interleukin-6 promoter polymorphisms (-174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 42, p. 551-555, 2009.

DETTOGNI, R.S.; SÁ, R.T.; TOVAR, T.T.; LOURO, I.D. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espírito Santo, Brazil. **Molecular Biology Reports**. 2013.

DOMMETT, R.M.; KLEIN, N.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, p.193-209, 2006.

DOMMISCH, H. *et al.* Protease-activated receptor 2 mediates human beta-defensin 2 and cc chemokine ligand 20 mRNA expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4326-4333, 2007.

DÖRK, T.; STUHRMANN, M. Polymorphisms of the human b-defensin-1 gene. **Molecular Cellular Probes**, v. 12, p. 171–173, 1998.

EBERSOLE, J.L. Respostas Imunes nas Doenças Periodontais. In: WILSON TG, KENNETH SK, **Fundamentos da Periodontia**. São Paulo, Quintessence Editora Ltda. 2001. p. 109-158.

ESTRELA, C. Tratamento da Polpa dentária inflamada. In: ESTRELA C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo, Editora Artes Médicas, 2004. p. 87-147.

ESTRELA, C. Diagnóstico e tratamento da periodontite apical. In: ESTRELA C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo, Editora Artes Médicas, 2004. p. 175-233.

FERRARI, P.H.P.; CAI S. O que o Endodontista precisa saber sobre Microbiologia. In: FREGNANI E, HIZATUGU R. **Endodontia Uma Visão Contemporânea**. São Paulo: Santos, 2012. P.161-180.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPHRIES, S. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369-76, 1998.

FREGUJA, R.; GIANESIN, K.; ZANCHETTA, M.; DE ROSSI, A. Cross-talk between virus and host innate immunity in pediatric HIV-1 infection and disease progression. **New Microbiologica**, v. 35, p. 249-257, 2012.

GARRED, P.; *et al.* Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, v. 349, p. 236-240, 1997.

GOMES, B.P.F.A.; PINHEIRO, E.T.; GADÊ-NETO, C.R. *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiology Immunology**, v.19, p. 71-6, 2004.

GUIMARÃES, R.L.; SEGAT, L.; ROCHA, C.R.C.; BRANDÃO, L.A.C.; ZANIN, V.; ARAÚJO, J.; NASLAVSKY, M.S.; LIMA FILHO, J.L.; CROVELLA, S. Functional polymorphisms of DEFB1 gene in type 1 diabetes **Brazilian Children. Autoimmunity**, v. 42, n. 5, p. 406–413, 2009.

GUIMARÃES, R.L. **Estudo de SNPs dos genes MBL-2 e IL-18 por PCR em tempo real e suas relações com a infecção pelo HIV-1.** Trabalho de Conclusão de Curso do Bacharelado em Ciências Biológicas da UFPE. 2007. 64p.

GUTMANN, L.G.L.; LAW, A.S.; HOLLAND, G.R.; ABBOTT, P.V.; RODA R.S. Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. **Journal of Endodontics**, v. 35, n 12, 2009.

HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. e colaboradores. **Imunologia para Odontologia.** Porto Alegre: Artmed, 2006. 312p.

HOLLOX, E.J.; BARBER, J.C.K.; BROOKES, A.J. *et al.* Defensins and the dynamic genome: What we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. **Genome Research**. v. 18, p. 1686-1697, 2008.

IP, W.K.; TO, Y.F.; CHENG, S.K.; LAU, Y.L. Serum Mannose-Binding Lectin Levels and MBL2 Gene Polymorphisms in Different Age and Gender Groups of Southern Chinese Adults. **Scandinavian. Journal of Immunology**, v. 59, p. 310-314, 2004.

JUREVIC, R.J.; *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. **Genetic Testing**, v. 6, p. 261, 2002.

JUREVIC, R.J. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 90, 2003.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. Effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, 20: 340–349. 1965.

KALBURGI, N.B.; BHATIA, A.; BILICHODMATH, S.; PATIL, S.R.; MANGALEKAR SB, BHAT K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. **Journal Oral Science**. v. 52, n. 3, p. 431-7, 2010.

KALUS, A.A.; FREDERICKS, L.P.; HACKER, B.M.; DOMMISCH, H.; PRESLAND, R.B.; KIMBALL, J.R.; DALE, B.A. Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human *DEFB1* gene with expression and inducibility of multiple β -defensins in gingival keratinocytes. **BMC Oral Health**, v. 9, p. 21, 2009.

KELLY, C.J.; GLOVER, L.E.; CAMPBELL, E.L.; KOMINSKY, D.J.; EHRENTAUT, S.F.; BOWERS, B.E.; BAYLESS, A.J.; SAEEDI, B.J.; COLGAN, S.P. Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human β defensin-1. **Mucosal Immunology**. 2013 Mar 6.

KETTERING, J.D.; TORABINEJAD, M.; JONES, S.L. Specificity of antibodies present in human periapical lesions. **Journal of Endodontic**, v. 17, n. 5, p. 213-216, 1991.

KIM, Y.; MIN, K.; LEE, S.; SHIN, S.; SHIN, K.; KIM, E. Effect of proinflammatory cytokines on the expression and regulation of human beta-defensin 2 in human dental pulp cells. **Journal of Endodontic**, 36, 1, January, 2010.

KROEGER, K.M.; CARVILLE, K.S.; ABRAHAM, L.J. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. **Molecular Immunology**, v. 34, n. 5, p. 391-9, 1997.

LIU, L.; *et al.* The human beta defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two families with differing disulfide topology share a common ancestry. **Genomics**, v. 43, p. 316–320, 1997.

LOUIS, E.; FRANCHIMONT, D.; PIRON, A.; GEVAERT, Y.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; ROLAND, S. *ET AL.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, n. 3, p. 401-6, 1998.

MAEKAWA, L.E.; VALERA, M.C.; OLIVEIRA, L.D.; CARVALHO, C.A.T.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. In vitro evaluation of the action of irrigation solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 2, p. 106-12, 2011.

MAGALHÃES, J.F.; CORTINHAS, A.J.; ALBUQUERQUE, C.M.; BAPTISTA, C.S.; RIBEIRO, R.; VIEGAS, C.; MATOS, A.; MACHADO, J.; PIRES, M.A.; GUEDES-PINTO, H.; MARTINS-BESSA, A.; LEITÃO, J.C.; BASTOS, E. Interleukin-6 gene -174G>C and -636G>C promoter polymorphisms and prostate cancer risk. **Molecular Biology Reports**, n.40, p. 449–455, 2013.

MAKHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. **Human Immunology**, v. 59, n. 9, p. 571-9, 1998.

MARTINHO, F.C.; GOMES, B.P.F.A. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. **Journal of Endodontic**, v. 34, p. 268–72, 2008.

MARTINS, MD.; RUSSO, MP. Mecanismos indiretos de atuação dos patógenos periodontais no processo saúde-doença periodontal. In: BRUNETTI MC, **Periodontia Médica**. Uma abordagem integrada. São Paulo. Editora SENAC, 2004. p. 59-88.

MULLIGHAN, C.G.; MARSHALL, S.E.; WELSH, K.I. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, p. 111-122, 2000.

NAIR, P.N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v. 13, p. 121-148, 1997.

NEVILLE, B.; DAMM, D.; ALLEN, C.M. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª edição. Editora Elsevier. 992p.

NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, P.; DEPTULA, W. Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej. (online)**, v. 62, p. 524-529, 2008.

OCA, E.P.; RANGEL-VILALOBOS, R.; GALLEGOS-ARREOLA, M.P.; SANDOVAL, L.; FIGUERA, L.E. SNPs in human β -defensin 1 gene (*DEFB1*): frequencies in a Mexican population and new PCR–RFLPs assays. **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, p. 339–342, 2006.

OLESEN, H.V.; JENSENIUS, J.C.; STEFFENSEN, R.; THIEL, S.; SCHIOTZ, P.O. The manna-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis-disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. **Clinical Immunology**. v.121, n. 3, p. 324-31, 2006.

OLOMOLAIYE, O.; WOOD, N.A.; BIDWELL, J.L. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. **European Journal of Immunogenetics**. v. 25, v. 2/3, p. 267, 1998.

PASTER, B.J.; OLSEN, I.; AAS, J.A.; DEWHIRST, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology 2000**, v. 42, p. 80-7, 2006.

RODRIGUEZ-CARREON, A.A.; ZUNIGA, J.; HERNANDEZ-PACHECO, G.; RODRIGUEZ-PEREZ, J.M.; PEREZ-HERNANDEZ, N.; MONTES DE OCA, J.V. *ET AL.* Tumor necrosis factor- α -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. **Journal of Autoimmunity**, v. 24, n. 1, p. 63-8, 2005.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. P. 1- 21.

ROOD, M.J.; VAN KRUGTEN, M.V.; ZANELLI, E.; van der LINDEN M.W.; KEIJSERS, V.; SCHREUDER, G.M. *et al.* TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**, v. 43, n. 1, p. 129-34, 2000.

SÁ AR, MOREIRA PR, XAVIER GM, SAMPAIO I, KALAPOTHAKIS E, DUTRA WO, GOMEZ RS. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **International Endodontic Journal**, v. 40, p. 563–572, 2007.

SAKAMOTO, M; SIQUEIRA, JF Jr.; RÔÇAS, IN; BENNO, Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiol Immunol**. 22:19-23. 2007.

SALLAKCI, N.; AKCURIN, G.; KOKSOY, S.; KARDELEN, F.; UGUZ, A.; COSKUN, M. *et al.* TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNFalpha production. **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 150-4, 2005.

SALLUM, A.W.; MARTINS, A.G.; SALLUM, E.A. A Doença Periodontal e o surgimento de um novo paradigma. In: BRUNETTI, M.C., **Periodontia Médica. Uma abordagem integrada**. São Paulo. Editora SENAC, 2004. p. 21- 39.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANDRIN-GARCIA, P.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L.; PANCOTO, J.A.T.; DONADI, E.A.; LIMA-FILHO, J.L.; SEGAT, L.; CROVELLA, S. Functional single-nucleotide polymorphisms in the DEFB1 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians. **Lupus**, v. 21, p. 625–631, 2012.

SCHWARTZ, Z.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. A Bioquímica e a Fisiologia do Periodonto. In: WILSON TG, KENNETH SK, **Fundamentos da Periodontia**. São Paulo, Quintessence Editora Ltda. 2001. p. 61-107.

SILVA, L.A.B.; SILVA, R.A.B.; BRANCO, L.G.; NAVARRO, V.P.; NELSON-FILHO, P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, p. 296-300, 2008.

SEGAT, L.; GUIMARÃES, R.L.; BRANDÃO, L.A.C.; ROCHA, C.R.C.; ZANIN, V.; TREVISIOL, C.; LIMA FILHO, J.L.L.; CROVELLA, S. Beta defensin-1 gene (DEFB1) polymorphisms are not associated with atopic dermatitis in children and adolescents from northeast Brazil (Recife, Pernambuco). **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 653–657, 2010.

SONG, G.G.; CHOI, S.J.; JI, J.D.; LEE, Y.H. Association between tumor necrosis factor- α promoter 2308 A/G, 2238 A/G, interleukin-6 2174 G/C and 2572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**. 2013.

SUMMERFIELD, J.A.; RYDER, S.; SUMIYA, M.; THURSZ, M.; GORCHEIN, A.; MONTEIL, M.A.; TURNER, M.W. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. **Lancet**, v. 345, p. 889-889, 1995.

SUNDQVIST G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. 1976. Dissertation. Umea, Sweden: University of Umea, 1976.

SUPER, M. et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonization. **Lancet**, v. 2, p. 1236-1239, 1989.

TANOMARU, J.M.G.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU-FILHO, M.; BONETTI-FILHO, I.; SILVA, L.A.B. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 733-9. 2003.

TROELSEN, L.N. et al. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 56, p. 21-9, 2007.

TSUTSUMI A, TAKAHASHI R, SUMIDA T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 6, p. 364-72, 2005.

TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 423-429, 2003.

VIANNA, M.E.; HORZ, H-P.; CONRADTS, G.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J.; GOMES, B.P.F.A. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiology Immunology**, v. 22, p. 411-8, 2007.

WILSON, A.G.; di GIOVINE, F.S.; BLAKEMORE, A.I.; DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, v.1, n. 5, p. 353, 1992.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; MCDOWELL, T.L.; McDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195-9, 1997.

WORTHLEY, D.L.; BARDY, P.G.; MULLIGHAN, C.G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **International Medicine Journal**, v. 35, p. 548-555, 2005.

WU M, McCLELLAN SA, BARRETT RP, HAZLETT LD. Defensin-2 Promotes Resistance against Infection with *P. aeruginosa*. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 1609-1616, 2009.

YANG, Y.; ZHANG, F.; SLRIP, L.; LEI, H.; WANG, Y.; HU, D.; DING, R. IL-6 gene polymorphisms and CAD risk: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2589–2598, 2013.

YANG, D. *et al.* β -Defensin: linking innate and adaptative immunity through dendritics and T cell CCR6. **Science**, v. 286, p. 525-528, 1999.

APÊNDICE – ARTIGO - ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *hBD-1*, *MBL-2*, *IL-6* E *TNF-α* EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES PULPARES E PERIRRADICULARES

Elvia Christina Barros de Almeida¹ #
Morgana Eli Vianna² #
Jurema Freire Lisboa de Castro³

¹Doutoranda em Clínica Integrada do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Mestre em Clínica Integrada do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Especialista em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Pernambuco – FOP/UPE, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Profª Drª de Endodontia da *University College London – Eastman Dental Institute* em Londres e Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação dos Cursos de Endodontia da *University College London – Eastman Dental Institute* em Londres; Membro externo da equipe de Microbiologia Oral e Imunologia da Universidade RWTH-Aachen na Alemanha;

³Profª Drª Associado da Disciplina de Patologia Oral do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autores para correspondência:

Universidade Federal de Pernambuco:
Av. Profº Moraes Rêgo s/n. Cidade Universitária – Recife – Pernambuco - Brazil
CEP.: 50670-901. Telefone: (81) 2126.8817 / (81) 9922-6542 / (81) 8620-8380.
elvia.barros@globo.com/ elvia.barros@hotmail.com
m.vianna@ucl.ac.uk

RESUMO

A imunidade inata e a imunidade adaptativa são ferramentas fundamentais de resposta do sistema imune contra a invasão microbiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de polimorfismos nos genes da Beta-defensina-1 (hBD-1), da Lectina de Ligação da Manose 2 (MBL-2), da Interleucina 6 (IL-6) e do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) em pacientes portadores de alterações pulpares e perirradiculares. Foram incluídos no estudo 73 pacientes, sendo divididos em 4 grupos: 13 pacientes com Pulpite Irreversível, 12 pacientes com Abscesso Periapical Agudo, 23 pacientes com Periodontite Apical Crônica e 25 pacientes sem tratamento endodôntico realizado (Grupo Controle). Foi realizada a coleta de sangue dos pacientes e extração do DNA das amostras. A genotipagem dos Polimorfismos de Único Nucleotídeo dos genes da hBD-1, da MBL-2, da IL-6 e do TNF- α foi realizada através da Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados demonstraram que os indivíduos com o genótipo *IL-6* GC possuem 5% menos chance de não ter o quadro clínico de Periodontite Apical Crônica ($p = 0,0113$). Conclui-se que o genótipo *IL-6* (-174G/C) GG mostrou-se associado ao desenvolvimento de alterações perirradiculares crônicas na população estudada. Os Polimorfismos dos genes da hBD1(-44C/G), MBL-2 (codons 52, 54 e 57) e TNF- α (-308) não se mostraram associados ao desenvolvimento de alterações perirradiculares na população estudada. Esta pesquisa sugere que fatores genéticos possam estar relacionados com a susceptibilidade para desenvolver alterações perirradiculares.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende em grande parte da eliminação da contaminação microbiana do sistema de canais radiculares, uma vez que os microrganismos desempenham importante papel no desenvolvimento e manutenção das inflamações pulpares e periapicais (1).

Mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos foram detectadas no interior da cavidade oral, dos quais mais de 50% não foram cultivadas (2,3). Cada indivíduo abriga cerca de 100-200 espécies destas 700 já descritas, sinalizando para uma grande diversidade entre as pessoas (4). Apesar de o dente estar inserido nesta cavidade tão séptica, o espaço endodôntico (câmara pulpar e canal radicular) não contém microrganismos, desde que os revestimentos biológicos, esmalte e cimento estejam preservados (5).

Quando bactérias invadem a polpa dentária, inicia-se um processo inflamatório agudo, inespecífico, ou seja, independente do tipo de agente agressor. Esta resposta tem como objetivo localizar e eliminar o antígeno, remover os tecidos degenerados e preparar a área injuriada para a reparação tecidual (6).

Quando, no entanto, os agentes biológicos não são retirados, a inflamação pulpar amplia-se e a circulação de retorno compromete-se, o tecido agora necrosado tem enorme potencial de se tornar contaminado. Assim, microrganismos que conseguem ali chegar não encontram resistência imunológica e sim nutrientes, resultando em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (5,7).

Caso os microrganismos e seus produtos tóxicos não sejam retirados pelo tratamento endodôntico, continuarão agredindo o ligamento periodontal que não terá outra alternativa que não a solicitação de mais células e elementos de defesa,

porém, só este espaço do ligamento periodontal não será mais suficiente. Assim, células ósseas clásticas são sinalizadas quimicamente, por meio de macrófagos ativados, os quais liberam mediadores químicos, tais como interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , com a finalidade de reabsorver tecido ósseo, para que mais células do sistema imunológico possam se concentrar formando então a Periodontite Apical ou Lesão Apical (5, 8, 9,10,11).

Polimorfismos foram descritos nos genes da IL-6, cujos alelos específicos foram associados a uma maior expressão das respectivas citocinas (12). Assim, a tecnologia de genotipagem poderá ser usada em exames para averiguar deficiências genéticas dos pacientes, facilitando a escolha do tratamento adequado para cada indivíduo. Esta terapia teria uma grande vantagem, pois estimularia a resposta imune do próprio indivíduo e apresentaria uma defesa contra vários patógenos, como bactérias, fungos e parasitas (13). O mapeamento dos SNPs em genes potencialmente envolvidos nas respostas imunitárias pode ajudar a compreender a fisiopatologia das doenças infecciosas em regiões geográficas específicas (14).

Diante do importante papel da imunidade na defesa do organismo contra infecções, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de polimorfismos nos genes da Beta-defensina-1 (hBD-1), da Lectina de Ligação da Manose 2 (MBL-2), da Interleucina 6 (IL-6) e do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) possivelmente envolvidos nas alterações pulpares e perirradiculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

Esta pesquisa foi realizada em conformidade com as leis atuais do Brasil e cumpriu todos os critérios exigidos pelo Código de Ética Odontológico do Conselho Federal de Odontologia e a declaração de Helsinque (1964), sendo aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo nº 282/10, aprovado em 14 de setembro de 2010, Of. Nº. 244/2010 – CEP/CCS/UFPE - ANEXO 02). Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar da pesquisa de forma livre e voluntária.

Amostra

Foram avaliados 265 pacientes, da Clínica Integrada do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, que necessitavam de tratamento endodôntico, destes 73 pacientes foram incluídos no estudo, sendo divididos em 4 grupos: 48 pacientes foram incluídos nos grupos de estudo, e 25 pacientes, sem tratamento endodôntico realizado, formaram o grupo controle.

Para ser incluído na pesquisa, o paciente deveria apresentar os critérios a seguir: apresentar um dos Diagnósticos Clínico-Radiográfico: Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo ou Periodontite Apical Crônica; idade entre 18 e 65 anos. Como critérios de exclusão: pacientes com alterações sistêmicas; usuário de drogas; pacientes com o sistema imunológico alterado por infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou doenças metabólicas, discrasias sanguíneas,

tratamento quimioterápico ou radioterápico e transplante.

Os pacientes do grupo de estudo foram divididos em 3 grupos: Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica. A classificação dos pacientes nos grupos foi baseada nos sinais e sintomas (15). No grupo dos pacientes com Pulpite Irreversível, estes apresentavam presença de dor, geralmente, de moderada a grave, espontânea, contínua, persistente, localizada ou difusa. No grupo com Abscesso Periapical Agudo, consistia de indivíduos com sinais e sintomas moderados a severos, que incluíam edema intraoral ou exsudação via canal radicular, ou ambos; inchaço, calor, edema, ocasionalmente febre e/ou linfadenopatia. Dor à percussão vertical, diferentes graus de mobilidade, ausência de sintomatologia ao frio, calor e ao teste elétrico, e no exame radiográfico periapical, havia um ligeiro espessamento do espaço referente ao ligamento periodontal a uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical. No pacientes, que apresentavam Periodontite Apical Crônica, não havia sinais e sintomas como os descritos anteriormente, havia uma imagem radiolúcida, sugestiva de lesão periapical; sem ou com ligeira sensibilidade à percussão vertical; o dente não respondia aos testes térmico e elétrico e o paciente não relatou sintomatologia dolorosa anteriormente. O diagnóstico foi feito em um dente por paciente.

No exame clínico, foi verificada a vitalidade pulpar, através do teste ao frio com o gás refrigerante (*Roeko Endo-Frost*[®], Coltène/Whaledent, Ohio, EUA) e ao teste elétrico (*Pulp Tester Digital*[®], Odous de Deus, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Uma ficha específica com informações pessoais dos pacientes foi preenchida. Durante os esclarecimentos sobre a pesquisa, foi apresentado aos pacientes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual registraram sua intenção de participar da pesquisa, através da assinatura do Termo.

Nos pacientes dos grupos de estudo, foi realizado o tratamento endodôntico e a coleta do material genético, através da coleta de sangue, com o objetivo de avaliar a presença de Polimorfismos dos genes *hBD-1*, *MBL 2*, *IL-6* e *TNF- α* .

O grupo controle foi formado por pacientes que não apresentavam elementos dentários com tratamento endodôntico realizado, nem alterações sistêmicas. Nos prontuários destes pacientes, foram preenchidos os dados pessoais e os relacionados a sua saúde em geral. Nestes pacientes foi realizada a coleta do material genético, através da coleta de sangue, com o objetivo de avaliar a presença de Polimorfismos nos genes *hBD-1*, *MBL 2*, *IL-6* e *TNF- α* .

Os polimorfismos das proteínas da imunidade inata foram identificados através da PCR em tempo real (qPCR). As técnicas utilizadas através da qPCR foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE, Recife, PE, Brasil.

Extração do DNA

As amostras clínicas obtidas através da coleta do sangue humano foram colocadas em tubos estéril de 4 mL contendo EDTA, para ser feita a extração do DNA genômico. A técnica utilizada para a extração do DNA (16) foi modificada pela exclusão da proteinase K. Em 400 μ L de amostra de sangue total foram adicionados soluções (300 μ L de Lise de membrana celular - 0,32M Sacarose; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂ 1% Triton-X 0,3% de HCl) e 300 μ L de Lise de núcleo [10 mM Tris (pH = 8,2); 400 mM NaCl; 2mM EDTA]. Esta mistura foi incubada por 1h30 minutos a 55°C. Posteriormente, foi adicionado 300 μ L de fenol equilibrado (pH $\pm$ 8), homogeneizado em vórtex e centrifugado (6500 rpm/15min) por duas vezes. Em

outro tubo de 2mL, foi adicionado ao sobrenadante desta centrifugação, isopropanol a 100% (1:1). Em seguida, foi homogeneizado (por inversão, 30x). Esta mistura foi centrifugada (13.000 rpm/15min), em seguida o sobrenadante foi descartado, restando um sedimento no tubo (*pellet*). Este sedimento foi lavado com 200µL de etanol a 70% e então novamente centrifugado (13.000 rpm/15min). O sedimento foi ressuspenso com 100µL de tampão de reidratação (10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM EDTA, pH 8.0). Após a extração, as amostras armazenadas em temperatura de -20°C. A qualidade do DNA extraído foi avaliado pelo espectrofotômetro *NanoDrop 2000™* (Thermo Fisher Scientific - Wilmington, Delaware USA), mostrando-se adequada para análise.

Polimorfismo -44 (G>G) do gen *hBD1*

O gene *hBD1* está localizado no cromossomo 8: 8p23.1-p22. A detecção do polimorfismo do gene da beta-defensina 1 foi realizada pela Técnica de *Harping* (17), utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), com o *Master Mix Sybr Green 2X* (Ludwig Biotecnologia Ltda, Centro de Biotecnologia da UFRGS, Alvorada, RS, Brasil).

Polimorfismo 54, 57, e 52 do gene *MBL-2*

Os Polimorfismos do gene *MBL-2* estão nos códons 54, 57, e 52, 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). A detecção do polimorfismo do gene da MBL2 foi identificada através das curvas de Melting, utilizando a qPCR (18).

Polimorfismo -174 (G>C) do gene *IL6*

A identificação do polimorfismo -174 (G/C) do gene *IL-6* foi realizada pela Técnica *High Resolution Melt* (HRM) – qPCR. Em cada reação utilizou-se *Master Mix 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix* (no ROX) contendo BSA (Albumina Sérica Bovina) (Solis BioDyne®, Tartu, Estônia), 0,7pmol/uL(uM) de cada *primer*, 2 µL de DNA genômico (200ng).

Polimorfismo -308 (G>A) do gene *TNF alfa*

A identificação do polimorfismo -308 (G/A) do gene *TNFα* foi realizada pela Técnica *High Resolution Melting* (HRM) – qPCR. Em cada reação utilizou-se 1x *Master Mix 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix* (no ROX) contendo BSA (Solis BioDyne®, Tartu, Estônia), 0,7pmol/uL(uM) de cada *primer*, 2uL de DNA genômico (200ng).

A descrição de todos os oligonucleotídeos dos polimorfismos pesquisados, sequências e perfis térmicos da qPCR estão na Tabela 1. Todos os ciclos de qPCR foram realizados no *Rotor Gene Q* (QIAGEN, Hilden, Germany).

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de cada polimorfismo estudado foi calculado, tanto para os grupos de estudo como para o grupo controle, com auxílio do programa BioEstat 5.3. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* determina a distribuição de genótipos homozigotos e heterozigotos de um polimorfismo em uma determinada população. Neste estudo, os genótipos de cada polimorfismo estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Análise Estatística

As frequências genotípicas foram analisadas para avaliar se as amostras se encontram dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado para *Odds Ratio* (teste de *Mantel-Haenszel*). Esta relação de proporcionalidade foi analisada de acordo com *Odds Ratio* em relação às alterações pulpares/periapicais em comparação com indivíduos controles.

O software utilizado para análise dos dados foi o BioStat 5.3, e o alfa adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A Tabela 02 mostra as Frequências Genotípicas dos Polimorfismos dos Genes -44 *hBD1*, -176 *IL-6*, -308 *TNF- α* e 52, 54, 57 *MBL-2* nos Pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica.

Em relação aos genes -44 *hBD1*, 52, 54, 57 *MBL-2* e -308 *TNF- α* , não houve associação entre os genótipos e os diagnósticos das alterações pulpares e perirradiculares.

Quanto ao gene -176 *IL-6*, os resultados mostraram que os indivíduos com o genótipo *IL-6* GC possuem 5% menos chance de não ter o quadro clínico de Periodontite Apical Crônica ($p = 0,0113$), ou seja, o genótipo apresentou-se como fator de proteção (95%) ao desenvolvimento da alteração perirradicular crônica.

Quanto à frequência dos alelos nos genes *hBD1*, *IL-6*, *TNF- α* e *MBL-2* nos pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica, não houve associação dos alelos com os diagnósticos das alterações pulpares e perirradiculares analisados (Tabela 03).

Tabela 01. Descrição dos Oligonucleotídeos, Sequências e Perfis térmicos da qPCR.

Gene	Oligonucleotídeos e Sequências (5'→ 3')	Referência	DNA Alvo (tamanho em bp)	Perfil do Ciclo
<i>hBD1</i> (-44C/G) rs1800972	hBD1 (F-C) 5'-GGCTGGACCTCCAAtGGAGCCAGCC-3' hBD1 (F-G) 5'-CGCTGGACCTCCAAtGGAGCCAGCG-3' hBD1 (R) 5'- CAGGATTTTCAGGAActGGGGAG-3'	(17)	45 bp	94°C/15min 70°C/30s Ciclo A 10x (72°C/30s; 94°C/20s;69°C/30s, touchdown 1°C) Ciclo B 40x((72°C/30s; 94°C/20s;60°C/30s)
<i>MBL-2</i> (codons 52, 54 e 57)	MBL2 (F) 5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3' MBL2 (R) 5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'	(18)	90bp	95°C/12 min 45 ciclos (95°C/30s; 60°C/60s)
<i>IL-6</i> (-174G/C) rs1800795	IL-6 (F) 5'-CGACCTAAGCTGCACTTTTCC-3' IL-6 (R) 5'-CCTTATTAAGATTGTGCAATGTG-3' (Seq F IL16- C) 5'- CGACCTAAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCA CATTGCACAATCTTAATAAGGT-3' (Seq R IL16-G) 5'- CGACCTAAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCA CATTGCACAATCTTAATAAGGT-3'		77bp	95°C/12 min 45 ciclos (95°C/30s; 60°C/20s;72°C/25s)
<i>TNF-alfa</i> (-308G/A) rs1800629	TNF alfa F (-308) 5'-CAAAAGAAATGGAGGCAATAGGT-3' TNF alfa R (-308) 5'-ACTGATTTGTGTGTAGGACCCT-3' (Seq G TNF alfa) 5'- CAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCAGCCTC CAGGGTCCTACACACAAATCAGT-3' (Seq A TNF alfa) 5'- CAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATAGGGACGGGGTTCAGCCTC CAGGGTCCTACACACAAATCAGT-3'		77bp	95°C/12 min 45 ciclos (95°C/15s; 60°C/20s;72°C/25s)

Tabela 02 - Frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes *hBD1*, *IL-6*, *TNF-α* e *MBL-2* nos pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica.

Genótipos	PI (n=13)	OR	IC _{95%}	p	APA (n=12)	OR	IC _{95%}	p	CAP (n=23)	OR	IC _{95%}	p	CONTROLE (n=25)
-44 hBD1	EHW = 0,1841				EHW = 0,0034				EHW = 0,5049				EHW = 0,0719
GG	0	1	Referência		0	1	referência		4	1	referência		4
CG	7	-	-	-	11	-	-	-	13	1,30	0,2740-6,2404	0,9496	17
CC	6	0,00	-	0,1466	1	0,00	-	0,9054	6	0,66	-	0,9577	4
CG + CC	19	0,36	0,1317-1,03,7	0,0914	13	0,8462	0,3189-2,2450	0,9304	25	0,84	0,3765-1,8740	0,8247	25
- 174 IL6	EHW = 0,0028				EHW = 0,0854				EHW = 0,1013				EHW = 0,0103
CC	4	1	Referência		5	1	referência		1	1	referência		8
GC	1	3	-	0,7118	3	1,25	0,2107-7,4142	0,8377	14	0,05	0,0054-0,05281	0,0113	6
GG	8	0,68	0,1524-3,1018	0,9125	4	1,71	0,3472-8,5081	0,7942	8	0,17	0,0178-1,6630	0,2275	11
GC + GG	17	0,67	0,2523-1,7992	0,5866	11	1,50	0,5656-3,9998	0,5678	30	0,67	0,2976-1,5483	0,4754	28
-308 TNF α	EHW = 0,1402				EHW = 0,1659				EHW = 0,8622				EHW = 0,6859
AA	1	1	Referência		1	1	referência		5	1	referência		3
GA	2	1,66	-	0,7115	2	1,66	-	0,7115	11	1,51	0,2858-8,0327	0,94226	10
GG	10	0,40	0,0358-4,4705	0,8324	9	0,44	0,0394-5,0113	0,9113	7	2,85	0,5177-15,7679	0,4231	12
GA + GG	22	0,38	0,1141-1,13085	0,1984	20	2,35	0,6898-8,0260	0,2667	25	1,78	0,7780-4,0955	0,2448	34
52,54,57 MBL2	EHW = 0,3906				EHW = 0,4884				EHW = 0,7179				EHW = 0,0921
OO	0	1	Referência		0	1	referência		1	1	referência		1
AO	8	0,00	-	0,7180	4	0,00	-	0,4416	13	1,15	-	0,5249	15
AA	5	0,00	-	0,7144	8	0,00	-	0,9084	9	-	-	-	9
AA+AO	18	0,86	0,3118-2,3874	0,9784	20	0,38	0,1143-1,3185	0,2031	31	0,94	0,4015-2,1975	0,9424	33

PI, Pulpite Irreversível; APA, Abscesso Periapical Agudo; CAP, Periodontite Apical Crônica; OR, Odds Ratio; IC_{95%}, Intervalo de confiança de 95%; hBD1, Beta-defensina; IL-6, Interleucina 6; TNF-α, Fator de Necrose Tumoral alfa; MBL-2, Lectina de Ligadora de Manose 2; EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 03 - Frequências dos alelos nos genes *hBD1*, *IL-6*, *TNF-α* e *MBL-2* nos pacientes com Pulpite Irreversível, Abscesso Periapical Agudo e Periodontite Apical Crônica.

Alelos	PI (n=26)	OR	IC _{95%}	p	APA (n=24)	OR	IC _{95%}	p	CAP (n=46)	OR	IC _{95%}	p	CONTROLE (n=50)
-44 <i>hBD1</i>													
C	19				13				25				25
G	7	2,71	0,9702-7,5934	0,0914	11	1,18	0,4454-3,1355	0,9304	21	1,19	0,5336-2,6560	0,8247	25
- 174 <i>IL6</i>													
G	17				11				30				28
C	9	1,48	0,5558-3,9629	0,5866	13	0,67	0,2500-1,7680	0,5678	16	1,47	0,6459-3,3604	0,4754	22
-308 <i>TNF α</i>													
G	22				20				25				34
A	4	2,59	0,7642-8,7658	0,1984	4	2,35	0,6898-8,0260	0,2667	21	0,56	0,2442-1,2854	0,2448	16
52,54,57 <i>MBL2</i>													
A	18				20				31				33
O	8	1,16	0,4189-3,2075	0,9784	4	2,58	0,7584-8,7477	0,2031	15	1,06	0,4551-2,4908	0,9424	17

PI, Pulpite Irreversível; APA, Abscesso Periapical Agudo; CAP, Periodontite Apical Crônica; OR, *Odds Ratio*; IC_{95%}, Intervalo de confiança de 95%; *hBD1*, Beta-defensina; *IL-6*, Interleucina 6; *TNF-α*, Fator de Necrose Tumoral alfa; *MBL-2*, Lectina de Ligadora de Manose 2; EHW, Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Seguem as figuras das Curvas de amplificação referentes aos Genótipos da hBD1 GG (Figura 1), CG (Figura 2), CC (Figura 3) e as Curvas de melting referentes aos Genótipos da MBL-2 (Figura 4), da IL-6 (Figura 5) e do TNF- α (Figura 6).

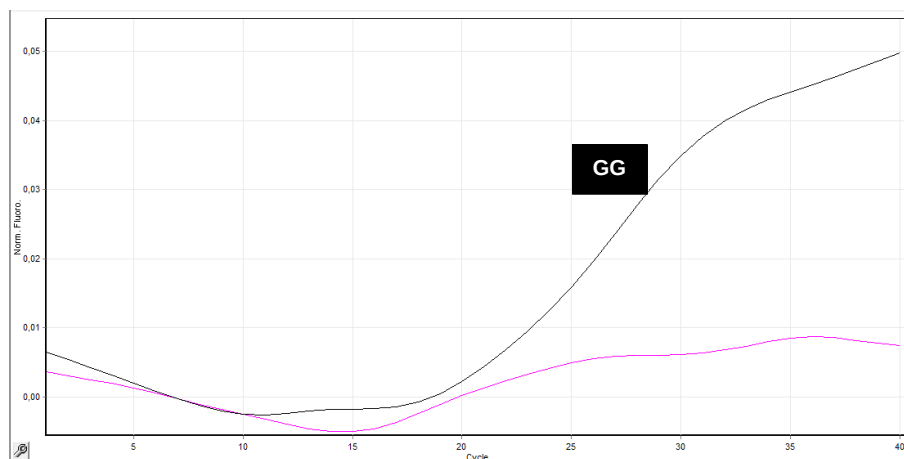


Figura 1: Curva de amplificação referente a amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 GG (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).

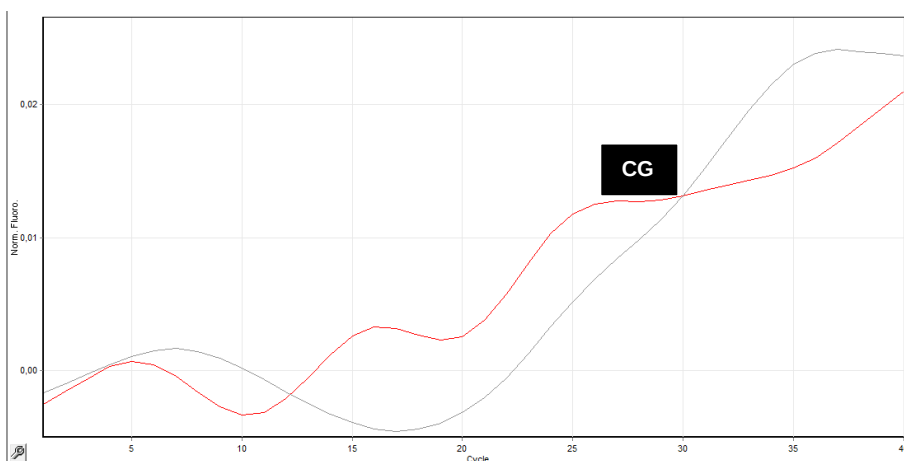


Figura 2: Curva de amplificação da amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 CG (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).

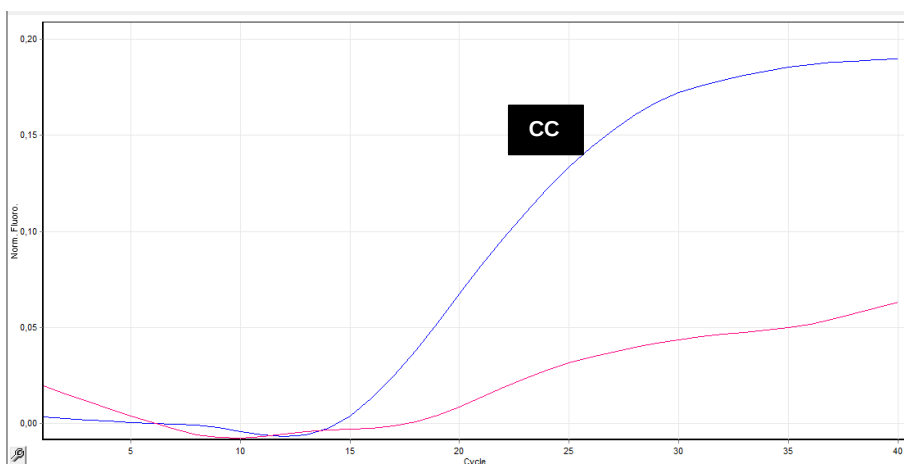


Figura 3: Curva de amplificação da amostra de um paciente do Grupo da Periodontite Apical Crônica do Genótipo hBD1 CC (*Rotor Gene Q Series Software*, QIAGEN, Hilden, Germany).



Figura 4: Curvas de melting referentes às amostras com os genótipos AA, AO e OO do gene da MBL-2. A imagem que apresenta “pico duplo” refere-se ao genótipo AO (Rotor Gene Q Series Software, QIAGEN, Hilden, Germany).

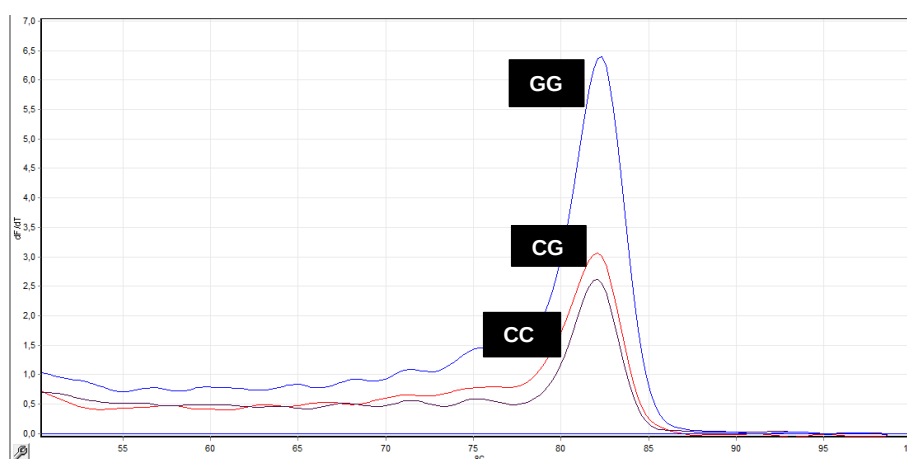


Figura 5: Curva de melting produzidas pela derivada da temperatura e da fluorescência pela temperatura, na análise dos genótipos da IL-6 (GG, CG e CC) (Rotor Gene Q Series Software, QIAGEN, Hilden, Germany).

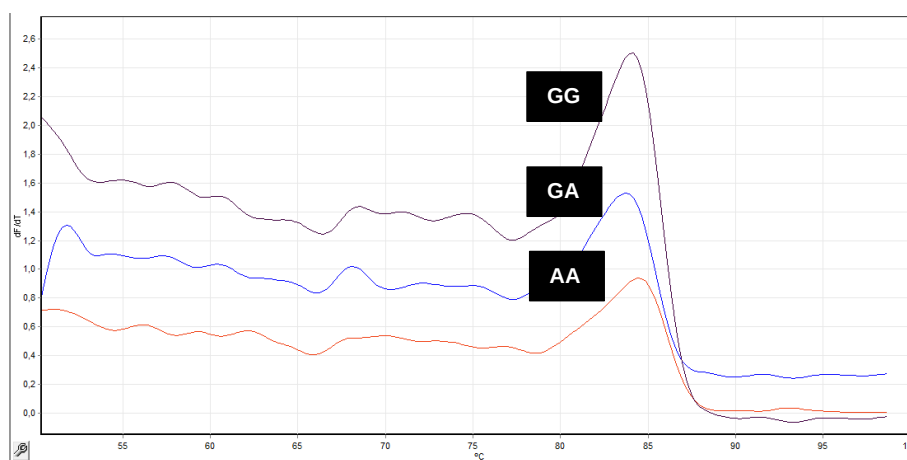


Figura 6: Curvas de melting produzidas pela derivada da temperatura e da fluorescência pela temperatura, na análise dos genótipos do TNF- α (GG, GA e AA) (Rotor Gene Q Series Software, QIAGEN, Hilden, Germany).

DISCUSSÃO

Este estudo clínico/laboratorial teve como objetivo caracterizar uma amostra da população de Recife/PE/Brasil em relação a quatro SNPs em genes importantes para a resposta imunológica diante de alterações pulpares e perirradiculares.

O gene humano que codifica a IL-6 está localizado no braço curto do cromossomo 7 e consiste de 5 exons e 4 introns. Na posição -174 do seu promotor, foi descrito um SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina (G) por uma base C (citosina) (19), que resulta em alterações na transcrição da IL-6 e aumento dos seus níveis plasmáticos (12).

Polimorfismos foram descritos nos genes da IL-6 cujos alelos específicos foram associados a uma maior expressão das respectivas citocinas (12), bem como, à severidade e/ou pré-disposição a doenças de natureza inflamatória e degenerativa, como a artrite reumatóide (20) e artrite crônica juvenil (12). Alguns autores (12, 21, 22) observaram associação de níveis aumentados de IL-6 e doenças sistêmicas com os genótipos G/G e C/G quando comparados ao genótipo C/C, enquanto que outros autores (23, 24) observaram uma relação oposta.

Na Medicina, o polimorfismo da Interleucina-6 (IL-6) tem sido amplamente investigado. Alguns autores encontraram associação do polimorfismo da IL-6 (-174G/C) com doença coronariana (25, 26, 27), lupus eritematoso sistêmico (28), artrite reumatóide (29). Outros pesquisadores não encontraram associação do polimorfismo da IL-6 (-174G/C) com lupus eritematoso sistêmico (30), câncer de próstata (31), diabetes mellitus tipo 1 (32).

Na Odontologia, na especialidade da Periodontia, há alguns estudos em relação ao polimorfismo do gene -174G/C *IL-6*. Alguns autores (33) observaram que o genótipo G/G foi significativamente mais frequente no grupo com periodontite crônica e que o genótipo C/C foi significativamente mais frequente no grupo controle ($P = 0,0069$ para ambos). O alelo G foi mais frequente em pacientes com periodontite crônica (76,67%), enquanto que o alelo C foi mais frequente no grupo de controle (73,33%). Entre os pacientes com periodontite crônica, a chance de ter o alelo G, em comparação com os controles, foi de 9.04. Nesta população, a presença do genótipo de IL-6 (-174) G/G pode aumentar a susceptibilidade a periodontite, enquanto que o genótipo C/C pode ter um efeito protetor. Em outro estudo, através de uma metanálise, os autores (34) concluíram que o alelo *IL-6* -174 G não modifica o risco da periodontite crônica, mas aumenta o risco da periodontite agressiva. Através de outra metanálise, os autores (35) concluíram que o polimorfismo do gene -174 G/C *IL-6* pode conferir suscetibilidade à periodontite em brasileiros. Contrariamente a estes resultados, outros autores (36) realizaram um estudo e não observaram associação da doença periodontal e o polimorfismo do gene -174G/C *IL-6*.

Pesquisando o polimorfismo do gene *IL-6* (-174G/C) em pacientes com Distúrbio Têmporo-Mandibular (DTM), os autores (37) observaram que indivíduos portadores do alelo C e do genótipo C/G apresentaram um risco 1,60 e 1,98 vezes maior em desenvolver DTM, respectivamente. O presente estudo mostra que polimorfismos nos genes da IL-6 estão associados ao desenvolvimento de DTMs na população estudada e corrobora evidências anteriores de que fatores psicológicos, locais e sistêmicos devem atuar em conjunto no desenvolvimento de DTMs.

Nesta pesquisa, realizada em uma população do Brasil, os resultados demonstraram que os pacientes com o genótipo IL6 - GC têm 5% menos chance de

não desenvolver a Periodontite Apical Crônica, ou seja, o genótipo apresentou-se como fator de proteção (95%) ao desenvolvimento da alteração perirradicular crônica. Em outra pesquisa, os autores (38) demonstraram uma associação significativa entre a ocorrência do genótipo GG ou a expressão do alelo G do locus -174 (G/C) do gene *IL-6* e a presença de abscesso periapical agudo. Então, pode-se sugerir que fatores genéticos possam estar associados à susceptibilidade para o desenvolvimento de alterações perirradiculares, tanto crônicas como agudas.

Essas variações genéticas indicam a necessidade de se caracterizar as populações em relação aos SNPs dos genes importantes para o sistema imunológico, em várias regiões do mundo. Esta é a primeira pesquisa que se propõe a mapear geneticamente uma amostra de uma população, dos SNPs da *hBD1*, *MBL-2*, *IL-6* e *TNF-α* em relação às alterações pulpares e perirradiculares. Isso é importante porque avaliar a diversidade genética de componentes do sistema imune pode gerar conhecimento relevante para a compreensão da forma como a população responde as doenças inflamatórias e/ou infecciosas.

Como sugestões para pesquisas futuras, a avaliação da expressão gênica das proteínas da imunidade inata e das citocinas e a identificação da microbiota do sistema de canais radiculares pela qPCR, nos diagnósticos avaliados podem contribuir para um maior entendimento das doenças pulpares e perirradiculares e do sistema de defesa.

CONCLUSÕES

- O genótipo *IL-6* (-174G/C) GG mostrou-se associado ao desenvolvimento de alterações perirradiculares crônicas na população estudada;
- Os polimorfismos dos genes da *hBD1* (-44C/G), da *MBL-2* (codons 52, 54 e 57) e do *TNF-α* (-308G/A) não se mostraram associados ao desenvolvimento de alterações perirradiculares na população estudada;
- Esta pesquisa sugere que fatores genéticos possam estar relacionados com a susceptibilidade para desenvolver alterações perirradiculares.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Virologia do LIKA/UFPE, onde foi realizada a parte laboratorial da pesquisa (Prof^a Dr^a Maria Rosângela Duarte Coêlho).

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo do Doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ.** 1965. Effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **20**:340–349.
2. **Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE.** 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5721–5732.
3. **Sakamoto M, Siqueira JF Jr., Rôças IN, Benno Y.** 2007. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* **22**:19-23.
4. **Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE.** 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* **42**:80-7.
5. **Ferrari PHP, Cai S.** 2012. O que o Endodontista precisa saber sobre Microbiologia. P.161-180. *In*: FREGNANI E, HIZATUGU R. Endodontia Uma Visão Contemporânea. São Paulo: Santos.
6. **Nair PN.** 1997. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* **13**:121-148.
7. **Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-neto CR. et al.** 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* **19**:71-6.
8. **Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA.** 2007. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* **22**:411-8.
9. **Martinho FC, Gomes BPFA.** 2008. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *JOE.* **34**:268–72.
10. **Silva LAB, Silva RAB, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P.** 2008. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dental J.* **19**:296-300.
11. **Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC.** 2011. In vitro evaluation of the action of irrigation solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J. Appl. Oral Sci.* **19**:106-12.
12. **Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S. et al.** 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**:1369-76.
13. **Guimarães RL, Segat L, Rocha CRC, Brandão LAC, Zanin V, Araújo J, Naslavsky MS, Lima Filho JL, Crovella S.** 2009. Functional polymorphisms of DEFB1 gene in type 1 diabetes. *Brazilian Children. Autoimmunity.* **42**:406–413.
14. **Dettogni RS, Sá RT, Tovar TT, Louro ID.** 2013. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espírito Santo, Brazil. *Molec. Biol. Rep.*
15. **Gutmann LGL, Law AS, Holland GR, Abbott PV, Roda RS.** 2009. Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *JOE.* **35**:12.
16. **Sambrook J, Russell DW.** 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
17. **Boniotto M, Hazbón MH, Jordan WJ, Lennon GP, Eskdale J, Alland D, Gallagher G.** 2004. Novel Hairpin-Shaped Primer Assay To Study the

- Association of the -44 Single-Nucleotide Polymorphism of the *DEFB1* Gene with Early-Onset Periodontal Disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 766–769.
18. **Arraes LC, Souza PR de, Brunaska D, Castelo Filho A, Souza Cavada B, Lima Filho JL de, Crovella S.** 2006. 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. **39**:719-723.
 19. **Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL.** 1998. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. Eur. J. Immunogenet. **25**:267.
 20. **Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D.** 1995. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Dis. Markers. **12**:127-33.
 21. **Pola R, Flex A, Gaetani E, Lago AD, Gerardino L, Pola P. et al.** 2002. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with Alzheimer's disease in an Italian population. Neuroreport. **13**:1645-7.
 22. **Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD et al.** 2003. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. Hum. Genet. **112**:409-13.
 23. **Revilla M, Obach V, Cervera A, Davalos A, Castillo J, Chamorro A.** 2002. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. Neurosci. **324**:29-32.
 24. **Rea IM, Ross OA, Armstrong M, Mcnerlan S, Alexander DH, Curran MD et al.** 2003. Interleukin-6-gene C/G 174 polymorphism in nonagenarian and octogenarian subjects in the BELFAST study. Reciprocal effects on IL-6, soluble IL-6 receptor and for IL-10 in serum and monocyte supernatants. Mech. Ageing Dev. **124**:555-61.
 25. **Yang D. et al.** 1999. β -Defensin: linking innate and adaptative immunity through dendritics and T cell CCR6. Science. **286**:525-528.
 26. **Chen Z, Qian Q, Tang C, Ding J, Feng Y, MA G.** 2013. Association of two variants in the interleukin-6 receptor gene and premature coronary heart disease in a Chinese Han population. Molec. Biol. Rep. **40**:1021–1026.
 27. **Phulukdaree A, Khan S, Ramkaran P, Govender R, Moodley D, Chuturgoon AA.** 2013. The Interleukin-6 - 147 G/C Polymorphism Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Disease in Young South African Indian Men. Metab. Syndr. Relat. Disord. **11**:3.
 28. **Lee YH, Lee HS, Choi SJ, Ji JD, Song GG.** 2012(a). The association between interleukin-6 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Lupus. **21**:60–67.
 29. **Lee YH, Bae S-C, Choi SJ, Ji JD, Song GG.** 2012(b). The association between interleukin-6 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Inflammat Res. **61**:665–67.
 30. **Chua KH, Kee BP, Tan SY, Lian LH.** 2009. Interleukin-6 promoter polymorphisms (-174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus. Braz. J. Med. Biol. Res.. **42**:551-555.
 31. **Magalhães JF, Cortinhas AJ, Albuquerque CM, Baptista CS, Ribeiro R, Viegas C, Matos A, Machado J, Pires MA, Guedes-Pinto H, Martins-Bessa A, Leitão JC, Bastos E.** 2013. Interleukin-6 gene -174G>C and -636G>C promoter polymorphisms and prostate cancer risk. Molec. Biol. Rep. **40**:449–455.

32. **Yin Y-W, Sun Q-Q, Zhang B-B, Hu A-M, Wang Q, Liu H-L, Hou Z-Z, Zeng Y-H, Xu R-J, Shi L-B.** 2013. The lack of association between interleukin-6 gene -174 G/C polymorphism and the risk of type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis of 18,152 subjects. *Gene*. **515**:461–465.
33. **Kalburgi NB, Bhatia A, Bilichodmath S, Patil SR, Mangalekar SB, Bhat K.** 2010. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *J. Oral Sci.* **52**:431-7.
34. **Shao M, Huang P, Cheng R, Hu T.** 2009. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **10**:920-927.
35. **Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH.** 2013. Association between tumor necrosis factor- α promoter 2308 A/G, 2238 A/G, interleukin-6 2174 G/C and 2572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Molec. Biol. Rep.*
36. **Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JAR, Gomez RS, Costa JE, Moreira PR.** 2013. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiol.* **218**:1012–1017.
37. **Campos MIG, Line SRP, Campos PSF.** Análise de polimorfismos genéticos em pacientes com alterações degenerativas da articulação temporomandibular. / Maria Isabela Guimarães Campos. Piracicaba, SP: [s.n.], 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
38. **Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS.** 2007. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int. Endod. J.* **40**:563–572.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

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

Of. N.º 244/2010 - CEP/CCS

Recife, 14 de setembro de 2010

Registro do SISNEP FR – 362569

CAAE – 0283.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 282/10

Título: Estudo de possíveis Marcadores Genéticos e Inflamatórios na Susceptibilidade às Pulpites Sintomáticas e aos Abscessos Periapicais Agudos.

Pesquisador Responsável: Elvia Christina Barros de Almeida

Senhor(a) Pesquisador(a):

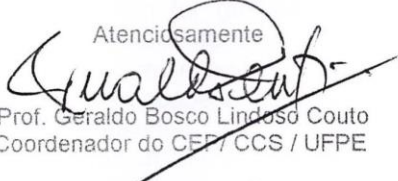
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 14 de setembro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



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

A

Doutoranda Elvia Christina Barros de Almeida
Doutorado em Clínica Integrada – CCS/UFPE

B – Normas do periódico



May 2013, Instructions to Authors, pages 1 – 20

2013 INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SCOPE

The two principal attributes of papers published in the *Journal of Clinical Microbiology* (JCM) are relevance to the practice of clinical microbiology and quality science. JCM is devoted to the dissemination of new knowledge concerning the laboratory diagnosis of human and animal infections. In addition, JCM is an appropriate forum for the publication of information related to the role of the laboratory in both the management of infectious diseases and the elucidation of the epidemiology of infections. Manuscripts which present the results of original scientific investigations are encouraged. Case Reports will be considered if they are novel, add to existing knowledge, and are consistent with the primary objectives of the *Journal* as outlined above. (See “Case Reports” in the [Organization and Format](#) section and the “Case Report” paragraph under “FullLength Papers” for descriptions of the two different types of Case Reports published.)

Manuscripts which present the results of newer technologies, such as MALDI-TOF, will be considered when they address new applications, substantially extend our understanding of the role of the technology in the clinical microbiology laboratory, or provide clinical or laboratory outcome data. Manuscripts that present information that is largely only of relevance to a restricted geographic area are discouraged. Papers that convey the results of meta-analysis studies will be considered when the data presented are extensive and when the observations made in the study are broadly applicable to the practice of clinical microbiology. The same is true of microbiome papers that elucidate the microbial flora of various body sites in either humans or animals.

JCM will consider manuscripts which describe truly novel molecular methods for use in the diagnosis or elucidation of infection. However, we discourage submission of manuscripts predicated on the application of previously well described methods (e.g., RT-PCR, RAPD analysis, PFGE, and real-time PCR, etc.) even though the application may be new. Papers employing established molecular methods will be considered only when the application is examined in comparison to some other existing diagnostic method(s). Such comparative studies should include information regarding assay sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy.

To ensure the completeness of investigations in which the performance of various diagnostic assays or methods is presented, authors are encouraged to refer to the Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) for guidance. The entire set of guidelines, including checklists, may be found at <http://stard-statement.org/>.

ASM publishes a number of different journals covering various aspects of the field of microbiology. Each journal has a prescribed scope which must be considered in determining the most appropriate journal for each manuscript.

(i) With respect to antimicrobial agents, JCM will consider clinically relevant manuscripts (a) that pertain to *in vitro* susceptibility test methods; (b) that are concerned with quality control procedures related to antimicrobial susceptibility tests; (c) that deal with investigations of test methods aimed at measuring levels of antimicrobial agents in clinical specimens; or (d) that describe the use of antimicrobial agents as tools in the isolation, identification, or epidemiologic assessment of microorganisms associated with disease. Manuscripts pertaining to other aspects of antimicrobial agents, such as their basic mechanisms of action, the elucidation of resistance determinants, pharmacokinetics and pharmacodynamics, and

the development of new agents, will be considered for publication in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

(ii) Manuscripts that present the results of investigations with a primary focus on the basic mechanisms of pathogenesis of microorganisms or the pathophysiology of infections should be directed to *Infection and Immunity* (for bacteria, parasites, and fungi) or the *Journal of Virology* (for viruses).

(iii) Reports of clinical microbiology investigations or studies of the hospital population and the environment as they relate to nosocomial infections should be submitted to JCM. Manuscripts dealing with ecology or environmental studies or with the application of microorganisms to agricultural or industrial processes are more appropriate for *Applied and Environmental Microbiology*.

(iv) Papers involving immunologic assays for use in the diagnosis or elucidation of infection, vaccines, or the assessment and laboratory diagnosis of immunologic diseases (e.g., autoimmune diseases and primary immunodeficiencies) should be submitted to *Clinical and Vaccine Immunology* (formerly *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*).

Questions about these guidelines may be directed to the editor in chief of the journal being considered.

If transfer to another ASM journal is recommended by an editor, the corresponding author will be contacted.

Note that a manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals.

EDITORIAL POLICY

Use of Microbiological Information

The Council Policy Committee (CPC) of the American Society for Microbiology affirms the long-standing position of the Society that microbiologists will work for the proper and beneficent application of science and will call to the attention of the public or the appropriate authorities misuses of microbiology or of information derived from microbiology. ASM members are obligated to discourage any use of microbiology contrary to the welfare of humankind, including the use of microbes as biological weapons. Bioterrorism violates the fundamental principles expressed in the Code of Ethics of the Society and is abhorrent to ASM and its members.

ASM recognizes that there are valid concerns regarding the publication of information in scientific journals that could be put to inappropriate use as described in the CPC resolution mentioned above. Members of the ASM Publications Board will evaluate the rare manuscript that might raise such issues during the review process. However, as indicated elsewhere in these Instructions, research articles must contain sufficient detail, and material/information must be made available, to permit the work to be repeated by others. Supply of materials should be in accordance with laws and regulations governing the shipment, transfer, possession, and use of biological materials and must be for legitimate, bona fide research needs. Links to, and information regarding, these laws and regulations can be found at <http://www.asm.org/> under the Public Policy tab. We ask that authors pay particular attention to the NSAR Select Agents and Toxins list on the CDC website <http://www.selectagents.gov/index.html> and the NSABB criteria for identifying dual use research of concern in the report "Proposed Framework for the Oversight of Dual Use Life Sciences Research: Strategies for Minimizing the Potential Misuse of Research Information" on the Office of Biotechnology Activities website http://oba.od.nih.gov/biosecurity/pdf/Framework%20for%20transmittal%200807_Sept07.pdf (p. 17–22).

Ethical Guidelines

ASM requirements for submitted manuscripts are consistent with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, as last updated by the International Committee of Medical Journal Editors in April 2010 (<http://www.icmje.org>).

Authors are expected to adhere to the highest ethical standards. The following sections of these Instructions include detailed information about ASM's ethical standards. Failure to comply with the policies described in these Instructions may result in a letter of reprimand, a suspension of publishing privileges in ASM journals, and/or notification of the authors' institutions. Authors employed by companies whose policies do not permit them to comply with ASM policies may be sanctioned as individuals and/or ASM may refuse to consider manuscripts having authors from such companies. The ASM Publications Board wishes to clarify the following in particular.

Plagiarism. Misappropriating another person's intellectual property constitutes plagiarism. This includes copying sentences or paragraphs verbatim (or almost verbatim) from someone else's work, even if the original work is cited in the references. The NIH ORI publication "Avoiding Plagiarism, Self-Plagiarism, and Other Questionable Writing Practices: a Guide to Ethical Writing" (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/>) can help authors identify questionable writing practices.

Plagiarism is not limited to the text; it can involve any part of the manuscript, including figures and tables, in which material is copied from another publication without permission and attribution. An author may not reuse his or her own previously published work without attribution; this is considered self-plagiarism.

Primary publication. Manuscripts submitted to the journal must represent reports of original research, and the original data must be available for review by the editor if necessary.

By submission of a manuscript to the journal, **the authors guarantee that they have the authority to publish the work and that the manuscript, or one with substantially the same content, was not published previously, is not being considered or published elsewhere, and was not rejected on scientific grounds by another ASM journal.** It is incumbent upon the author to acknowledge any prior publication, including his/her own articles, of the data contained in a manuscript submitted to an ASM journal. A copy of the relevant work should be submitted with the paper as supplemental material for information only. Whether the material constitutes the substance of a paper and therefore renders the manuscript unacceptable for publication is an editorial decision.

In brief, a paper is not acceptable for submission to an ASM journal if it, or its substance, has been made publicly available in:

- A serial, periodical, or book
- A conference report or symposium proceedings
- A technical bulletin or company white paper
- A public website
- Any other retrievable source

The following do not preclude submission to, or publication by, an ASM journal, as long as the posted data do not constitute the substance of a submission:

- Posting of a method/protocol on a public website
- Posting of a limited amount of original data on a personal/university/corporate website or websites of small collaborative groups working on a problem
- Deposit of unpublished sequence data in a public database
- Preliminary disclosures of research findings as meeting posters, webcast as meeting presentations, or published in abstract form as adjuncts to a meeting, e.g., part of a program
- Posting of theses and dissertations on a personal/university-hosted website

Availability of materials. By publishing in the journal, the authors agree that, subject to requirements or limitations imposed by laws or governmental regulations of the United States, any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Permissions. The corresponding author is responsible for obtaining permission from both the original author and the original publisher (i.e., the copyright owner) to reproduce or modify figures (including maps) and tables and to reproduce text (in whole or in part) from previous publications.

Permission(s) must be obtained no later than the modification stage. The original signed permission(s) must be identified as to the relevant item in the ASM manuscript (e.g., "permissions for Fig. 1 in JCM00123-13") and submitted to the ASM production editor on request. In addition, a statement indicating that the material is being reprinted with permission must be included in the relevant figure legend or table footnote of the manuscript. Reprinted text must be enclosed in quotation marks, and the permission statement must be included as running text or indicated parenthetically.

It is expected that the authors will provide written assurance that permission to cite unpublished data or personal communications has been granted. For supplemental material intended for posting by ASM (see "[Supplemental Material](#)"), if the authors of the JCM manuscript are not also the owners of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the copyright owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating in the supplemental material any copyright notices required by the owner.

Authorship. All authors of a manuscript must have agreed to its submission and are responsible for its content (initial submission and any subsequent versions), including appropriate citations and acknowledgments, and must also have agreed that the corresponding author has the authority to act on their behalf in all matters pertaining to publication of the manuscript. The corresponding author is responsible for obtaining such agreements and for informing the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication process. Submitting a paper before all coauthors have read and approved it is considered an ethical violation, as is failure to credit some one who qualifies as a coauthor; however, ASM does not itself investigate or attempt to resolve authorship disputes.

An author is one who made a substantial contribution to the overall design and execution of the experiments; therefore, **ASM considers all authors responsible for the entire paper.** Individuals who provided assistance, e.g., supplied strains or reagents or critiqued the paper, need not be listed as authors but may be recognized in the Acknowledgments section. ASM does not permit "ghost authorship," i.e., individuals who contribute to the research, data analysis, and/or writing of an article but who do not satisfy the requirements for authorship.

Examples of ghost authors include medical writers and employees of pharmaceutical or device companies who have not made a substantial contribution to the overall design and execution of the experiments.

A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members only may be given as a separate paragraph in the Acknowledgments section.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

All authors must agree to the order in which their names are listed in the byline. Statements regarding equal contributions by two or more authors (e.g., “C.J. and Y.S. contributed equally to . . .”) are permitted as footnotes and must be agreed to by all of the authors. Other statements of attribution may be included in the Acknowledgments section.

A change in authorship (order of listing, addition or deletion of a name, or corresponding author designation) after submission of the manuscript will be implemented only after receipt of signed statements of agreement from all parties involved.

Disputes about authorship may delay or prevent review and/or publication of the manuscript. Should the individuals involved be unable to reach an accord, review and/or publication of the manuscript can proceed only after the matter is investigated and resolved by the authors' institution(s) and an official report of such and signed statements of agreement are provided to ASM.

Conflict of interest. All authors are expected to disclose, in the manuscript submittal letter, any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. (Inclusion of a company name in the author address lines of the manuscript does not constitute disclosure.) Details of the disclosure to the editor will remain confidential. However, it is the responsibility of authors to provide, in the Acknowledgments section, a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. Examples of potentially conflicting interests that should be disclosed include relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results and interests whose value would be enhanced by the results presented. All funding sources for the project, institutional and corporate, should be credited in the Acknowledgments section, as described below. In addition, if a manuscript concerns a commercial product, the manufacturer's name must be indicated in the Materials and Methods section or elsewhere in the text, as appropriate, in an obvious manner.

Copyright

To maintain and protect the Society's ownership and rights and to continue to afford scientists the opportunity to publish in high-quality journals, ASM requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all the authors. Unless this agreement is executed (without changes and/or addenda), ASM will not publish the article.

In the copyright transfer agreement signed by an author, ASM grants to that author (and coauthors) the right to republish discrete portions of his/her (their) article in any other publication (print, CD-ROM, and other electronic forms) of which he/she is (they are) the author(s) or editor(s), on the condition that appropriate credit is given to the original ASM publication. This republication right also extends to posting on a host computer to which there is access via the Internet. Except as indicated below, significant portions of the article may not be reprinted/posted without ASM's prior written permission, however, as this would constitute duplicate publication.

Authors may post their own published articles on their personal or university-hosted (but not corporate, government, or similar) websites without ASM's prior written permission provided that appropriate credit is given (i.e., the copyright lines shown at the bottom of the first page). Works authored solely by U.S. government employees are not subject to copyright protection, so there is no copyright to be transferred. However, the other provisions of the copyright transfer agreement, such as author representations of originality and authority to enter into the agreement, apply to U.S. government employee-authors as well as to other authors.

When funds from the Wellcome Trust or Research Councils UK are used to pay an article open access fee, the article will be published under the [Creative Commons Attribution license](#) (CC-BY) in accordance with the funding organization's open access policies. Authors will be required to notify ASM and complete the Author Warranty and Provisional License to Publish at the time of submission.

Copyright for supplemental material (see "[Supplemental Material](#)") remains with the author, but a license permitting the posting by ASM is included in the article copyright transfer agreement. If the author of the article is not also the copyright owner of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating into the supplemental material any copyright notices required by the owner.

Funding Agency Repositories

The National Institutes of Health (NIH) requests that its grantee and intramural authors provide copies of their accepted manuscripts to PubMed Central (PMC) for posting in the PMC Public Access Repository. However, JCM authors are automatically in compliance with this policy and need take no action themselves. For the past several years, ASM has deposited in PubMed Central all publications from all ASM journals. Further, ASM policy is that all primary research articles are made available to everyone, free, 6 months after publication through PubMed Central, HighWire, and international PubMed Central-like repositories. By having initiated these policies, ASM is in full compliance with NIH policy. For more information, see <http://publicaccess.nih.gov/>. ASM also allows JCM authors whose work was supported by funding agencies that have public access requirements like those of the NIH (e.g., the Wellcome Trust) to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by those funding agencies. If a funding agency does not itself maintain such a site, then ASM allows the author to fulfill that requirement by depositing the manuscript (not the typeset article) in an appropriate institutional or subject-based open repository established by a government or noncommercial entity.

Since ASM makes the final, typeset articles from its primary research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM requests that when submitting the accepted manuscript to PMC or a similar public access site, the author specify that the **posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after publication of the typeset article by ASM and that a link to the published manuscript on the journal website be provided.**

Use of Human Subjects or Animals in Research

The use of human subjects or animals for research purposes is regulated by the federal government and individual institutions. Authors of manuscripts describing research involving human subjects or animal experimentation must obtain approval from their Institutional Review Board (IRB) or Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), as appropriate, prior to manuscript submission. Authors of manuscripts that describe multisite research must obtain approval from each institution's IRB or IACUC, as appropriate. A statement of IRB or IACUC approval must be included in the Materials and Methods section. Documentation of IRB or IACUC status must be made available upon request.

Patient Identification

To protect the privacy of individuals mentioned in clinical studies, in case histories, and as sources of isolates, do not identify them by their initials, even as part of a strain designation. Change the initials to numerals or use randomly chosen letters. Do not give hospital unit numbers; if a designation is needed, use only the last two digits of the unit. (Note: established designations of some viruses and cell lines, although they consist of initials, are acceptable [e.g., JC virus, BK virus, and HeLa cells].)

Provision of Requisite Information for Molecular Applications

Authors of manuscripts which contain quantitative real-time PCR applications are encouraged to consult the article concerning minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (the MIQE guidelines) by Bustin et al. (Clin. Chem. **55**:611–622, 2009) for guidance as to what information should be considered for inclusion in their submission.

Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. The accession numbers should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Short-Form papers (formerly Notes). If conclusions in a manuscript are based on the analysis of sequences and a GenBank/EMBL/ DDBJ accession number is not provided at the time of the review, authors should provide the annotated sequence data as supplemental material for information only.

It is expected that when previously published sequence accession numbers are cited in a manuscript, the original citations (e.g., journal articles) will be included in the References section when possible or reasonable.

Authors are also expected to do elementary searches and comparisons of nucleotide and amino acid sequences against the sequences in standard databases (e.g., GenBank) immediately before manuscripts are submitted and again at the proof stage.

Analyses should specify the database, and the date of each analysis should be indicated as, e.g., January 2013. If relevant, the version of the software used should be specified.

See “[Presentation of Nucleic Acid Sequences](#)” for nucleic acid sequence formatting instructions.

The URLs of the databases mentioned above are as follows: DNA Data Bank of Japan (DDBJ), <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>; EMBL Nucleotide Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>; and GenBank, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Proper Use of Locus Tags as Systematic Identifiers for Genes

To comply with recommendations from the International Nucleotide Sequence Database (INSD) Collaborators and to avoid conflicts in gene identification, researchers should implement the following two fundamental guidelines as standards for utilization of locus tags in genome analysis, annotation, submission, reporting, and publication. (i) Locus tag prefixes are systematic gene identifiers for all of the replicons of a genome and as such should be associated with a single genome project submission. (ii) New genome projects must be registered with the INSD, and new locus tag prefixes must be assigned in cooperation with the INSD to ensure that they conform to the agreed-upon criteria. Locus tag prefixes that are currently in use may be searched in the NCBI locus tag database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ltp.cgi>).

Structural Determinations

Coordinates for new structures of macromolecules must be deposited in the Protein Data Bank and assigned identification codes must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the coordinates will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send coordinates with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Short-Form papers (formerly Notes).

The URLs for coordinate deposition are <http://rcsb-deposit.rutgers.edu/> and <http://pdbdep.protein.osaka-u.ac.jp/en/>.

Microarray Data

The entire set of supporting microarray data must be deposited in the appropriate public database (e.g., GEO, ArrayExpress, or CIBEX) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Short-Form papers (formerly Notes).

The URLs of the databases mentioned above are as follows: Gene Expression Omnibus (GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; ArrayExpress, <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>; and Center for Information Biology Gene Expression Database (CIBEX), <http://cibex.nig.ac.jp/data/index.html>.

Culture Deposition

JCM expects authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

MycoBank

New scientific names of fungi along with key nomenclatural and descriptive material must be deposited in MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Short-Form papers (formerly Notes).

Supplemental Material

Supplemental material will be peer reviewed along with the manuscript and must be uploaded to the eJournalPress (eJP) peer review system at initial manuscript submission. The decision to publish the material online with the accepted article is made by the editor. It is possible that a manuscript will be accepted but that the supplemental material will not be.

The number of supplemental material files is limited to 10.

Supplemental files should be submitted in the following standard formats.

- **Text, figures, tables, and legends** should be included in a single PDF file. All figures and tables should be numbered independently and cited at the relevant point in the manuscript text, e.g. “Fig. S1,” “Fig. S2,” “Table S3,” etc. Do not duplicate data by presenting them in both the text and the figure. Each legend should appear below its corresponding figure or table. The maximum file size is 8 MB. [Please review this sample file for guidance.](#)
- **Data set** (Excel [.xls]) files should include a brief description of how the data are used in the paper. The maximum file size is 8 MB. [Please review this sample file for guidance.](#)
- **Movies** (Audio Video Interleave [.avi], QuickTime [.mov], or MPEG files) should be submitted at the desired reproduction size and length and should be accompanied by a legend. The maximum file size is 20 MB.

Unlike the manuscript, supplemental material will not be edited by the ASM Journals staff and proofs will not be made available. References related to supplemental material only should not be listed in the References section of an article; instead, include them with the supplemental material. Supplemental material will always remain associated with its article and is not subject to any modifications after publication.

Material that has been published previously (print or online) is not acceptable for posting as supplemental material. Instead, the appropriate reference(s) to the original publication should be made in the manuscript.

Copyright for the supplemental material remains with the author, but a license permitting posting by ASM must be signed by the corresponding author. If you are not the copyright owner, you must provide to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to your article, by ASM. You are responsible for including in the supplemental material any copyright notices required by the owner. See also “[Publication Fees](#).”

Warranties and Exclusions

Articles published in this journal represent the opinions of the authors and do not necessarily represent the opinions of ASM. ASM does not warrant the fitness or suitability, for any purpose, of any methodology, kit, product, or device described or identified in an article. The use of trade names is for identification purposes only and does not constitute endorsement by ASM.

SUBMISSION, REVIEW, AND PUBLICATION PROCESSES

Submission Process

All submissions to JCM must be made electronically via the eJournalPress (eJP) online submission and peer review system at the following URL: <http://jcm.msubmit.net>. (E-mailed submissions will not be accepted.) First-time users must create an Author account, which may be used for submitting to all ASM journals. Instructions for creating an Author account are available at the above URL via the “help for authors” link, and step-by-step instructions for submitting a manuscript via eJP are also available through the same link on the log-in screen or on the account holder’s Home page. Information on file types acceptable for electronic submission can be found under the Files heading in the help for authors screen.

Review Process

All manuscripts are considered to be confidential and are reviewed by the editors, members of the editorial board, or qualified *ad hoc* reviewers.

To expedite the review process, authors must recommend at least three editorial board members who have expertise in the field, who are not members of their institution(s), who

have not recently been associated with their laboratory(ies), and who could not otherwise be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript.

Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript should be included as supplemental material for information only to facilitate the review.

When a manuscript is submitted to the journal, it is given a control number (e.g., JCM00047-13) and assigned to one of the editors. **(Always refer to this control number in communications with the editor and the Journals Department.)** It is the responsibility of the corresponding author to inform the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication processes. The reviewers operate under strict guidelines set forth in "Guidelines for Reviewers" (<http://www.journals.asm.org/site/misc/reviewguide.xhtml>) and are expected to complete their reviews expeditiously.

The corresponding author is notified, generally within 4 to 6 weeks after submission, of the editor's decision to accept, reject, or require modification. When modification is requested, the corresponding author must either submit the modified version within 2 months or withdraw the manuscript. A point-by-point response to the reviews must be loaded as a separate file (identified as such), and a compare copy of the manuscript (without figures) should be included as a Marked Up Manuscript if the editor requested one.

Manuscripts that have been rejected, or withdrawn after being returned for modification, may be resubmitted to the same ASM journal if the major criticisms have been addressed. A manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals; however, a manuscript rejected solely on the basis of scope may be "resubmitted" to a more appropriate ASM journal.

For all resubmissions (to the same or a different journal, irrespective of the extent of the revisions and irrespective of the amount of time between rejection and resubmission), the cover letter must state that the manuscript is a resubmission, and the former manuscript control number must be provided. A point-by-point response to the review(s) must be loaded as a separate file (identified as such), and a compare copy of the revised manuscript showing all changes must be included as a Marked Up Manuscript. Manuscripts resubmitted to the same journal are normally handled by the original editor.

Rejected manuscripts may be resubmitted only once unless permission has been obtained from the original editor or from the editor in chief.

Notification of Acceptance

When an editor has decided that a manuscript is acceptable for publication on the basis of scientific merit, the author and the Journals Department are notified. A PDF version of the accepted manuscript is posted online as soon as possible (see "[JCM Accepts](#)").

The text files undergo an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type, and the illustrations are examined. If all files have been prepared according to the criteria set forth in these Instructions and those in the eJP online manuscript submission system, the acceptance procedure will be completed successfully. If there are problems that would cause extensive corrections to be made at the copyediting stage or if the files are not acceptable for production, ASM Journals staff will contact the corresponding author. Once all the material intended for publication has been determined to be adequate, the manuscript is scheduled for the next available issue. The editorial staff of the ASM Journals Department completes the editing of the manuscript to bring it into conformity with prescribed standards.

JCM Accepts

For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "[journal

acronym] Accepts" (e.g., JCM Accepts) and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset articles are published. They are posted "as is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage) and do not reflect ASM editorial changes. No corrections/ changes to the PDF manuscripts are accepted. Accordingly, there likely will be differences between the JCM Accepts manuscripts and the final, typeset articles. The manuscripts remain listed on the JCM Accepts page until the final, typeset articles are posted. At that point, the manuscripts are removed from the JCM Accepts page. The manuscripts are under subscription access control until 6 months after the typeset articles are posted, when free access is provided to everyone (subject to the applicable ASM license terms and conditions). Supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

The ASM embargo policy allows a press release to be issued as soon as the ahead-of-print manuscript is posted on the JCM Accepts page. To be notified as soon as your manuscript is posted, please sign up for e-Alerts at <http://jcm.asm.org/cgi/alerts>.

Instructions on how to cite such manuscripts may be found in "References."

Page Proofs

Page proofs, together with a query sheet and instructions for handling proofs, will be made available to the corresponding author electronically. Queries must be answered on the query page, and any changes related to the queries must be indicated on the proofs. Note that the copy editor does not query at every instance where a change has been made. Queries are written only to request necessary information or clarification of an unclear passage or to draw attention to edits that may have altered the sense. It is the author's responsibility to read the entire text, tables, and figure legends, not just items queried. Corrected proofs must be returned within 48 hours after notification of availability.

The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions. Figures as they appear in the proofs are for validation of content and placement, not quality of reproduction or color accuracy. Print output of figures in the PDF page proofs will be of lower quality than the same figures viewed on a monitor. Please avoid making changes to figures based on quality of color or reproduction in proof.

Important new information that has become available between acceptance of the manuscript and receipt of the proofs may be inserted as an addendum in proof with the permission of the editor. If references to unpublished data or personal communications are added, it is expected that written assurance granting permission for the citation will be included. Limit changes to correction of spelling errors, incorrect data, and grammatical errors and updated information for references to articles that have been submitted or are in press. If URLs have been provided in the article, recheck the sites to ensure that the addresses are still accurate and the material that you expect the reader to find is indeed there.

Questions about late proofs and problems with the proofs should be directed to the ASM Journals Department (e-mail, cbrown@asmusa.org; telephone, 202-942-9384).

PDF Files

A corresponding author who has included an e-mail address in his/her "corresponding author" footnote will have limited access (10 downloads, total) to the PDF file of his/her published article. An e-mail alert will automatically be sent to him/her on the day the issue is posted. It will provide a URL, which will be required to obtain access, and instructions. An article may be viewed, printed, or stored, provided that it is for the author's own use.

Should coauthors or colleagues be interested in viewing the paper for their own use, the corresponding author may provide them with the URL; a copy of the article may not be forwarded electronically. However, they must be made aware of the terms and conditions of the ASM copyright. (For details, go to <http://www.journals.asm.org/site/misc/terms.xhtml>.) Note that each such download will count toward the corresponding author's total of 10. After

10 downloads, access will be denied and can be obtained only through a subscription to the journal (either individual or institutional) or after the standard access control has been lifted (i.e., 6 months after publication).

Publication Fees

Page charges. Authors whose research was supported by grants, special funds (including departmental and institutional), or contracts (including governmental) or whose research was done as part of their official duties (government or corporate, etc.) are required to pay page charges (based on the number of typeset pages, including illustrations, in the article). Corresponding authors of articles accepted for publication will receive an e-mail notifying them how to pay page and any other applicable publication charges (see below).

For a **corresponding author who is an active member of ASM at the Contributing or Premium level**, page charges are \$67 per page for the first eight pages and \$125 per page for each page in excess of eight (subject to change without notice).

For a **nonmember or Supporting member corresponding author**, page charges are \$135 per page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight (subject to change without notice). Nonmember corresponding authors or Supporting members may join ASM or upgrade their membership to obtain discounts on publications fees. Authors may [join ASM and renew or upgrade membership online](#).

If the research was not supported by any of the means described above, a request to waive the charges may be sent to the Journals Department, ASM, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, USA (fax, 202-942-9355; e-mail, cbrown@asmusa.org [after acceptance of the manuscript]). The request must include the manuscript control number assigned by ASM and indicate how the work was supported. Waivers apply only to page charges; responsibility for color charges and other publication fees remains with the author.

Minireviews, Commentaries, and Comment Letters to the Editor are not subject to page charges. New-Data Letters to the Editor are subject to page charges.

Color charges. The cost of publishing in color must be borne by the author.

For a **corresponding author who is an active member of ASM at the Contributing or Premium level**, color charges are \$170 per color figure (subject to change without notice).

For a **nonmember or Supporting member corresponding author**, color charges are \$375 per color figure (subject to change without notice). Nonmember corresponding authors or Supporting members may join ASM or upgrade their membership to obtain discounts on publications fees. Authors may [join ASM and renew or upgrade membership online](#).

Minireviews, Commentaries, and Comment Letters to the Editor are not subject to color charges. New-Data Letters to the Editor are subject to color charges.

Author reprints and eprints. Reprints (in multiples of 100) and eprints (downloadable PDFs) may be purchased by all coauthors. In addition to the 10 free published PDF files mentioned above, the corresponding authors of Minireviews may receive 100 free eprints of their contribution and the corresponding authors of Commentaries may receive 50 free eprints. Instructions for ordering gratis or additional reprints and eprints can be found in the billing notification e-mail sent to all corresponding authors. To order reprints postpublication, please follow the instructions on the Author Reprint Order Form. Please contact cadmusASMReprints@cadmus.com with any questions.

Supplemental material fee. Authors are charged a flat fee for posting supplemental material as an adjunct to their published article. (Exception: no fee is charged for supplemental material associated with Minireviews or Commentaries.)

For a **corresponding author who is an active member of ASM at the Contributing or Premium level**, the supplemental material fee is \$190. For a **nonmember or Supporting member corresponding author**, the supplemental material fee is \$285. Nonmember corresponding authors or Supporting members may join ASM or upgrade their membership

to obtain discounts on publications fees. Authors may [join ASM and renew or upgrade membership online](#).

Optional open access fee. Author-paid optional open access (OOA) is now available for all article types. For a **corresponding author who is an active member of ASM at the Contributing or Premium level**, the OOA fee is \$2,000. For a **nonmember or Supporting member corresponding author**, the OOA fee is \$3,000. Nonmember corresponding authors or Supporting members may join ASM or upgrade their membership to obtain discounts on publications fees. Authors may [join ASM and renew or upgrade membership online](#). These fees are in addition to any page charges, color charges, or supplemental material charges and permit immediate public access to both the preliminary “Accepts” version and the copyedited, typeset version published in the online journal. This option includes immediate open access provided through NIH’s PubMed Central repository; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication.

When funds from the Wellcome Trust or Research Councils UK are used to pay an article open access fee, the article will be published under the [Creative Commons Attribution license](#) (CC-BY) in accordance with the funding organization’s open access policies. Authors will be required to notify ASM and complete the Author Warranty and Provisional License to Publish at the time of submission.

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals* (American Society for Microbiology, 2013, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 7th ed. (Greenwood, Santa Barbara, CA, 2011), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and References, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages must have continuous line numbers and page numbers. Manuscripts without line and page numbers will be returned to authors for provision of this information prior to processing. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter “oh” (O); the numeral one (1), the letter “el” (l), and the letter “eye” (I); and a multiplication sign () and the letter “ex” (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the “insert symbol” function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

Full-Length Papers

Full-length papers include the elements described in this section.

Title, running title, and byline. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, the address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address(es) of any author(s) no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "[Correspondent footnote](#)," below).

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Case Report. The Case Report section, placed after the introduction and before Materials and Methods, is optional and gives relevant clinical information about one or more patients while being incidental to the rest of the paper. (If the Case Report constitutes the entire article, the paper must be presented in Case Report format [see "[Case Reports](#)," below], which differs from that used for a full-length text or a Short-Form paper [formerly a Note].)

Materials and Methods. The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force (g rather than revolutions per minute). For commonly

used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference or specifically recommended product or procedure is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than to state “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data which might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly, graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. All tabular data must be accompanied by either standard deviation values or standard errors of the means. The number of replicate determinations (or animals) used for making such calculations must also be included. All statements concerning the significance of the differences observed should be accompanied by probability values given in parentheses. The statistical procedure used should be stated in Materials and Methods. Limit illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion section should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand. It must not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: “This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute.”

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length paper or Short-Form

(formerly Note) style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter “A” preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References. Effective January 2013, ASM has adopted the citation-sequence system of references in which references are cited in numerical order as they appear in the text (ASM no longer uses the citation-name system with an alphabetized reference list). For example, the first reference cited in an article is numbered 1 and listed first in References. In addition, ASM no longer allows the abbreviation of author lines in entries in the References section; “et al.” may not be used in lieu of any author names, regardless of the number.

(i) References listed in the References section. The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, published conference proceedings, meeting abstracts from published abstract books or journal supplements, letters (to the editor), and company publications, as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). References should be cited in numerical order as they appear in the text (citation sequence system). **Provide the names of all the authors for each reference, as the author line will not be abbreviated and “et al.” will not be used.** All listed references must be cited parenthetically by number in the text. Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health; available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), the primary source for ASM style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive *prgQ* promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J. Bacteriol.* **194**:3386–3394.
2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2274–2275. (Letter.) {“Letter” or “Letter to the editor” is allowed but not required at the end of such an entry.}
3. **Cox CS, Brown BR, Smith JC.** *J. Gen. Genet.*, in press.*
{Article title is optional; journal title is mandatory.}
4. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA.** 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295, ^{AL} emend. Nobre, Truiper and da Costa 1996b, 605, p 404–414. *In* Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.
5. **Stratagene.** 2006. *Yeast DNA isolation system: instruction manual*. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}
6. **Forman MS, Valsamakis A.** 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276–1288. *In* Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10 th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.
7. **Fitzgerald G, Shaw D.** *In* Waters AE (ed), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.*
{Chapter title is optional.}
8. **García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* **39**(Suppl 9):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}

9. **Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ.** 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC.
{Abstract title is optional.}
10. **Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP.** 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr D-1658. {Abstract title is optional.}
11. **Green PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251–254. In Crawford RL, Hanson RS (ed), Microbial growth on C₁ compounds. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
12. **O'Malley DR.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}
13. **Odell JC.** April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/ process if possible; the patent number is mandatory.}
14. **Elder BL, Sharp SE.** 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., JCM00577-13) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online-only references must provide essentially the same information that print references do. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers.

1. **Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D.** 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* **115**:e718–e724.
2. **Smith FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM.** 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:2250–2255. doi:10.1073/pnas.041593698.
3. **Dionne MS, Schneider DS.** 2002. Screening the fruitfly immune system. *Genome Biol.* **3**:REVIEWS1010. <http://genomebiology.com/2002/3/4/reviews/1010>.
4. **Gregory ST.** 2 September 2009, posting date. Chapter 2.5.4, Structural basis for the decoding mechanism. In Böck A, et al (ed), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. <http://www.ecosal.org/>.
{Note that each chapter has its own posting date.}

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed. **(ii) References cited in the text.** References to unpublished data, manuscripts submitted for publication, unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings), personal communications, patent applications and patents pending, computer software, databases, and websites should be made parenthetically in the text as follows.

. . . similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).
 . . . system was used (J. L. McNerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).
 . . . as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts and posters, etc.}
 . . . this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.} . . . available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).
 . . . using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.state.micro.edu>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) **References related to supplemental material.** References that are related only to supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website should not be listed in the References section of an article; include them with the supplemental material itself.

(iv) **Referencing ASM Accepts (publish-ahead-of-print) manuscripts.** Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol. Cell. Biol.* doi: 10.1128 /MCB. 00586-06.

Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001, posting date. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.041593698.

Short-Form Papers (Formerly Notes)

The Short-Form format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. However, Short-Form papers should contain firm data; observations alone are not acceptable. Submit Short-Form papers in the same way as full-length papers. They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.

The title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), byline, and correspondent footnote should be prepared as for a full-length paper. Each Short-Form paper must have an abstract of no more than 50 words. Do not use section headings in the body of the Short Form; combine methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. Materials and methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes. Present acknowledgments as in full-length papers. The References section is identical to that of full-length papers.

Minireviews

Minireviews are expected to be focused discussions of defined topics relevant to clinical microbiologists. In general, they are to be submitted only following invitation by the editor in chief of JCM. Unsolicited Minireviews are discouraged. A topical outline should be provided to the editor in chief for approval prior to submission of the completed Minireview manuscript in the eJP online manuscript submission and peer review system.

Minireviews are not expected to be comprehensive reviews of the literature but rather focused discussions of specific topics. A standard title page should be provided. This is followed by an abstract of 100 words or less and then the text of the Minireview, which should not exceed 12 double-spaced manuscript pages in length, exclusive of tables, figures, photographs, and references. Up to three tables, figures, or photographs, total, may be included. References should be limited to no more than 30. Minireviews will be reviewed by

two JCM editors, with the aim of expedited processing. In general, it is hoped that, barring the necessity of major revisions, accepted Minireviews will appear in print within 3 months of their submission and online ahead of print 6 to 8 weeks earlier.

Author bios. A short biographical sketch and photograph of the principal author of the minireview should be submitted along with the final version of the manuscript. These will be published at the end of the article.

- The text limit is 150 words and should include WHO you are (your name), WHERE you received your education, WHAT positions you have held and at WHICH institutions, WHERE you are now (your current institution), WHY you have this interest, and HOW LONG you have been in this area.
- The photo should be a black-and-white head shot of passport size. It will be reduced to approximately 1.125 inches wide by 1.375 inches high. The photo must meet the production criteria for regular figures and should be checked for production quality by using Rapid Inspector, provided at the following URL: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zmw/index.jsp>.
- To submit, upload the text and photo with your modified manuscript in the submission and review system. Include the biographical text after the References section of your manuscript, in the same file. Upload the head shot in the submission system as a "Minireview BioPhoto"; **include the author's name or enough of it for identification in the photo's file name.**

Contact the [scientific editor](#) if you have questions about what to write. Contact the [production editor](#) if you have questions about submitting your files.

Commentaries

Commentaries are invited communications concerning topics relevant to the readership of JCM and are intended to engender discussion. Reviews of the literature, methods and other how-to papers, and responses targeted at a specific published paper are not appropriate. Commentaries are subject to review.

The length may not exceed four printed pages, and the format is like that of a Minireview (see above) except that Commentaries do not have abstracts. (In the submission form, use "NA" or "Not applicable" in the space provided for the abstract.)

Point-Counterpoint

Point-Counterpoint is a feature of JCM in which two experts present opposing views on a contemporary issue in the laboratory diagnosis of infectious diseases. This feature will be the lead article in the issue of JCM in which it appears. Participation as an author of a Point-Counterpoint feature is by invitation only.

A JCM editor will write a brief introductory piece of approximately 200 words outlining why a specific issue is important and then present the issue in the form of a question. The two experts will then each write a commentary, no more than 1,000 words in length, in which they present evidence in support of either the pro or con view. One table or one figure may be included. Since these discussions will be evidence based, authors may also cite up to 10 references. Unpublished or in press data which reflect the current practice in their laboratory may be used but should not be the sole basis for their position.

Authors should send commentaries directly back to the JCM editor within 30 days of receipt of the introductory statement. Following receipt of both the pro and con commentaries, the editor will review the submissions and may return them to the author(s) with comments and/or suggested revisions. If revisions are required, the author(s) will have 14 days to craft a revised commentary, which will be sent directly back to the editor. Upon receipt of final commentaries, the JCM editor will write a brief summary consisting of no more than six one sentence bullet points, outlining where the experts agree (no more than three points) and

disagree (no more than three points). The JCM editor will then upload the introduction, both commentaries, and the summary in eJP.

Case Reports

While a full-length article or a Short-Form paper (formerly a Note) may contain a case report section when the report is incidental to the rest of the paper, a specific Case Report format must be used when the report constitutes the entire article.

A Case Report must include an abstract of no more than 50 words. The text starts with presentation of the case under the section heading "Case Report"; there is no introductory text before the Case Report heading. After the case is presented, the rest of the text follows in a separate section after a ruled line to separate the sections. No separate head is used for this short discussion section, but paragraph lead-ins are permitted. The total number of tables and figures (combined) must not exceed 3. For an example of a correctly formatted Case Report, see *J. Clin. Microbiol.* **39**:1678–1679, 2001.

Photo Quiz

A Photo Quiz submission should present the findings of some relevant, interesting, and new observation pertinent to the practice of clinical microbiology in which a photograph is particularly useful in conveying important information **and** where the observation can serve as the basis for both a question and an answer. The photograph may be of a micrograph, some other laboratory material, a clinical lesion, or the results of an imaging study.

A Photo Quiz consists of two parts: (i) a case presentation featuring a photograph depicting some unusual and/or informative finding in clinical microbiology and (ii) an answer to the quiz. The case presentation and the answer must be submitted as two separate articles. Note that authors and affiliations are listed below the title.

Photo Quiz case presentation. The text in the Photo Quiz case presentation should be limited to 200 to 300 words. The header for the case presentation should read "Photo Quiz." Please include a photograph about 39 picas (6.5 inches) wide and 28 picas (4.625 inches) high. Since photos appearing with published Photo Quizzes appear on the cover of the journal, a high-resolution TIFF or EPS file is preferred. A short legend for the photo must be provided, and the photo must be cited in the case presentation. Refer to a recently published Photo Quiz for correct formatting.

Answer to Photo Quiz. The text of the answer to the Photo Quiz should also be limited to 200 to 300 words. The header to the answer should read "Answer to Photo Quiz." Four to six references may be cited at the end of the Photo Quiz answer.

Submission. The Photo Quiz case presentation should be submitted in the "Photo Quiz" manuscript category. The Photo Quiz answer should be submitted in the "Photo Quiz Answer" manuscript category.

Letters to the Editor

Two types of Letters to the Editor may be submitted. The first type (Comment Letter) is intended for comments on final, typeset articles published in the journal (not on publish ahead-of-print manuscripts) and must cite published references to support the writer's argument. The second type (NewData Letter) may report new, concise findings that are not appropriate for publication as full-length papers or Short-Form papers (formerly Notes). Letters may be **no more than 500 words long and must be typed double spaced**. Refer to a recently published Letter for correct formatting. Note that authors and affiliations are listed below the title.

All Letters to the Editor must be submitted electronically, and the type of Letter (New Data or Comment) must be selected from the drop-down list in the submission form. For Letters commenting on published articles, the cover letter should state the volume and issue in which the article was published, the title of the article, and the last name of the first author. In the Abstract section of the submission form, put "Not Applicable." Letters to the Editor do not

have abstracts. Both types of Letter must have a title, which must appear on the manuscript and on the submission form. Figures and tables should be kept to a minimum.

If the Letter is related to a published article, it will be sent to the editor who handled the article in question. If the editor believes that publication is warranted, he/she will solicit a reply from the corresponding author of the article and give approval for publication.

New-Data Letters will be assigned to an editor according to subject matter and will be reviewed by that editor and/or a reviewer.

Please note that some indexing/abstracting services do not include Letters to the Editor in their databases.

Fast-Track Communications

The Fast-Track route is intended for accelerated review of short communications that are of significant interest to clinical microbiologists. Manuscripts are limited to 750 words, one figure, onetable, and 10 or fewer references. The format should be the same as that of a New-Data Letter (see [“Letters to the Editor,”](#) above). Fast-Track articles should be submitted via the eJP online manuscript submission and peer review system.

A Fast-Track submission is subject to approval as such by the editor in chief. If approved for the Fast-Track route, the manuscript will be assigned to an appropriate JCM editor and reviewed, according to the same standards applied for traditional manuscripts, within 1 week. If accepted, the manuscript will be scheduled for the next available issue and edited. An acceptance letter and copyright agreement will be mailed to the corresponding author. Proofs will be made available electronically as for regular articles.

A Fast-Track submission that is not approved for the Fast-Track route will be handled as a New-Data Letter according to normal procedures.

Errata

The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or publication (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. Submit Errata via the eJP online manuscript submission and peer review system (see [“Submission, Review, and Publication Processes”](#)). In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Erratum as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting.

Authors’ Corrections

The Author’s Correction section provides a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article (e.g., an incorrect unit of measurement or order of magnitude used throughout, contamination of one of numerous cultures, or misidentification of a mutants train, causing erroneous data for only a [noncritical] portion of the study). Note that the addition of new data is not permitted.

For corrections of a scientific nature or issues involving authorship, including contributions and use or ownership of data and/or materials, all disputing parties must agree, in writing, to publication of the Correction. For omission of an author’s name, letters must be signed by the authors of the article and the author whose name was omitted. The editor who handled the article will be consulted if necessary.

Submit an Author’s Correction via the eJP online manuscript submission and peer review system (see [“Submission, Review, and Publication Processes”](#)). Select Author’s Correction as the manuscript type. In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Author’s Correction as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting. Signed letters of agreement must be supplied as supplemental material for information only (scanned PDF files).

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Submit Retractions via the eJP online manuscript submission and peer review system (see “[Submission, Review, and Publication Processes](#)”). In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Retraction as a Microsoft Word file. Letters of agreement signed by all of the authors must be supplied as supplemental material for information only (scanned PDF files). The Retraction will be assigned to the editor in chief of the journal, and the editor who handled the paper and the chairperson of the ASM Publications Board will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the Journals Department for publication.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations

Image manipulation. Computer-generated images may be processed only minimally. Processing (e.g., changing contrast, brightness, or color balance) is acceptable only if applied to all parts of the image, as well as to the controls, equally, and descriptions of all such adjustments and the tools used (both hardware and software) must be provided in the manuscript. Also, ASM considers unacknowledged spliced images to be data manipulation and therefore a potential ethical violation. Unprocessed data and files must be retained by the authors and be provided to the editor on request.

File types and formats. Illustrations may be continuous tone images, line drawings, or composites. Color graphics may be submitted, but the cost of printing in color must be borne by the author. Suggestions about how to reduce costs and ensure accurate color reproduction are given below. On initial submission, illustrations should be supplied as PDF files, with the legend beneath each image, to assist review. At the modification stage, production quality digital files must be provided, and the legends should appear in the manuscript text file. The legends are copyedited and typeset for final publication, not included as part of the figure itself. All graphics submitted with modified manuscripts must be bitmap, grayscale, or in the RGB (preferred) or CMYK color mode. See “[Color illustrations](#).” Halftone images (those with various densities or shades) must be grayscale, not bitmap. JCM accepts TIFF or EPS files but discourages PowerPoint for either black-and-white or color images.

For instructions on creating acceptable EPS and TIFF files, refer to the Cadmus digital art website, <http://art.cadmus.com/da/index.jsp>. PowerPoint requires users to pay close attention to the fonts used in their images (see the section on fonts below). If instructions for fonts are not followed exactly, images prepared for publication are subject to missing characters, improperly converted characters, or shifting/obscuring of elements or text in the figure. For proper font use in PowerPoint images, refer to the Cadmus digital art website, http://art.cadmus.com/da/instructions/ppt_disclaimer.jsp.

We strongly recommend that before returning their modified manuscripts, authors check the acceptability of their digital images for production by running their files through Rapid Inspector, a tool provided at the following URL: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zmw/index.jsp>. Rapid Inspector is an easy-to-use, Web-based application that identifies file characteristics that may render the image unusable for production.

If you have additional questions about using the Rapid Inspector preflighting tool, please send an e-mail inquiry to digitalart@cadmus.com.

Minimum resolution. It is extremely important that a high enough resolution is used. All separate images that you import into a figure file must be at the correct resolution before they are placed. (For instance, placing a 72-dpi image in a 300-dpi EPS file will not result in the placed image meeting the minimum requirements for file resolution.) Note, however, that the higher the resolution, the larger the file and the longer the upload time. Publication quality will not be improved by using a resolution higher than the minimum. Minimum resolutions are as follows:

- 300 dpi for grayscale and color
- 600 dpi for combination art (lettering and images)
- 1,200 dpi for line art

Size. All graphics **should be submitted at their intended publication size**; that is, the image uploaded should be 100% of its print dimensions so that no reduction or enlargement is necessary. Resolution must be at the required level at the submitted size. Include only the significant portion of an illustration. White space must be cropped from the image, and excess space between panel labels and the image must be eliminated.

- Maximum width for a 1-column figure: 20.6 picas (ca. 8.7 cm)
- Maximum width for a 2-column figure: 42 picas (ca. 17.8 cm)
- Minimum width for a 2-column figure: 26 picas (11.1cm)
- Maximum height for a standard figure: 54.7 picas (ca. 23.2 cm)
- Maximum height for an oversized figure (no running title): 57.4 picas (ca. 24.3 cm)

Contrast. Illustrations must contain sufficient contrast to be viewed easily on a monitor or on the printed page.

Labeling and assembly. All final lettering and labeling must be incorporated into the figures. On initial submission, illustrations should be provided as PDF files, with the legend beneath each image, to assist review. At the modification stage, production quality digital figure files must be provided, and the legends should appear in the manuscript text file. Put the figure number well outside the boundaries of the image itself. (Numbering may need to be changed at the copyediting stage.) Each figure must be uploaded as a separate file, and any multipanel figures must be assembled into one file; i.e., rather than uploading a separate file for each panel in a figure, assemble all panels in one piece and supply them as one file.

Fonts. To avoid font problems, set all type in one of the following fonts: Arial, Helvetica, Times Roman, European PI, Mathematical PI, or Symbol. Courier may be used but should be limited to nucleotide or amino acid sequences, where an on-proportional (monospace) font is required. All fonts other than these must be converted to paths (or outlines) in the application with which they were created. For proper font use in PowerPoint images, refer to the Cadmus digital art website, http://art.cadmus.com/da/instructions/ppt_disclaimer.jsp.

Color illustrations. Color costs must be borne by the author. See “**Publication Fees.**” All figures submitted in color will be processed as color. Adherence to the following guidelines will help to minimize costs and to ensure color reproduction that is as accurate as possible.

The final online version is considered the version of record for JCM and all other ASM journals. To maximize online reproduction, color illustrations should be supplied in the RGB color mode as either (i) RGB TIFF images with a resolution of at least 300 pixels per inch (raster files, consisting of pixels) or (ii) Illustrator-compatible EPS files with RGB color elements (vector files, consisting of lines, fonts, fills, and images). CMYK files are also accepted. Other than in color space, CMYK files must meet the same production criteria as RGB files. The RGB color space is the native color space of computer monitors and of most

of the equipment and software used to capture scientific data, and it can display a wider range of colors (especially bright fluorescent hues) than the CMYK (cyan, magenta, yellow, black) color space used by print devices that put ink (or toner) on paper. For the print version (and reprints), ASM's print provider will automatically create CMYK versions of color illustrations from the supplied RGB versions. Color in the print journal may not match that in the online journal of record because of the smaller range of colors capable of being reproduced by CMYK inks on a printing press. For additional information on RGB versus CMYK color, refer to the Cadmus digital art site, http://art.cadmus.com/da/guidelines_rgb.jsp.

Drawings

Submit graphs, charts, complicated chemical or mathematical formulas, diagrams, and other drawings as finished products not requiring additional artwork or typesetting. All elements, including letters, numbers, and symbols, must be easily readable, and both axes of a graph must be labeled. Keep in mind that the journal is published both in print and online and that the same electronic files submitted by the authors are used to produce both.

When creating line art, please use the following guidelines:

- (i) **All art must be submitted at its intended publication size.** For acceptable dimensions, see "Size," above.
- (ii) **Avoid using screens (i.e., shading) in line art.** It can be difficult and time-consuming to reproduce these images without moiré patterns. Various pattern backgrounds are preferable to screens as long as the patterns are not imported from another application. If you must use images containing screens,
 - (a) Generate the image at line screens of 85 lines per inch or less.
 - (b) When applying multiple shades of gray, differentiate the gray levels by at least 20 %.
 - (c) Never use levels of gray below 5% or above 95%, as they are likely to fade out or become totally black when output.
- (iii) Use thick, solid lines that are no finer than 1 point in thickness.
- (iv) No type should be smaller than 6 points at the final publication size.
- (v) Avoid layering type directly over shaded or textured areas.
- (vi) Avoid the use of reversed type (white lettering on a black background).
- (vii) Avoid heavy letters, which tend to close up, and unusual symbols, which the printer may not be able to reproduce in the legend.
- (viii) If colors are used, avoid using similar shades of the same color and avoid very light colors.

In figure ordinate and abscissa scales (as well as table column headings), avoid the ambiguous use of numbers with exponents. Usually, it is preferable to use the appropriate Système International d'Unités (SI) symbols (for 10^6 , m for 10^3 , k for 10^3 , and M for 10^6 , etc.). Thus, a representation of 20,000 cpm on a figure ordinate should be made by the number 20 accompanied by the label kcpm. A complete listing of SI symbols can be found in the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) publication *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (RSC Publishing, Cambridge, United Kingdom, 2007); an abbreviated list is available at <http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>.

When powers of 10 must be used, the journal requires that the exponent power be associated with the number shown. In representing 20,000 cells per ml, the numeral of the ordinate should be “2” and the label should be “10⁴ cells per ml” (not “cells per ml 10⁴”). Likewise, an enzyme activity of 0.06 U/ml might be shown as 6 accompanied by the label 10² U/ml. The preferred designation is 60 mU/ml (milliunits per milliliter).

Presentation of Nucleic Acid Sequences

Long nucleic acid sequences must be presented as figures in the following format to conserve space. Print the sequence in lines of approximately 100 to 120 nucleotides in a nonproportional (monospace) font that is easily legible when published with a line length of 6 inches (ca. 15.2 cm). If possible, lines of nucleic acid sequence should be further subdivided into blocks of 10 or 20 nucleotides by spaces within the sequence or by marks above it. Uppercase and lowercase letters may be used to designate the exon-intron structure or transcribed regions, etc., if the lowercase letters remain legible at a 6-inch (ca. 15.2-cm) line length. Number the sequence line by line; place numerals representing the first base of each line to the left of the lines. Minimize spacing between lines of sequence, leaving room only for annotation of the sequence. Annotation may include boldface, underlining, brackets, and boxes, etc. Encoded amino acid sequences may be presented, if necessary, immediately above or below the first nucleotide of each codon, by using the single-letter amino acid symbols. Comparisons of multiple nucleic acid sequences should conform as nearly as possible to the same format.

Figure Legends

On initial submission, to assist review, the legend should be incorporated in the image file and appear beneath the figure. At the modification stage, figure legends must instead appear in the manuscript text file.

Legends should provide enough information so that the figure is understandable without frequent reference to the text. However, detailed experimental methods must be described in the Materials and Methods section, not in a figure legend. A method that is unique to one of several experiments may be reported in a legend only if the discussion is very brief (one or

TABLE1 Correlation between detection of V-Z viral antibody by neutralization and detection by EIA and IAHA^a

TABLE 1. Correlation between detection of V-Z viral antibody by neutralization and enzyme immunoassay			
Assay and Antibody Result	No. of samples that were V-Z virus-neutralizing antibody		Correlation (%)
	Positive ^b	Negative	
EIA			
Positive	50	4	94
Negative	3	64	
IAHA			
Positive ^c	37	0	87
Negative	16	68	

^a Sera from individuals without evidence of a current V-Z virus infection.

^b Titer of 1:4.

^c Titer of 1:8.

two sentences). Define all symbols used in the figure and define all abbreviations that are not used in the text.

Tables

Tables that contain artwork, chemical structures, or shading must be submitted as illustrations in an acceptable format at the modification stage. The preferred format for

regular tables is Microsoft Word; however, WordPerfect and Acrobat PDF are also acceptable. Note that a straight Excel file is not currently an acceptable format. Excel files must be either embedded in a Word or WordPerfect document or converted to PDF before being uploaded.

Tables should be formatted as follows. Arrange the data so that **columns of like material read down, not across**. The headings should be sufficiently clear so that the meaning of the data is understandable without reference to the text. See the “[Abbreviations](#)” section of these Instructions for those that should be used in tables. Explanatory footnotes are acceptable, but more-extensive table “legends” are not. Footnotes should not include detailed descriptions of the experiment. Tables must include enough information to warrant table format; those with fewer than six pieces of data will be incorporated into the text by the copy editor. Table 1 is an example of a well-constructed table.

NOMENCLATURE

Chemical and Biochemical Nomenclature

The recognized authority for the names of chemical compounds is *Chemical Abstracts* (CAS; <http://www.cas.org/>) and its indexes. *The Merck Index*, 14th ed. (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006), is also an excellent source. For biochemical terminology, including abbreviations and symbols, consult *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (Portland Press, London, United Kingdom, 1992), available at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html>, and the instructions to authors of the *Journal of Biological Chemistry* and the *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Do not express molecular weight in daltons; molecular weight is a unitless ratio. Molecular mass is expressed in daltons.

For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) as described in *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., New York, NY, 1992) and at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. If a nonrecommended name is used, place the proper (trivial) name in parentheses at first use in the abstract and text. Use the EC number when one has been assigned. Authors of papers describing enzymological studies should review the standards of the STREND A Commission for information required for adequate description of experimental conditions and for reporting enzyme activity data (<http://www.beilstein-institut.de/en/projekte/strenda/guidelines/>).

For nomenclature of restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes, refer to the article by Roberts et al. (Nucleic Acids Res. **31**:1805–1812, 2003).

Drugs

Whenever possible, use generic names of drugs; the use of trade names is not permitted.

Nomenclature of Microorganisms

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), must be used for all microorganisms. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *E. coli*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all taxa (kingdoms, phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics and should be italicized in the manuscript; strain designations and numbers are not. Vernacular (common) names should be in lowercase roman type (e.g., streptococcus, brucella). For

Salmonella, genus, species, and subspecies names should be rendered in standard form: *Salmonella enterica* at first use, *S. enterica* thereafter; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* at first use, *S. enterica* subsp. *arizonae* thereafter. Names of serovars should be in roman type with the first letter capitalized: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. After the first use, the serovar may also be given without a species name: *Salmonella* Typhimurium, *S. Typhimurium*, or *Salmonella* serovar Typhimurium. For other information regarding serovar designations, see *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 9th ed. (P. A. D. Grimont and F.-X. Weill, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France, 2007; see <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>). For a summary of the current standards for *Salmonella* nomenclature and the Kaufmann-White criteria, see the article by Brenner et al. (J. Clin. Microbiol. **38**:2465–2467, 2000), the opinion of the Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (Int.J. Syst. Evol. Microbiol. **55**:519–520, 2005), and the article by Tindall et al. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**:521–524, 2005).

The spelling of bacterial names should follow the *Approved Lists of Bacterial Names (Amended) & Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes* (V. B. D. Skerman et al., ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989) and the validation lists and notification lists published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (formerly the *International Journal of Systematic Bacteriology*) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Bacterial Nomenclature Up-to-Date (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>) and List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>). If there is reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks in the title and at its first use in the abstract and the text and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text. “*Candidatus*” species should always be set in quotation marks.

For guidelines regarding new names and descriptions of new genera and species, see the articles by Tindall (Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:1309–1312, 1999) and Stackebrandt et al. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**:1043–1047, 2002). To validate new names and/or combinations, authors must submit three copies of their published article to the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

It is recommended that a strain be deposited in at least two recognized culture collections in different countries when that strain is necessary for the description of a new taxon (Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**:2239–2244, 2000).

Since the classification of fungi is not complete, it is the responsibility of the author to determine the accepted binomial for a given organism. Sources for these names include *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 5th ed. (C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout, ed., Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2011), and *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. (P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter, and J. A. Stalpers, ed., CABI International, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom, 2008); see also <http://www.speciesfungorum.org/Names/Fundic.asp>.

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and reported on the ICTV Virus Taxonomy website (<http://www.ictvonline.org/index.asp>). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, as with other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*). When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Microorganisms, viruses, and plasmids should be given designations consisting of letters and serial numbers. It is generally advisable to include a worker's initials or a descriptive symbol

of locale or laboratory, etc., in the designation. Each new strain, mutant, isolate, or derivative should be given a new (serial) designation. This designation should be distinct from those of the genotype and phenotype, and italicized genotypic and phenotypic symbols should not be included. Plasmids are named with a lowercase “p” followed by the designation in uppercase letters and numbers. To avoid the use of the same designation as that of a widely used strain or plasmid, check the designation against a publication database such as Medline.

Genetic Nomenclature

To facilitate accurate communication, **it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body.** Review and/or publication of submitted manuscripts that contain new or nonstandard nomenclature may be delayed by the editor or the Journals Department so that they may be reviewed.

Bacteria. The genetic properties of bacteria are described in terms of phenotypes and genotypes. The phenotype describes the observable properties of an organism. The genotype refers to the genetic constitution of an organism, usually in reference to some standard wild type. Use the recommendations of Demerec et al. (*Genetics* **54**:61–64, 1966) as a guide to the use of these terms. If your manuscript contains information including genetic nomenclature, please refer to the Instructions to Authors of the *Journal of Bacteriology*.

“Mutant” versus “mutation.” Keep in mind the distinction between a mutation (an alteration of the primary sequence of the genetic material) and a mutant (a strain carrying one or more mutations). One may speak about the mapping of a mutation, but one cannot map a mutant. Likewise, a mutant has no genetic locus, only a phenotype.

“Homology” versus “similarity.” For use of terms that describe relationships between genes, consult the articles by Theissen (*Nature* **415**:741, 2002) and Fitch (*Trends Genet.* **16**: 227–231, 2000). “Homology” implies a relationship between genes that have a common evolutionary origin; partial homology is not recognized. When sequence comparisons are discussed, it is more appropriate to use the term “percent sequence similarity” or “percent sequence identity,” as appropriate.

Tetracycline resistance determinants. The nomenclature for tetracycline resistance determinants is based on the proposal of Levy et al. (*Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1523–1524, 1999). The style for such determinants is, e.g., Tet B; the space helps distinguish the determinant designation from that for phenotypes and proteins (TetB). The above-referenced article also gives the correct format for genes, proteins, and determinants in this family.

Locus tags. Locus tags are systematic, unique identifiers that are assigned to each gene in GenBank. All genes mentioned in a manuscript should be traceable to their sequences by the reader, and locus tags may be used for this purpose in manuscripts to identify uncharacterized genes. In addition, authors should check GenBank to make sure that they are using the correct, up-to-date format for locus tags (e.g., uppercase versus lowercase letters and the presence or absence of an underscore, etc.). Locus tag formats vary between different organisms and also may be updated for a given organism, so it is important to check GenBank at the time of manuscript preparation.

Viruses. The genetic nomenclature for viruses differs from that for bacteria. In most instances, viruses have no phenotype, since they have no metabolism outside host cells.

Therefore, distinctions between phenotype and genotype cannot be made. Superscripts are used to indicate hybrid genomes. Genetic symbols may be one, two, or three letters.

Eukaryotes. FlyBase (<http://flybase.org/>) is the genetic nomenclature authority for *Drosophila melanogaster*. WormBase (<http://wormbase.org/>) is the genetic nomenclature authority for *Caenorhabditis elegans*. When naming genes for *Aspergillus* species, the nomenclature guidelines posted at http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/sequence_info/nomenclature.htm should be followed, and the *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspgd.org>) should be searched to ensure that any new name is not already in use. The *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>) and the *Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org>) are authorities for *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* genetic nomenclature, respectively. For more information about the genetic nomenclature of eukaryotes, see the Instructions to Authors for *Eukaryotic Cell and Molecular and Cellular Biology*.

ABBREVIATIONS AND CONVENTIONS

Verb Tense

ASM strongly recommends that for clarity you use the **past** tense to narrate particular events in the past, including the procedures, observations, and data of the study that you are reporting. Use the present tense for your own general conclusions, the conclusions of previous researchers, and generally accepted facts. Thus, most of the abstract, Materials and Methods, and Results will be in the past tense, and most of the introduction and some of the Discussion will be in the present tense.

Be aware that it may be necessary to vary the tense in a single sentence. For example, it is correct to say “White (30) demonstrated that XYZ cells *grow* at pH 6.8,” “Figure 2 shows that ABC cells failed to grow at room temperature,” and “Air *was* removed from the chamber and the mice *died*, which *proves* that mice *require* air.” In reporting statistics and calculations, it is correct to say “The values for the ABC cells *are* statistically significant, indicating that the drug inhibited . . .”

For an in-depth discussion of tense in scientific writing, see *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 7th ed.

Abbreviations

General. Abbreviations should be used as an aid to the reader, rather than as a convenience for the author, and therefore their **use should be limited**. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 1992) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g., “the drug” or “the substrate”). Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, and Leu, etc.) may also be used.

Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., “Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM).” Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Not requiring introduction. In addition to abbreviations for Système International d'Unités (SI) units of measurement, other common units (e.g., bp, kb, and Da), and chemical symbols for the elements, the following should be used without definition in the title, abstract, text,

figure legends, and tables: DNA (deoxyribonucleic acid); cDNA (complementary DNA); RNA (ribonucleic acid); cRNA (complementary RNA); RNase (ribonuclease); DNase (deoxyribonuclease); rRNA (ribosomal RNA); mRNA (messenger RNA); tRNA (transfer RNA); AMP, ADP, ATP, dAMP, ddATP, and GTP, etc. (for the respective 5 phosphates of adenosine and other nucleosides) (add 2-, 3-, or 5- when needed for contrast); ATPase and dGTPase, etc. (adenosine triphosphatase and deoxyguanosine triphosphatase, etc.); NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized); NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced); NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced); NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized); poly(A) and poly(dT), etc. (polyadenylic acid and polydeoxythymidylic acid, etc.); oligo(dT), etc. (oligodeoxythymidylic acid, etc.); UV (ultraviolet); PFU (plaque-forming units); CFU (colony-forming units); MIC (minimal inhibitory concentration); Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]; DEAE (diethylaminoethyl); EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); EGTA [ethylene glycol-bis-(aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid]; HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2ethanesulfonic acid); PCR (polymerase chain reaction); and AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Abbreviations for cell lines (e.g., HeLa) also need not be defined.

The following abbreviations should be used without definition in tables:

amt (amount)	SE (standard error)
approx. (approximately)	SEM (standard error of the mean)
avg (average)	sp act (specific activity)
concn (concentration)	sp gr (specific gravity)
diam (diameter)	temp (temperature)
expt (experiment)	tr (trace)
exptl (experimental)	vol (volume)
ht (height)	vs (versus)
mo (month)	wk (week)
mol wt (molecular weight)	wt (weight)
no. (number)	yr (year)
prepn (preparation)	
SD (standard deviation)	

Drugs. Should an author decide to abbreviate the names of antimicrobial agents in a manuscript, the following standard abbreviations are strongly recommended.

Antibacterial agents. Amikacin, AMK; amoxicillin, AMX; amoxicillin-clavulanic acid, AMC; ampicillin, AMP; ampicillin-sulbactam, SAM; azithromycin, AZM; azlocillin, AZL; aztreonam, ATM; carbenicillin, CAR; cefaclor, CEC; cefadroxil, CFR; cefamandole, FAM; cefazolin, CFZ; cefdinir, CDR; cefditoren, CDN; cefepime, FEP; cefetamet, FET; cefixime, CFM; cefmetazole, CMZ; cefonicid, CID; cefoperazone, CFP; cefotaxime, CTX; cefotetan, CTT; ceftazidime, CAZ; ceftibuten, CTB; ceftizoxime, ZOX; ceftriaxone, CRO; cefuroxime (axetil) and cefuroxime (sodium), CXM; cephalixin, LEX; cephalothin, CEF; cephapirin, HAP; cephradine, RAD; chloramphenicol, CHL; cinoxacin, CIN; ciprofloxacin, CIP; clarithromycin, CLR; clinafloxacin, CLX; clindamycin, CLI; daptomycin, DAP; dicloxacillin, DCX; dirithromycin, DTM; doxycycline, DOX; enoxacin, ENX; erythromycin, ERY; fleroxacin, FLE; fosfomycin, FOF; gatifloxacin, GAT; gentamicin, GEN; grepafloxacin, GRX; imipenem, IPM; kanamycin, KAN; levofloxacin, LVX; linezolid, LZD; lomefloxacin, LOM; loracarbef, LOR; meropenem, MEM; methicillin, MET; mezlocillin, MEZ; minocycline, MIN; moxalactam, MOX; moxifloxacin, MXF; nafcillin, NAF; nalidixic acid, NAL; netilmicin, NET; nitrofurantoin, NIT; norfloxacin, NOR; ofloxacin, OFX; oxacillin, OXA; penicillin, PEN; piperacillin, PIP; piperacillin-tazobactam, TZP; quinupristin-dalfopristin (Synercid), Q-D; rifabutin, RFB; rifampin, RIF; rifapentine, RFP; sparfloxacin, SPX; spectinomycin, SPT; streptomycin, STR; teicoplanin, TEC; telithromycin, TEL; tetracycline, TET; ticarcillin, TIC; ticarcillin-clavulanic acid, TIM; tobramycin, TOB;

trimethoprim, TMP; trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT; trovafloxacin, TVA; and vancomycin, VAN.

β -Lactamase inhibitors. Clavulanic acid, CLA; sulbactam, SUL; and tazobactam, TZB.

Antifungal agents. Amphotericin B, AMB; clotrimazole, CLT; flucytosine, 5FC; fluconazole, FLC; itraconazole, ITC; ketoconazole, KTC; nystatin, NYT; terbinafine, TRB; and voriconazole, VRC.

Antiviral agents. Acyclovir, ACV; cidofovir, CDV; famciclovir, FCV; foscarnet, FOS; ganciclovir, GCV; penciclovir, PCV; valacyclovir, VCV; and zidovudine, AZT.

Reporting Numerical Data

Standard metric units are used for reporting length, weight, and volume. For these units and for molarity, use the prefixes m, μ , n, and p for 10^3 , 10^6 , 10^9 , and 10^{12} , respectively. Likewise, use the prefix k for 10^3 . Avoid compound prefixes such as m or $\mu\mu$. Use $\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ in place of the ambiguous ppm. Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K.

When fractions are used to express units such as enzymatic activities, it is preferable to use whole units, such as “g” or “min,” in the denominator instead of fractional or multiple units, such as g or 10 min. For example, “pmol/min” is preferable to “nmol/10 min,” and “ $\mu\text{mol/g}$ ” is preferable to “nmol/ μg .” It is also preferable that an unambiguous form, such as exponential notation, be used; for example, “ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ” is preferable to “ $\mu\text{mol/g/min}$.” Always report numerical data in the appropriate SI units.

Representation of data as accurate to more than two significant figures must be justified by presentation of appropriate statistical analyses.

For a review of some common errors associated with statistical analyses and reports, plus guidelines on how to avoid them, see the article by Olsen (Infect. Immun. **71**:6689–6692, 2003).

For a review of basic statistical considerations for virology experiments, see the article by Richardson and Overbaugh (J. Virol. **79**:669–676, 2005).

Statistics

Statistical analysis of data is a crucial component of scientific publication. Authors who are unsure of proper statistical analysis should have their manuscripts checked by a qualified statistician.

The following is a list of important items that must be considered before manuscript submission. Deficiencies in any of these areas may delay review and/or publication.

(i) Statistical analyses were performed on all quantitative data regardless of how significant the differences look in the tables or figures.

(ii) Data were appropriately analyzed as parametric (normally distributed) or nonparametric data.

(iii) Parametric and nonparametric data are presented appropriately. Means and standard deviations or standard errors are appropriate means of presenting data analyzed by parametric analyses (i.e., *t* test and analysis of variance [ANOVA]), but only medians and surrounding levels (quartiles, quintiles, and 10th and 90th percentiles, etc.) are appropriate for nonparametric statistics (Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test, etc.). Means have no meaning in nonparametric analyses.

(iv) For any data in which there are more than two comparisons (i.e., between one control and more than one experimental group), an analysis must be done for multigroup comparisons. Such an analysis would usually be an ANOVA for parametric data or a Kruskal-Wallis test for nonparametric data. *t* tests cannot be used when more than two groups are being compared (except as indicated below). Failure to use multigroup tests generates type 1 errors: concluding that two data sets within the overall data set being compared are different when in fact they are not. Exception: some statisticians argue that two-group comparisons

can be used on multigroup data if the expected outcomes are appropriately anticipated before the experiment. For example, data generated by individually testing two unrelated factors for their effects on a target with only a single, untreated target as a control could be appropriately analyzed by *t* tests instead of ANOVA.

(v) For all appropriate multigroup comparisons, two *P* values must be generated and provided in the manuscript. The main *P* value applies to the overall data set and indicates that within that data set at least two groups differ from each other. The overall *P* value does not indicate which two groups are different. The main *P* value and the overall *P* value should be computed by using a *post hoc* test. For ANOVA, these *post hoc* tests are usually Dunnett's test (used to compare multiple experimental groups to a single control), the Fisher protected least significant difference (PLSD) test, the Tukey-Kramer test, and the Games-Howell test. Others may be used. Note that each *post hoc* test has certain underlying assumptions that may not be applicable to the data under analysis. For a Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA, the Dunn procedure is appropriate to generate *P* values for two-group comparisons.

(vi) Data presented as endpoints (i.e., LD₅₀ and ID₅₀, etc.) contain both the calculated value and a confidence interval with a statistical significance associated with it (95%, 99%, or similar confidence interval), calculated by logit or probit analysis. Simple LD₅₀ values, such as Reed-Muench calculations, may not be used alone.

(vii) When samples are taken multiple times from one experimental entity (i.e., multiple serum samples from one animal, gross pathology scores measured for the same animal over time or growth curves, etc.), one cannot use analyses such as *t* tests, ANOVA, or the Mann-Whitney test, etc., because these tests assume that each measure is independent. An entity with a high score on day 1 is more likely to have a high score on day 2 than is an entity with a low score. It is likely that some expert statistical help will be needed for these situations, usually involving regression analysis or survival analysis, etc.

(viii) Statistical significance and biological significance are not the same. There is nothing magical about a *P* value of 0.05. When results from large sample sizes are compared, a *P* value of 0.05 will often be obtained, as *P* value is a function of both sample size and effect size. If sample sizes are large, then more rigorous (i.e., smaller) *P* values may be desirable. If sample sizes are small, *P* values of 0.05 may still be important. There should be both statistical and biological significance to the results and conclusions in the manuscript.

For a review of some common errors associated with statistical analyses and reports, plus guidelines on how to avoid them, see the article by Olsen (Infect. Immun. **71**:6689–6692, 2003).

For a review of basic statistical considerations for virology experiments, see the article by Richardson and Overbaugh (J. Virol. **79**:669–676, 2005).

Isotopically Labeled Compounds

For simple molecules, labeling is indicated in the chemical formula (e.g., ¹⁴CO₂, ³H₂O, and H₂³⁵SO₄). Brackets are not used when the isotopic symbol is attached to the name of a compound that in its natural state does not contain the element (e.g., ³²S-ATP) or to a word that is not a specific chemical name (e.g., ¹³¹I-labeled protein, ¹⁴C-amino acids, and ³H-ligands).

For specific chemicals, the symbol for the isotope introduced is placed in square brackets directly preceding the part of the name that describes the labeled entity. Note that configuration symbols and modifiers precede the isotopic symbol. The following examples illustrate correct usage:

[¹⁴ C]urea	UDP-[U- ¹⁴ C]glucose
L-[methyl- ¹⁴ C]methionine	<i>E. coli</i> [³² P]DNA
[2,3- ³ H]serine	fructose 1,6-[1- ³² P]bisphosphate
[α- ¹⁴ C]lysine	[γ- ³² P]ATP