

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS SALIVARES DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE: UM ESTUDO CLÍNICO**

Patrícia Luciana Serra Nunes

São Luís

2018

Patrícia Luciana Serra Nunes

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS SALIVARES DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE: UM ESTUDO CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade CEUMA para obtenção do título  
de Mestre em Odontologia

Área de concentração: Odontologia Integrada

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Meire Coelho  
Ferreira

São Luís

2018

Patrícia Luciana Serra Nunes

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS SALIVARES DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE: UM ESTUDO CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade CEUMA para obtenção do título  
de Mestre em Odontologia

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa

Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina de Andrade Monteiro

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ceci Nunes Carvalho

## **DEDICATÓRIA**

À minha filha, alegria dos meus dias e aos pacientes do HUMI.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sua constante presença em minha vida.

Ao meu esposo e filha por todo amor e compreensão nas minhas ausências durante este período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa, a quem tanto admiro pela gentileza e inteligência. Agradeço pela confiança e atenção durante todo este período de convivência.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Meire Coelho Ferreira, com quem tanto aprendi, sempre me incentivando a fazer melhor. Um exemplo de disciplina e dedicação à pesquisa e ensino.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Soares Fernandes e ao Prof. Me. Domingos Magno por todo auxílio e disponibilidade em ajudar nas análises laboratoriais, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA pelo interesse e esforço em prol da pesquisa e crescimento da instituição.

Às famílias dos pacientes com Mucopolissacaridose. Obrigada pela confiança e amizade que construímos durante este período. Que sorte a minha conhecer vocês! Acredito que os laços que criamos vão além dos muros do hospital.

A toda equipe multiprofissional da Pediatria do Hospital Universitário Materno Infantil, em especial a Dr<sup>a</sup>. Francisca Chagas por disponibilizar os pacientes para este estudo e a Dr<sup>a</sup>. Marilene de

Fátima Reis Ribeiro, chefe da Pediatria do HUMI pelo incentivo na realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem  
as impossibilidades, lembrai-vos de que  
as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia  
impossível.”

Charles Chaplin

Nunes PLS. Análise dos parâmetros salivares de pacientes com Mucopolissacaridose: um estudo clínico. São Luís. Universidade CEUMA; 2018.

## RESUMO

**Introdução:** As Mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias raras, de caráter crônico, progressivo e sistêmico, resultante da deficiência ou falta de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos Glicosaminoglicanos (GAG). Parâmetros de estresse nitrativo já foram identificados em amostras de sangue e urina de pacientes com MPS, porém é incerto se estes marcadores biológicos podem ser detectados na saliva e, conseqüentemente, utilizados em métodos auxiliares de diagnóstico e monitoramento desta doença. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de  $\text{NO}^{\text{X}}$  (nitrito/nitrato), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), proteína (albumina), sangue e leucócitos na saliva de pacientes com MPS e indivíduos saudáveis e verificar as correlações entre esses níveis e parâmetros clínicos (índice de placa visível, índice de sangramento gengival, cárie e defeitos de esmalte) e bioquímicos (fluxo salivar e pH) de avaliação de saúde bucal. **Materiais e métodos:** A coleta da saliva total estimulada foi realizada através da mastigação de filme plástico. Os pacientes foram orientados a expelir a saliva em tubo estéril mantido em gelo a cada 1 minuto. Ao final de 10 minutos, o fluxo salivar foi calculado e todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 1 mL e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. A contagem de  $\text{NO}^{\text{X}}$  foi realizada pelo método colorimétrico de Griess e a absorbância foi determinada com filtro de 550nm em espectofotômetro. A presença de nitrito, proteína (albumina), sangue (hemácias), leucócitos e valores de pH foram determinados por leitura de tiras reagentes para testes de diagnóstico e os resultados foram expressos em escores, com exceção dos valores pH, hemácias e leucócitos. **Resultados:** Os níveis de  $\text{NO}^{\text{X}}$  e  $\text{NO}_2^-$  foram superiores no grupo MPS ( $p<0,05$ ). A presença de albumina foi detectada apenas em algumas amostras de saliva do grupo MPS (6 amostras), 60% e 40% dos pacientes do grupo MPS apresentaram hemácias e leucócitos nas amostras analisadas, respectivamente. Além disso, a média do fluxo salivar foi estatisticamente inferior em relação ao controle ( $p<0,05$ ), acompanhado por um pH mais ácido nestes pacientes ( $p<0,05$ ). Os índices de sangramento gengival e de placa visível foram correlacionados com o nitrito ( $r=0,670$ ;  $r=0,612$ , respectivamente;  $p<0,05$ ) e com proteína ( $r=0,883$ ;  $r=0,651$ , respectivamente;  $p<0,05$ ). Correlações entre pH e fluxo salivar ( $r=0,761$ ;  $p<0,05$ ) e, também,



entre número de dentes cariados e número de dentes com defeitos de esmalte ( $r=0,877$ ;  $p<0,05$ ) foram observadas. Correlações entre os índices de placa e sangramento gengival com  $\text{NO}^x$  não foram observadas. **Conclusão:** Os dados apresentados sugerem que os parâmetros salivares avaliados auxiliam na compreensão da fisiopatologia das MPS e que a quantificação desses marcadores pode ser utilizada como ferramenta de auxílio de diagnóstico e monitoramento da doença.

**Palavras-chave:** Mucopolissacaridose; Saliva; Óxido Nítrico.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Características sociodemográficas e saúde bucal dos pacientes (n=20) ..... 37

**Tabela 2 –** Valores de média e desvio-padrão para dentes cariados, com placa visível, sangramento gengival e fluxo salivar (n=20) ..... 38

**Tabela 3 –** Correlações entre os parâmetros clínicos, bioquímicos e os níveis de NO<sup>x</sup> e nitrito nas amostras de saliva ..... 39

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Marcadores em amostras de saliva de pacientes com Mucopolissacaridose. Níveis de **(A)** NO<sup>x</sup>, **(B)** nitrito, **(C)** proteínas e **(D)** valores de pH em amostras de saliva obtidas de pacientes com Mucopolissacaridose (n=10) e saudáveis (n=10). \*p<0,05..... 41

**Figura 2** –Sangue em amostras de saliva de pacientes dos grupos controle e Mucopolissacaridose. **(A)** Porcentagem de pacientes com sangue detectado na saliva e **(B)** quantidade de hemácias/μL nas amostras de saliva no grupo controle (n=2) e no grupo MPS (n=6)..... 42

**Figura 3** –Leucócitos em amostras de saliva de pacientes dos grupos controle e Mucopolissacaridose. **(A)** Porcentagem de pacientes com leucócitos em amostras de saliva e **(B)** número de leucócitos/μL nas amostras de saliva do grupo controle (n=3) e MPS (n=4).....43

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	13
<b>2 Materiais e Métodos</b> .....	16
<b>3 Resultados</b> .....	20
<b>4 Discussão</b> .....	22
Referências .....	29
Anexos .....	44

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS SALIVARES DE PACIENTES  
COM MUCOPOLISSACARIDOSE: UM ESTUDO CLÍNICO**

**RESUMO**

As Mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias raras, de caráter crônico, progressivo e sistêmico, resultante da deficiência ou falta de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos Glicosaminoglicanos (GAG). Parâmetros de estresse nitrativo já foram identificados em amostras de sangue e urina neste grupo de doenças em outros estudos. Entretanto, esses parâmetros não foram analisados na saliva. Este estudo comparou os níveis de  $\text{NO}^x$  (nitrito/nitrato), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), proteína (albumina), sangue (hemácias) e leucócitos, bem como o fluxo salivar e valores de pH em amostras de saliva de 10 pacientes com MPS e 10 indivíduos saudáveis. Os níveis de  $\text{NO}^x$  e  $\text{NO}_2^-$  foram superiores no grupo MPS ( $p < 0,05$ ). A presença de albumina foi detectada apenas em algumas amostras de saliva do grupo MPS (6 pacientes), 60% e 40% dos pacientes do grupo MPS apresentaram hemácias e leucócitos nas amostras analisadas, respectivamente. Além disso, as médias do fluxo salivar e pH foram estatisticamente inferiores em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Em conjunto, nossos dados indicam que os parâmetros salivares avaliados nesse estudo clínico auxiliam na compreensão da fisiopatologia das Mucopolissacaridoses. Sugere-se que a quantificação desses marcadores pode ser utilizada como ferramenta de auxílio para diagnóstico e monitoramento da doença.

**Palavras-chave:** Mucopolissacaridose; Saliva; Óxido Nítrico.

**1 Introdução**

As Mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias raras, de caráter crônico, progressivo e sistêmico. Resultam da deficiência ou falta de enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos Glicosaminoglicanos (GAG), anteriormente conhecidos como

mucopolissacarídeos e que deram nome a doença<sup>1,2</sup>. Existem sete tipos de MPS atualmente descritas, que são classificadas de acordo com o tipo de enzima deficiente na célula. A heterogeneidade clínica é significativa, desse modo, pacientes com deficiência enzimática idêntica podem apresentar magnitude clínica distinta, variando de leve, moderada à grave<sup>3</sup>. As manifestações clínicas das MPS variam de acordo com o tipo de deficiência enzimática. Manifestações como hérnia umbilical e inguinal, macrocefalia, baixa estatura, alterações esqueléticas acentuadas, opacidade da córnea, mãos em garra, dismorfismo facial, macroglossia, dentes inclusos, hiperplasia gengival e defeitos no esmalte dental são algumas das manifestações mais comumente observadas<sup>4,5,6</sup>. Sabe-se que o diagnóstico das MPS muitas vezes é tardio baseando-se inteiramente em métodos clínicos e laboratoriais tradicionais, dessa forma se faz necessário o desenvolvimento de métodos alternativos eficazes e de baixo custo que possam ser utilizados de forma abrangente na população.

A saliva total é um fluido biológico complexo uma vez que vários contribuintes são responsáveis pela produção deste fluido corporal. Isto torna o diagnóstico da doença por meio da análise da saliva desafiador de um lado e atraente de outro. A maior parte da porção de fluido de saliva total (600-1200 mL / dia) deriva das principais glândulas salivares e uma variedade de glândulas salivares menores localizados na face interna do rebordo, palato e

língua. O uso de saliva é atraente para os parâmetros de monitoramento de saúde e doença não só por causa de seus vários contribuintes, mas também porque sua obtenção é não-invasiva, fácil, indolor e não requer pessoas especialmente treinadas para coleta de amostras. A perspectiva de identificar e medir biomarcadores na saliva abre caminhos para diagnóstico, detecção precoce, progressão de monitoramento da doença e a conformidade com as modalidades de tratamento<sup>7</sup>. Há muitos estudos relatados com o objetivo de usar saliva para fins de diagnóstico clínico e monitoramento de doenças bucais e sistêmicas<sup>7,8,9,10,11,12</sup>.

Nas doenças de depósito lisossomal (DDL) como as MPS há uma sobrecarga lisossômica resultante da deficiência enzimática. Apesar dos mecanismos patogênicos das DDL terem sido amplamente estudados, esses não são totalmente compreendidos. Estudos afirmam que a liberação de conteúdo lisossômico induz a produção no citoplasma de espécies reativas de nitrogênio (ERNS), sugerindo que o dano lisossômico causa maior estresse nitrativo<sup>13</sup>. Parâmetros de estresse nitrativo já foram identificados em amostras de sangue e urina de pacientes com MPS, porém é incerto se estes marcadores biológicos podem ser detectados na saliva e, conseqüentemente, utilizados em métodos auxiliares de diagnóstico e monitoramento desta doença. Assim, esse estudo pioneiro, teve como objetivo determinar os níveis de NO<sup>x</sup> (nitrito/nitrato), nitrito, proteína (albumina), sangue e leucócitos na saliva de pacientes com

MPS e indivíduos saudáveis e verificar as correlações entre esses níveis e parâmetros clínicos (índice de placa visível, índice de sangramento gengival, cárie e defeitos de esmalte) e bioquímicos (fluxo salivar e pH) de avaliação de saúde bucal.

## **2 Materiais e métodos**

Vinte pacientes, com idade entre 05 e 22 anos, foram incluídos neste estudo clínico. Os procedimentos realizados neste estudo seguiram os critérios da Resolução 466/12 do Ministério da Saúde, que regula a pesquisa envolvendo seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade CEUMA (Número do Parecer: 1.756.478). Todos os participantes foram conscientizados dos objetivos do estudo, bem como de prováveis riscos e benefícios. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento foram assinados pelos responsáveis e participantes, respectivamente. Os pacientes foram divididos em 2 grupos. O grupo MPS (grupo mucopolissacaridose) foi composto por todos os pacientes com diagnóstico bioquímico ou molecular de MPS do Estado do Maranhão, regularmente atendidos no Hospital Universitário Materno Infantil em São Luís, Maranhão (n=10) e o Grupo Controle, composto por 10 pacientes sistemicamente saudáveis com boa higiene oral atendidos na clínica de Odontologia da Universidade CEUMA em São Luís, Maranhão. Consideramos como critérios de exclusão pacientes que não colaboravam com a coleta salivar e/ou fizeram uso de antibióticos e/ou anti-inflamatórios



no mês anterior ao da coleta e, do grupo controle, pacientes com lesões cáries ativas e/ou com doença periodontal. Todos os pacientes avaliados foram selecionados por cumprirem os critérios de elegibilidade. Um estudo piloto foi realizado previamente com o intuito de testar/ajustar a metodologia e calibrar o operador/avaliador. Os pacientes que participaram do estudo piloto foram excluídos da amostra principal.

Foi aplicado um questionário aos responsáveis destinado à coleta de informações demográficas, socioeconômicas e de saúde geral dos pacientes. Ainda, realizou-se um exame clínico detalhado para avaliação da presença de cárie dentária<sup>14</sup>, doença periodontal<sup>15,16</sup> e defeitos de esmalte<sup>17</sup>. Posteriormente, as amostras de saliva foram coletadas entre 09:00 e 10:00 horas da manhã para minimizar o efeito do ritmo circadiano, 2 h após a última refeição. Previamente à coleta, os pacientes receberam uma profilaxia dentária com pasta profilática não contendo aditivos<sup>18</sup>.

A coleta de saliva total estimulada foi realizada através da mastigação de filme plástico (Parafilm®, 6.25 cm<sup>2</sup>). O paciente foi orientado a expelir a saliva em tubo estéril mantido em gelo a cada 1 minuto e não engolir. A saliva coletada no primeiro minuto foi descartada e a coleta de saliva estimulada foi realizada por mais 10 minutos. Ao final, o paciente foi orientado a expelir a saliva com o filme plástico<sup>19</sup>. O fluxo salivar foi obtido a partir do cálculo do volume da amostra pelo tempo de coleta da amostra.

Todas as amostras de saliva coletadas foram centrifugadas, a 4000 rpm, por 20 minutos, à temperatura de 4°C, para remoção de células epiteliais, leucócitos, hemácias e microrganismos presentes na saliva. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado em alíquotas de 1 mL e armazenada a - 80° C. As amostras congeladas foram posteriormente submetidas às análises.

O conteúdo de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  foi mensurado pelo método colorimétrico de Griess, um indicador da produção de óxido nítrico (NO) na saliva. Para isto, o Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foi reduzido a Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por incubação de 80µL de amostra com 20µL de 1U/ml nitrato redutase e 10 µL de 1mM NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) por 30 min à 37°C em placa de 96 poços. Em seguida, 100 µL de reagente de Griess, uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato em ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a 5%, foram adicionados por poço e incubados por 15 min à 37°C. A absorbância de cada amostra foi determinada com filtro de 550 nm em espectrofotômetro (MB-580/Heales) e comparadas à de uma curva padrão de nitrito. Os resultados foram expressos em µM. Além disso, foram determinados a presença de nitrito, proteína, sangue, leucócitos e valores de pH em amostras de saliva dos dois grupos através de tiras reagentes para testes de diagnósticos *in vitro* (Biocon 10, Vercon Diagnostic). Para isso, as amostras foram descongeladas e a tiras reagentes foram cobertas com 20 µL de saliva em cada área correspondente aos testes e

incubadas por 120 segundos para análise de leucócitos e 60 segundos para os demais marcadores. Após esse período, a leitura semi-quantitativa foi realizada através da comparação visual entre o gráfico de cores e a intensidade de cor refletida por cada área. Para a avaliação dos níveis de nitrito um escore (1.0 - 3.0) foi atribuído: 1.0 (ausência); 2.0 (pequena e moderada) e 3.0 (grande quantidade). Os resultados de quantificação de proteína (albumina) também foram apresentados em escores (1.0 – 3.0) onde: 1.0 (ausência albumina), 2.0 (traços de albumina) e 3.0 (presença de albumina).

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para os dados relacionados aos aspectos sociodemográficos e de saúde bucal foram utilizados os testes qui-quadrado de Pearson, exato de Fisher e qui-quadrado de tendência linear. As médias de fluxo salivar, por apresentarem distribuição normal, foi aplicado o teste *t* de *Student*. Para os valores de nitrito, pH, hemácias e leucócitos foi aplicado o teste de Mann Whitney. As correlações entre os parâmetros avaliados foram mensuradas pelo teste de correlação de Spearman. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises e gráficos foram realizadas usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA - versão 5.0) e o *Statistical Package for the Social Science* (IBM SPSS, versão 21.0, IBM Corporation, Armonk, New York, USA) foi empregado para a análise dos dados.

### 3 Resultados

De acordo com a tabela 1, em ambos os grupos, MPS e Controle, 60% dos pacientes apresentaram idade entre 5 e 12 anos e 40%, idade entre 13 e 22 anos. Não houve diferença entre os gêneros ( $p=1,000$ ) e a maior parte dos pacientes com MPS foram da raça parda (70%). Quando questionados sobre a saúde bucal, 70% dos pacientes do grupo MPS a classificaram como ótima ou boa.

A tabela 2 apresenta os valores de média e desvio-padrão de dentes cariados, placa visível e sangramento gengival de pacientes com MPS, bem como o fluxo salivar dos dois grupos. A média de dentes cariados foi de 1,11 ( $\pm 1,96$ ) na dentição permanente e de 1,00 ( $\pm 2,00$ ) na dentição decídua, com índice de placa de 54,08% ( $\pm 37,51$ ) e índice de sangramento gengival de 31,96% ( $\pm 38,65$ ). Em relação à média de fluxo salivar, houve uma diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), com média de fluxo salivar dos pacientes saudáveis de 1,02 ( $\pm 0,56$ ) ml/min e de 0,25 ( $\pm 0,27$ ) ml/min do grupo MPS.

De acordo com a Figura 1A, o grupo de pacientes com mucopolissacaridose apresentaram níveis mais elevados de  $\text{NO}^x$  na saliva (1,6 vezes) quando comparados com o grupo controle. Além disso, os valores de mediana para as concentrações de nitrito salivar foram 2.0 (2.0-3.0) e 3.0 (2.0-3.0) para os grupos controle e MPS, respectivamente, mostrando uma diferença estatisticamente

significante ( $p < 0,05$ ) (Figura 1B). Com relação à quantificação de proteínas, não foi identificada a presença de albumina no grupo controle, no entanto o grupo de pacientes com MPS apresentou mediana de 2.0 (1.0-3.0) (Figura 1C). De acordo com a figura 1D, podemos observar que os pacientes do grupo MPS apresentaram valores de pH entre 6.0-7.0, enquanto o grupo controle exibiu valores entre 7.0-8.0 com  $p < 0,05$ .

A figura 2A representa a porcentagem do número de pacientes com presença ou ausência de sangue na saliva detectado pelas tiras reagentes nos dois grupos. No grupo controle, 20% apresentaram sangue nas amostras analisadas, no grupo MPS, 60%. A figura 2B representa a quantidade de hemácias/ $\mu\text{L}$  dos pacientes com presença de sangue nas amostras. No grupo controle, os pacientes apresentaram 25 hemácias/ $\mu\text{L}$  e 80 hemácias/ $\mu\text{L}$ . No grupo MPS, os valores de hemácias foram similares, com exceção de um paciente que apresentou grande quantidade de hemácias (200 hemácias/ $\mu\text{L}$ ).

A figura 3A representa a porcentagem do número de pacientes com leucócitos detectados na saliva dos dois grupos, sendo que em 30% dos pacientes do grupo controle esta célula foi identificada e em 40% do grupo MPS. Destes pacientes, um do grupo MPS apresentou grande quantidade de leucócitos (500 leucócitos/ $\mu\text{L}$ ) (figura 3B).

Os índices de sangramento gengival e de placa visível foram

correlacionados com o nitrito ( $r=0,670$ ;  $r=0,612$ , respectivamente;  $p<0,05$ ) e com proteína ( $r=0,883$ ;  $r=0,651$ , respectivamente;  $p<0,05$ ). Correlações entre pH e fluxo salivar ( $r=0,761$ ;  $p<0,05$ ) e, também, entre número de dentes cariados e número de dentes com defeitos de esmalte ( $r=0,877$ ;  $p<0,05$ ) foram observadas. Correlações entre os índices de placa e sangramento gengival com  $\text{NO}^x$  não foram observadas (tabela 3).

#### **4 Discussão**

A saliva tem sido amplamente utilizada como ferramenta para auxiliar o diagnóstico, detecção precoce, progressão e monitoramento de diversas doenças sistêmicas<sup>7,8,9,10,11,12</sup>. Apesar dos mecanismos patogênicos das Mucopolissacaridoses serem amplamente estudados, esses não são totalmente compreendidos. Dessa forma a avaliação dos parâmetros de estresse nitrativo e biomarcadores na saliva em pacientes com MPS podem auxiliar na compreensão da fisiopatologia desta doença.

Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo MPS apresentou uma maior produção de  $\text{NO}^x$  e nitrito nas amostras de saliva examinadas em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Até a presente data, este é o primeiro estudo que quantificou os níveis salivares de óxido nítrico e nitrito neste grupo de doenças. Outro estudo analisou amostras de sangue e urina em pacientes MPS II submetidos à Terapia de Reposição Enzimática (TRE) de longo prazo (tempo médio 5,2 anos), demonstrando uma correlação positiva

entre os níveis de GAG e concentrações urinárias de nitrato e nitrito e também entre IL-1 $\beta$  e concentrações plasmáticas de NO, verificando aumento de ERNS no plasma e urina destes pacientes, reforçando que mesmo em TRE a inflamação e o estado nitrativo encontram-se presentes nesta grave doença<sup>13</sup>. Trabalhos apontam que o acúmulo de GAG seria um dos responsáveis pelo desencadeamento da inflamação e que mesmo nos pacientes em TRE há um aumento de mediadores inflamatórios<sup>13,20,21,22,23</sup>. Acreditamos então, que é possível o envolvimento do NO na indução e manutenção de estados inflamatórios em pacientes com MPS.

Ainda, o NO é considerado um dos componentes salivares com potencial promissor para predição de eventos inflamatórios e seu papel na patogênese das doenças bucais tem sido investigado em diversos trabalhos<sup>24,25,26,27</sup>. Sánchez et al. relacionaram os níveis salivares de nitrato total e nitrito com a saúde periodontal de 74 indivíduos. Os autores observaram que o aumento das concentrações de nitrato e nitrito salivar estava relacionado com alterações no periodonto e que o tratamento periodontal levou à diminuição dos níveis destes marcadores. O mesmo estudo concluiu que os níveis de nitrato e nitrito salivar estão associados aos mecanismos de defesa e sugeriu que as glândulas salivares podem responder às doenças orais infecciosas, aumentando a liberação de NO<sup>27</sup>.

A correlação entre parâmetros clínicos e os níveis de NO<sup>x</sup> e nitrito salivares foram analisados neste estudo. Correlações positivas entre os ISG e IPV com os níveis de NO<sup>x</sup> foram observadas nos portadores de MPS, contudo não foram significativas. Quando correlacionamos os mesmos parâmetros somente com o nitrito dosado nas tiras reagentes, obtivemos uma moderada correlação e significativa. De acordo com Carossa et al., há um aumento da produção de óxido nítrico bucal durante o início da deposição de placa dental<sup>28</sup>. Estudos similares postulam que este aumento resulta da super expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) por células gengivais, ocasionada não só pela proliferação bacteriana, mas também pela produção de citocinas estimuladas pela presença de placa bacteriana<sup>29,30</sup>.

Tem sido descrito que a produção de NO na cavidade oral relacionada à doença periodontal se dá via iNOS, uma vez que a resposta inflamatória está ocorrendo. Os fibroblastos, células do infiltrado inflamatório e outras células do periodonto passam a produzir NO via iNOS, o qual faz parte de um mecanismo antibacteriano natural de defesa, na saúde. No entanto, excessivas quantidades desse radical livre podem contribuir para a destruição tecidual na periodontite, de forma patogênica<sup>27,31</sup>. Se considerarmos que os pacientes com MPS apresentaram índices de placa e sangramento gengival e níveis de NO<sup>x</sup> elevados, somados aos fatores retentivos de placa como defeitos de esmalte, sugerimos que



estes pacientes apresentam maiores chances de desenvolverem doenças periodontais.

Alguns marcadores de diagnóstico derivados do plasma podem ser encontrados na saliva, como a albumina. A albumina é a principal proteína plasmática e sua concentração na saliva depende do estado de saúde periodontal do doador<sup>32</sup>. Isso foi demonstrado em um estudo experimental de gengivite, onde a concentração de albumina derivada do plasma aumentou após cessar a higiene bucal e retornou aos níveis basais após a retomada da higiene bucal<sup>33</sup>. Nosso estudo analisou a presença ou ausência da proteína albumina nas amostras de saliva de pacientes dos dois grupos. Essa proteína não foi detectada em nenhuma amostra de saliva do grupo controle, em contrapartida a maioria dos pacientes do grupo MPS apresentou essa proteína na saliva analisada. Uma forte correlação entre essa proteína plasmática e o índice de sangramento gengival ( $r=0,883$  e  $p<0,05$ ) foi constatada e uma moderada correlação com o índice de placa visível ( $r=0,651$  e  $p<0,05$ ), confirmando que o estado de saúde periodontal influencia na concentração de albumina na saliva.

Ao analisarmos a presença de sangue na saliva pelas tiras reagentes, duas amostras do grupo controle apresentaram hemácias, mesmo que clinicamente a presença de sangramento não tenha sido detectada. Possivelmente algum trauma durante a profilaxia dental ou até mesmo na mastigação do filme plástico pode ter ocorrido. Em relação à presença de leucócitos, um paciente com

MPS II apresentou níveis elevados dos mesmos na saliva. Este paciente fazia uso contínuo de Risperidona, um anti-psicótico que pode apresentar leucocitose como um efeito adverso<sup>34</sup>. Outro dado importante foi que este paciente realizava infusão de doses inapropriadas da enzima para o seu peso corporal, possivelmente este fato diminuiu o efeito protetor esperado da TRE, o que também pode ter contribuído tanto para aumento de leucócitos quanto para os níveis mais elevados de NO<sup>x</sup>.

Nossos resultados apoiam a hipótese de que indivíduos com MPS apresentam maiores chances de apresentar cárie e doenças periodontais, uma vez que a média do índice de placa encontrada nos nossos resultados foi de 54,08%, sendo que metade dos pacientes examinados apresentaram índices maiores que 50% e três destes, índices maiores que 95%. Somente três pacientes não apresentaram sangramento gengival. Alterações orofaciais observadas nestes pacientes como má oclusão, limitações de abertura bucal, macroglossia e defeitos de esmalte<sup>35,36,37,38,39</sup> somadas a limitações motoras e intelectuais de alguns pacientes, podem ter contribuído para a condição bucal observada neste estudo.

A maioria dos pacientes do grupo MPS classificou sua saúde bucal como ótima ou boa, mesmo acometidos por problemas bucais como a presença de cárie, o que demonstrou que a autopercepção quanto à saúde bucal de grande parte não se aproxima da condição

clínica observada. Sugerimos que esta percepção diminuída resulta do conjunto de patologias associadas as MPS<sup>3</sup> que, para estes pacientes, podem ser vistas como mais graves que os problemas bucais apresentados.

Também, uma forte correlação entre o número de dentes com defeitos de esmalte e o número de dentes cariados foi encontrada. Normalmente o esmalte dos indivíduos com MPS é frágil e se apresenta com maior porosidade<sup>5,40,41</sup>, principalmente os portadores de MPS IV<sup>5</sup>. Esses defeitos modificam topograficamente o esmalte dental o que facilita a adesão bacteriana<sup>42,43</sup>. Yamakoshi et al. (2002) afirmam que a deficiência da enzima N-acetil-galactosamina-6-sulfatase na MPS IVA resultam no acúmulo patológico dos GAG queratan sulfato e condroitina 6-sulfato nos lisossomos de ameloblastos na fase secretora, contribuindo para formação de esmalte defeituoso<sup>44</sup>.

Os parâmetros bioquímicos fluxo salivar e pH também foram avaliados neste estudo, mostrando-se diminuídos nos pacientes com MPS em comparação aos controles. O fluxo salivar estimulado < 0,8ml/min é considerado uma condição patológica e tem sido um forte indicador de um risco aumentado de cárie<sup>45,46</sup>. Oito pacientes apresentaram fluxo salivar menor ou igual a 0,3 ml/min. Acreditamos que as causas da hipossalivação neste grupo de pacientes estejam relacionadas às características orofaciais que influenciam no desempenho mastigatório<sup>47</sup> e o possível acúmulo de

GAG nas glândulas salivares. Associado ao fluxo salivar reduzido, pudemos observar também que os pacientes com MPS apresentaram valores mais baixos pH quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, a redução do pH está diretamente relacionada ao processo de desmineralização do esmalte aumentando a suscetibilidade desses pacientes à cárie dentária<sup>48</sup>. Uma correlação positiva entre o fluxo salivar e pH foi observada nos nossos resultados, corroborando com o estudo de Ponciano et al., onde pacientes portadores de MPS apresentaram médias de fluxo e pH salivares menores em relação aos controles saudáveis<sup>46</sup>. Ainda, investigamos a correlação entre índice de placa visível com fluxo e pH salivares, tendo como resultado uma correlação negativa entre esses parâmetros. Esses dados reforçam o risco aumentado de cárie nestes pacientes.

Em conjunto, nossos dados indicam que os parâmetros salivares avaliados nesse estudo clínico auxiliam na compreensão da fisiopatologia das Mucopolissacaridoses. Sugere-se que a quantificação desses marcadores pode ser utilizada como ferramenta de auxílio no monitoramento da doença.

## Referências

1. Pereira, JL, Garebelini, VCP, Palazzo, VC. Natural evolution in a patient with Mucopolysaccharidosis type VI. *Rev Neurocienc.* **19(3)**, 472-476 (2011).
2. Kingma, SD, Bodamer, OA and Wijburb, FA. Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **29**,145-157 (2015).
3. Neufeld, EF, Muenzer, J. The Mucopolysaccharidoses. . In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, et al., editors. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York, NY: McGraw-Hill; 10.1036/ommbid.165 (2014).
4. Vieira, T *et al.* Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet A.* **146**, 1741-1747 (2008).
5. De Almeida-Barros, RQ *et al.* Evaluation of oral manifestations of patients with mucopolysaccharidosis IV and VI: clinical and imaging study. *Clin Oral Invest.* <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2100-8> (2017).

6. De Santana SDJ, *et al.* Mucopolysaccharidosis: radiographic findings in a series of 16 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* .**120**, 240-246.doi:10.1016/j.oooo.2015.08.009 (2015).
7. Slaughter YA, Malamud D. Oral diagnostics for the geriatric populations: current status and future prospects. *Dent Clin North Am.* **49(2)**,445-461 (2005)
8. Li Y, *et al.* Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res.* **10(24)**, 8442-8450 (2004).
9. Sunitha M, Shanmugam S. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosal diseases: a controlled clinical trial. *Ind J Dent Res.* **17(3)**,117-120 (2006).
10. Brosky ME. The Role of Saliva in Oral Health: Strategies for prevention and Management of Xerostomia. *J Support Oncol.* **5**, 215–225 (2007).
11. Spielmann, N and Wong, DT. Saliva diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* **17**, 345–354 (2011).
12. Amado, FML, Ferreira, RP & Vitorino, R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clinical Biochemistry.* **46**, 506–517 (2013).

13. Jacques, CED et al. Oxidative and nitrate stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1862 (9)**, 1608-1616 (2016).
- 14.OMS: *Levantamentos Básicos em Saúde Bucal*. 21-52 (Santos Livraria,1999).
- 15.Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. **22**, 121-135 (1964).
- 16.Carter H, Barnes G. The gingival bleeding index. *J Periodontol*. **45**, 801-805 (1974).
- 17.World Health Organization. *Oral Health Surveys: Basic Methods*. 4<sup>th</sup> (ed. Geneva, 1997).
- 18.Siqueira Jr WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down Syndrome. *Spec Care Dentist*. **22(6)**, 226-230 (2002).
- 19.Siqueira, WL, et al. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J Dent Res*. **87(5)**, 445-450 (2008).

20. Letícia F et al. Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*. **103 (2)**, 121-127 (2011).
21. Donida B, Marchetti DP, Biancini GB, et al. Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*. **1852**, 1012–1019 (2015).
22. Donida B, et al. Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: Increased keratan urinary levels. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. **11**, 46-53 (2017).
23. Donida B, et al. Oxidative damage and redox in Lysosomal Storage Disorders: *Biochemical markers Clinica Chimica Acta*, **466**, 46-53 (2017).
24. Aurer AAJ, et al. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. **28 (6)**, 565–568 (2001).
25. Parwani SR, Chitnis PJ, Parwani, RN. Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease – a case-control



- and interventional study. *International Journal of Dental Hygiene*. **10 (1)**, 67–73 (2012).
26. Meschiari CA et al. Salivary, blood and plasma nitrite concentrations in periodontal patients and healthy individuals before and after periodontal treatment. *Clinica Chimica Acta*. **444**, 293-296 (2015).
27. Sánchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L. Total salivary nitrates and nitrites in oral health and periodontal disease. *Nitric Oxide*. **36**, 31-35 (2014).
28. Carossa S, et al. Oral nitric oxide during plaque deposition. *European Journal of Clinical Investigation*. **31 (10)**, 876-879 (2001).
29. Rausch-Fan X, Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *European Journal of Clinical Investigation*. **31**, 833-835 (2001).
30. Reher VG, Zenobio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *J Oral Sci*. **49**, 271-276 (2007).
31. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold, PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and

- cultured human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*. **35**,194– 200 (2000).
32. Helmerhorst EJ , Dawes C, Oppenheim FG. The complexity of oral physiology and its impact on salivary diagnostics. *Oral Dis*. **18**, 1-23 (2017).
33. Oppenheim FG. Historical perspectives and present. In: Salivary diagnostics. Ed. Wong, D. T.: 79-92.
34. Disponível em: <http://www.folheto.net/risperidona-sandoz-4-mg-comprimidos-risperidona-bula-do-medicamento>. Acesso em 01 de março de 2018.
35. Fonseca FR, de Santana Sarmiento DJ, Vasconcelos Medeiros PF, Diniz DN, dos Santos MT. Patients with mucopolysaccharidosis have tendencies towards vertical facial growth. *J Oral Maxillofac Surg*. **72**, 2539-2546 (2014).
36. Kantaputra PN, et al. Oral manifestations of 17 patients affected with mucopolysaccharidosis type VI. *J Inherit Metab Dis*. **37**, 263-268 (2014).
37. Oliveira AFB, Chaves AMB, Rosenblatt A. The influence of enamel defects on the development of early childhood caries in a population with low socioeconomic status: a longitudinal study. *Caries Res*. **40**, 296-302 (2006).

38. Savitha NS, Saurabh G, Krishnamoorthy SH, Nandan S, Ambili A. Hunter's syndrome: a case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* **33**, 66-68 (2015).
39. Carneiro NCR et al. Oral health of children and adolescents with mucopolysaccharidosis and mother's Sense of Coherence. *Spec Care Dentist.* **XX(X)**, 1-7 (2017).
40. Fitzgerald J, Verveniotis SJ. Morquio's syndrome: a case report and review of clinical findings. *N Y State Dent J.* **64**, 48-50 (1998).
41. Guven G, et al. Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome): oral and radiographic findings and ultrastructural/chemical features of enamel and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **105**, 72-78 (2008).
42. Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month old children. *Community dentistry and oral epidemiology.* **28(4)**, 295-306 (2000).

43. Vargas-Ferreira F, Zeng J, Thomson WM, Peres MA, Demarco FF. Association between developmental defects of enamel and dental caries in schoolchildren. *Journal of dentistry*. **42(5)**, 540-546 (2014).
44. Yamakoshi Y, et al. Porcine N-acetylgalactosamine 6-sulfatase (GALNS) cDNA sequence and expression in developing teeth. *Connect Tissue Res*. **43(2-3)**, 167-175 (2002).
45. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *Journal of Dental Education*. **65(10)**.1054-1062 (2001).
46. Ponciano S, Areias C, Leao-Teles E and Sampaio-Maia, B. Hyposalivation, acidic saliva, decayed teeth and oral yeast prevalence in children with mucopolysaccharidosis. *MedicalExpress*. **2(5)**, 1-7 (2015).
47. Sreebny LM. Saliva health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J*. **50(3)**, 140-161 (2000).
48. Ericsson Y. Clinical investigation of the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand*. **97**, 131-165 (1959).

**Tabela 1 – Características sociodemográficas e saúde bucal dos pacientes (n=20)**

	Controle n (%)	MPS n (%)	p
<b>Idade</b>			
5 a 12 anos	6 (60%)	6 (60%)	1,000*
13 a 22 anos	4 (40%)	4 (40%)	
<b>Gênero</b>			
Masculino	5 (50%)	5 (50%)	1,000
Feminino	5 (50%)	5 (50%)	
<b>Raça</b>			
Branca	5 (50%)	2 (20%)	0,117**
Parda	5 (50%)	7 (70%)	
Preta	0 (0,0%)	1 (10%)	
<b>Saúde Bucal</b>			
Ótima/Boa	10 (100%)	7 (70%)	0,211*
Ruim/Péssima	0 (0,0%)	3 (30%)	

MPS: tipo I (15%), tipo II (10%), tipo III (5%), tipo IV (10%), tipo VI (10%); Teste qui-quadrado de Pearson; \* Teste exato de Fisher; \*\* Teste qui-quadrado de tendência linear.

**Tabela 2** – Valores de média e desvio-padrão para dentes cariados, com placa visível, sangramento gengival e fluxo salivar (n=20)

<b>Variáveis</b>	<b>Controle</b>	<b>MPS</b>	<b>p*</b>
<b>Nº de dentes permanentes cariados</b>			
Média (dp)	0,00	1,11(1,965)	—
<b>Nº de dentes decíduos cariados</b>			
Média (dp)	0,00	1,00 (2,000)	—
<b>Índice de placa visível (%)</b>			
Média (dp)	0,00	54,08 (37,51)	—
<b>Índice de sangramento gengival (%)</b>			
Média (dp)	0,00	31,96 (38,65)	—
<b>Fluxo salivar em ml/min</b>			
Média (dp)	1,02 (0,56)	0,25 (0,27)	0,002*

\*Teste t de Student

**Tabela 3** – Correlações entre os parâmetros clínicos, bioquímicos e os níveis de NO<sup>x</sup> e nitrito nas amostras de saliva (n=20)

	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>NO<sup>x</sup></b>		
Índice de sangramento gengival	0,348	0,133
Índice de placa visível	0,408	0,074
<b>Nitrito</b>		
Índice sangramento gengival	0,670	0,001*
Índice de placa visível	0,612	0,004*
<b>pH</b>		
Fluxo salivar	0,761	<0,001*
<b>IPV</b>		
Fluxo salivar	-0,776	<0,001*
pH	-0,710	<0,001*
<b>Nº dentes defeito de esmalte</b>		
Nº dentes cariados	0,877	0,001*
<b>Proteína</b>		
Índice de sangramento gengival	0,883	<0,001*
Índice de placa visível	0,651	0,002

## Legenda de Figuras

**Figura 1** – Marcadores em amostras de saliva de pacientes com Mucopolissacaridose. Níveis de **(A)** NO<sup>x</sup>, **(B)** nitrito, **(C)** proteína e **(D)** valores de pH em amostras de saliva obtidas de pacientes com MPS (n=10) e saudáveis (n=10). \* p< 0,05.

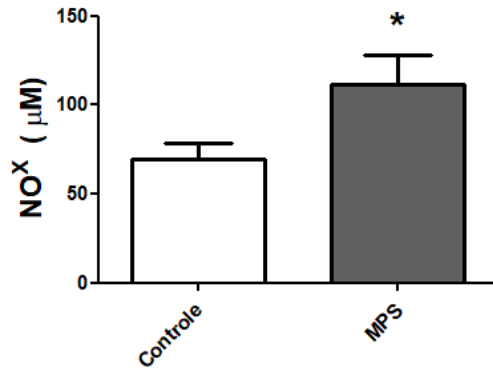
**Figura 2** – Sangue em amostras de saliva de pacientes dos grupos controle e Mucopolissacaridose. **(A)** Porcentagem de pacientes com sangue detectado na saliva e **(B)** quantidade de hemácias/  $\mu$ L nas amostras de saliva no grupo controle (n=2) e no grupo MPS (n=6).

**Figura 3** – Leucócitos em amostras de saliva de pacientes dos grupos controle e Mucopolissacaridose. **(A)** Porcentagem de pacientes com leucócitos em amostras de saliva e **(B)** número de leucócitos/  $\mu$ L nas amostras de saliva do grupo controle (n=3) e MPS (n=4).

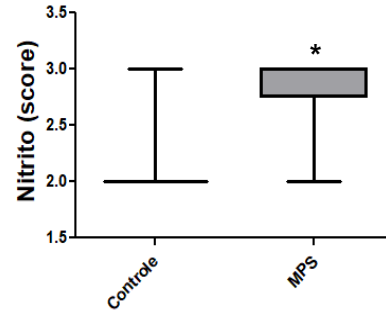


Figura 1 –

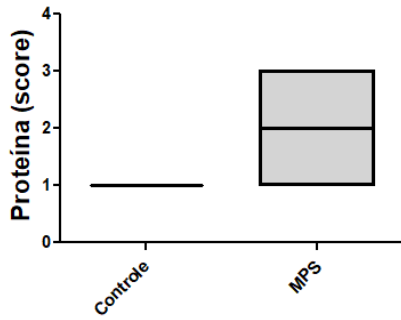
**A**



**B**



**C**



**D**

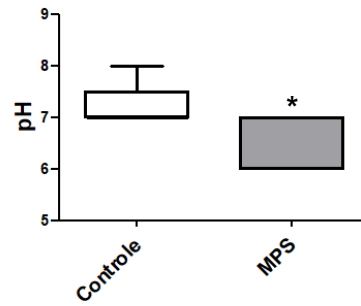
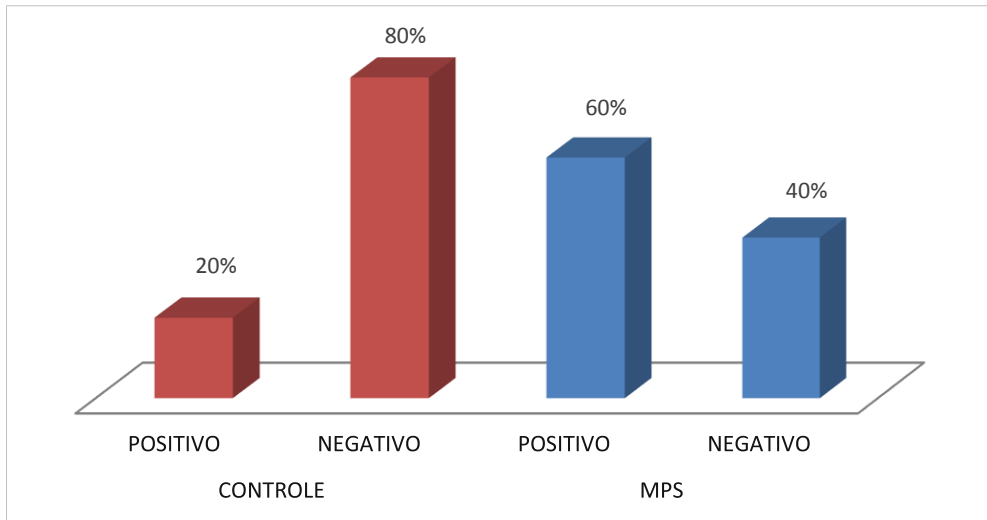


Figura 2 –

A



B

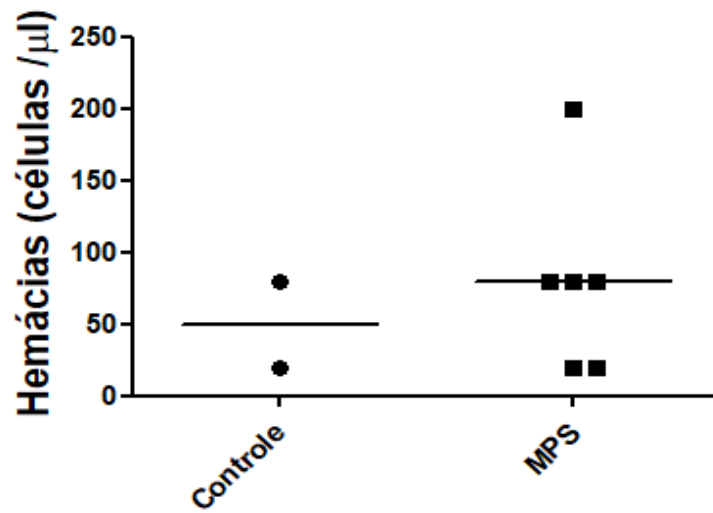
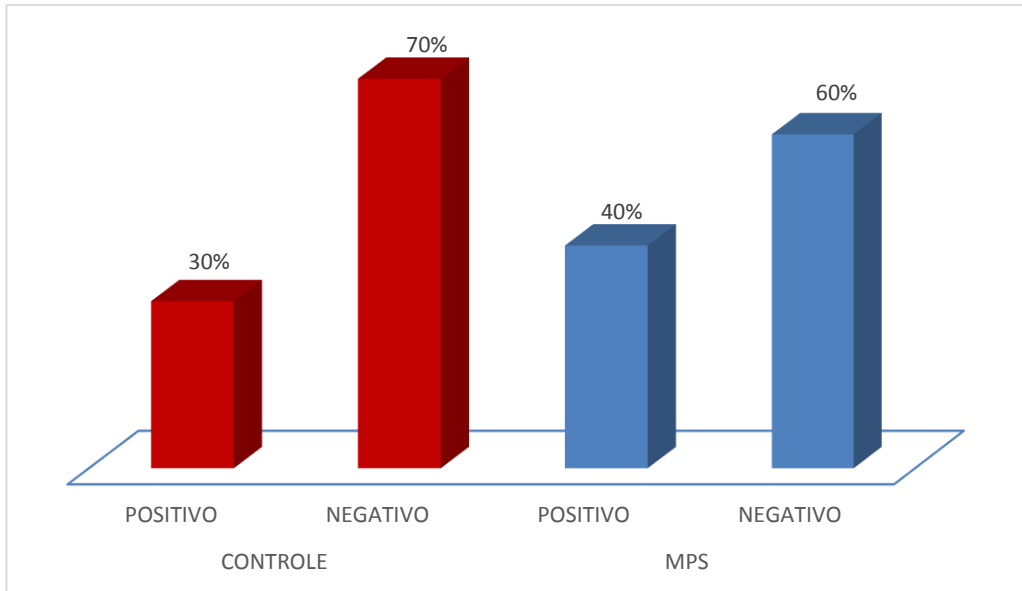
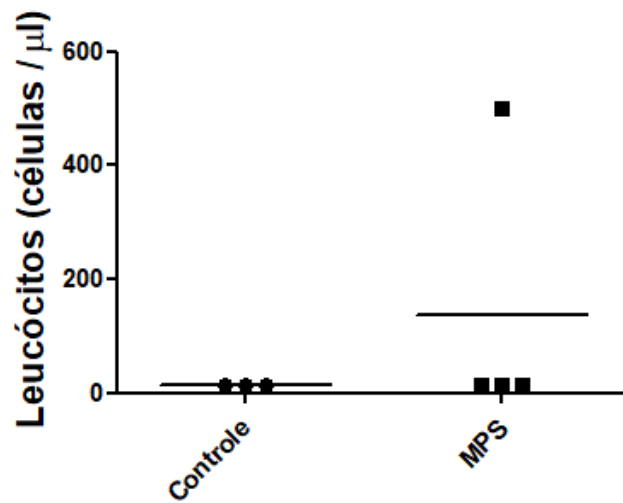


Figura 3 –

A



B



## ANEXO 1

### Normas para submissão de artigo na revista *Scientific Reports*

#### General information for preparing manuscripts

##### Format of articles

*Scientific Reports* publishes original research in one format, Article. In most cases we do not impose strict limits on word count or page number. We do, however, strongly encourage authors to write concisely and to adhere to the guidelines below.

Articles should ideally be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum Article title length is 20 words. The Abstract — which must be no more than 200 words long and contain no references — should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

For the main body of the text, there are no explicit requirements for section organization. According to the authors' preference, the text may be organized as best suits the research. As a guideline and in the majority of cases, however, we recommend that you structure your manuscript as follows:

- Introduction
- Results (with subheadings)
- Discussion (without subheadings)
- Methods

A specific order for the main body of the text is not compulsory and, in some cases, it may be appropriate to combine sections. Figure legends are limited to 350 words. As a guideline references should be limited to 60 (this is not strictly enforced). Footnotes should not be used.

We suggest that Articles contain no more than 8 display items ( [figures](#) and/or [tables](#) ). In addition, a limited number of uncaptioned molecular structure graphics and numbered mathematical equations may be included if necessary. To enable typesetting of papers, the number of display items should be commensurate with the word length — we suggest that for Articles with less than 2,000 words, no more than 4 figures/tables should be included. Please note that schemes are not used and should be presented as figures.

Authors must provide a competing interests statement within the manuscript file.

Submissions should include a cover letter, a manuscript text file, individual figure files and optional supplementary information files. For first submissions (ie not revised manuscripts), authors may incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size; the figures may be inserted in the text at the appropriate positions, or grouped at the end. Supplementary information should be combined and supplied as a single separate file, preferably in PDF format.

ONLY the following file types can be uploaded for Article text:

- txt, doc, docx, tex

A [submission template](#) is available in the [Overleaf](#) template gallery to help you prepare a LaTeX manuscript within the *Scientific Reports* formatting criteria.

*Scientific Reports* is read by scientists from diverse backgrounds. In addition, many are not native English speakers. Authors should, therefore, give careful thought to how their findings may be communicated clearly. Although a shared basic knowledge of science may be assumed, please bear in mind that the language and concepts that are standard in one field may be unfamiliar to non-specialists. Thus, technical jargon should be avoided and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations, particularly those that are not standard, should also be kept to a minimum. Where unavoidable, abbreviations should be defined in the text or legends at their first occurrence, and abbreviations should be used thereafter. The background, rationale and main conclusions of the study should be clearly explained. Titles and abstracts in particular should be written in language that will be readily intelligible to any scientist. We strongly recommend that authors ask a colleague with different expertise to review the manuscript before submission, in order to identify concepts and terminology that may present difficulties to non-specialist readers.

The format requirements of *Scientific Reports* are described below.

*Scientific Reports* uses UK English spelling.

### **Cover letter**

Authors should provide a cover letter that includes the affiliation and contact information for the corresponding author. Authors should briefly explain why the work is considered appropriate for *Scientific*

*Reports* . Authors are asked to suggest the names and contact information for scientific reviewers and they may request the exclusion of certain referees. Please ensure that your cover letter also includes suggestions for [Editorial Board Members](#) who would be able to handle your submission. Finally, authors should indicate whether they have had any prior discussions with a *Scientific Reports* Editorial Board Member about the work described in the manuscript.

## **Format of manuscripts**

In most cases we do not impose strict limits on word counts and page numbers, but we encourage authors to write concisely and suggest authors adhere to the guidelines below. For a definitive list of which limits are mandatory please visit the [submission checklist page](#) .

Articles should be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum title length is 20 words. The Abstract (without heading) - which must be no more than 200 words long and contain no references - should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

The manuscript text file should include the following parts, in order: a title page with author affiliations and contact information (the corresponding author should be identified with an asterisk). The main text of an Article can be organised in different ways and according to the authors' preferences, it may be appropriate to combine sections.

As a guideline, we recommend that sections include an Introduction of referenced text that expands on the background of the work. Some overlap with the Abstract is acceptable. This may then be followed by sections headed Results (with subheadings), Discussion (without subheadings) and Methods.

The main body of text must be followed by References, Acknowledgements (optional), Author Contributions (names must be given as initials), Additional Information (including a Competing Interests Statement), Figure Legends (these are limited to 350 words per figure) and Tables (maximum size of one page). Footnotes are not used.

For first submissions (ie not revised manuscripts), authors may choose to incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size - the figures may be inserted within the text at the appropriate positions, or grouped at the end. Supplementary Information should be combined and supplied as a separate file,

preferably in PDF format. The first page of the Supplementary Information file should include the title of the manuscript and the author list.

Authors who do not incorporate the manuscript text and figures into a single file should adhere to the following: all textual content should be provided in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX; figures should be provided as individual files.

The manuscript file should be formatted as single-column text without justification. Pages should be numbered using an Arabic numeral in the footer of each page. Standard fonts are recommended and the 'symbols' font should be used for representing Greek characters.

TeX/LaTeX - Authors submitting LaTeX files may use the standard 'article' document class (or similar) or may use the wlscrep.cls file and [template provided by Overleaf](#) . Non-standard fonts should be avoided; please use the default Computer Modern fonts. For the inclusion of graphics, we recommend graphicx.sty. Please use numerical references only for citations. Our system cannot accept .bib files. If references are prepared using BibTeX (which is optional), please include the .bbl file with your submission (as a 'related manuscript file') in order for it to be processed correctly; this file is included automatically in the zip file generated by Overleaf for submissions. Please see this [help article on Overleaf](#) for more details. Alternatively ensure that the references (source code) are included within the manuscript file itself. As a final precaution, authors should ensure that the complete .tex file compiles successfully on their own system with no errors or warnings, before submission.

Manuscripts published in *Scientific Reports* are not subject to in-depth copy editing as part of the production process. Authors are responsible for procuring copy editing or language editing services for their manuscripts, either before submission, or at the revision stage, should they feel it would benefit their manuscript. Such services include those provided by our affiliates [Nature Research Editing Service](#) and [American Journal Experts](#) . *Scientific Reports* authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services. To claim 10% off English editing from Nature Research Editing Service, click [here](#) . To claim 10% off American Journal Experts, click [here](#) . Please note that the use of an editing service is at the author's own expense, and in no way implies that the article will be selected for peer-review or accepted for publication.

## **Methods**

Where appropriate, we recommend that authors limit their Methods section to 1,500 words. Authors must ensure that their Methods

section includes adequate experimental and characterization data necessary for others in the field to reproduce their work. Descriptions of standard protocols and experimental procedures should be given. Commercial suppliers of reagents or instrumentation should be identified only when the source is critical to the outcome of the experiments. Sources for kits should be identified. Experimental protocols that describe the synthesis of new compounds should be included. The systematic name of the compound and its bold Arabic numeral are used as the heading for the experimental protocol. Thereafter, the compound is represented by its assigned bold numeral. Authors should describe the experimental protocol in detail, referring to amounts of reagents in parentheses, when possible (eg 1.03 g, 0.100 mmol). Standard abbreviations for reagents and solvents are encouraged. Safety hazards posed by reagents or protocols should be identified clearly. Isolated mass and percent yields should be reported at the end of each protocol.

## References

References will not be copy edited by *Scientific Reports*. References will be linked electronically to external databases where possible, making correct formatting of the references essential.

References should be numbered sequentially, first throughout the text, then in tables, followed by figures; that is, references that only appear in tables or figures should be last in the reference list. Only one publication is given for each number. Only papers or datasets that have been published or accepted by a named publication, recognized preprint server or data repository should be in the numbered list; preprints of accepted papers in the reference list should be submitted with the manuscript. Published conference abstracts and numbered patents may be included in the reference list. Grant details and acknowledgements are not permitted as numbered references. Footnotes are not used.

BibTeX (.bib) bibliography files cannot be accepted. LaTeX submission must either contain all references within the manuscript .tex file itself, or (for authors using the Overleaf template) can include the .bbl file generated during the compilation process as a 'related manuscript file' (see the "Format of manuscripts" section for more details).

*Scientific Reports* uses standard *Nature* referencing style. All authors should be included in reference lists unless there are six or more, in which case only the first author should be given, followed by 'et al.'. Authors should be listed last name first, followed by a comma and initials (followed by full stops) of given names. Article and dataset titles should be in Roman text, only the first word of the title should have an initial capital and the title should be written exactly as it



appears in the work cited, ending with a full stop. Book titles should be given in italics and all words in the title should have initial capitals. Journal and data repository names are italicized and abbreviated (with full stops) according to common usage. Volume numbers and the subsequent comma appear in bold. The full page range should be given (or article number), where appropriate.

Published papers:

Printed journals  
Schott, DH, Collins, RN & Bretscher, A. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin V lever arm length. *J. Cell Biol.* **156**, 35-39 (2002).

Online only  
Bellin, DL *et al.* Electrochemical camera chip for simultaneous imaging of multiple metabolites in biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 10535; [10.1038/ncomms10535](https://doi.org/10.1038/ncomms10535) (2016).

For papers with more than five authors include only the first author's name followed by ' *et al.* '.

Books:  
Smith, J. Syntax of referencing in *How to reference books* (ed. Smith, S.) 180-181 (Macmillan, 2013).

Online material:

Babichev, SA, Ries, J. & Lvovsky, AI Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <https://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002).

Manaster, J. Sloth squeak. *Scientific American Blog Network* <http://blogs.scientificamerican.com/psi-vid/2014/04/09/sloth-squeak> (2014).

Hao, Z., AghaKouchak, A., Nakhjiri, N. & Farahmand, A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. *figshare* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.853801> (2014).

## **Acknowledgements**

Acknowledgements should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged. Assistance from medical writers, proof-readers and editors should also be acknowledged here.

## Author contributions

*Scientific Reports* requires an Author Contribution Statement as described in the [Author responsibilities](#) section of our [Editorial and Publishing Policies](#).

## Competing interests

A [competing interests statement](#) is required for all accepted papers published in *Scientific Reports*. If there is no conflict of interest, a statement declaring this will still be included in the paper.

## Data availability

*Scientific Reports* requires a Data Availability Statement to be included in the Methods section of submitted manuscripts (see '[Availability of materials and data](#)' section for more information).

## Supplementary Information

Any Supplementary Information should be submitted with the manuscript and will be sent to referees during peer review. It is published online with accepted manuscripts. We request that authors avoid "data not shown" statements and instead make their data available via deposition in a public repository (see '[Availability of materials and data](#)' for more information). Any data necessary to evaluation of the claims of the paper that are not available via a public depository should be provided as Supplementary Information. Supplementary Information is not edited, typeset or proofed, so authors should ensure that it is clearly and succinctly presented at initial submission, and that the style and terminology conform to the rest of the paper. Authors should include the title of the manuscript and full author list on the first page.

The guidelines below detail the creation, citation and submission of Supplementary Information - publication may be delayed if these are not followed correctly. Please note that modification of Supplementary Information after the paper is published requires a formal correction, so authors are encouraged to check their Supplementary Information carefully before submitting the final version.

1. Multiple pieces of Supplementary Information can be combined and supplied as a single file, or supplied separately (eg supplementary videos, spreadsheets [.csv or .xlsx] or data files).
2. Designate each item as Supplementary Table, Figure, Video, Audio, Note, Data, Discussion, Equations or Methods, as appropriate. Number Supplementary Tables and Figures as,

for example, "Supplementary Table S1". This numbering should be separate from that used in tables and figures appearing in the main article. Supplementary Note or Methods should not be numbered; titles for these are optional.

3. Refer to each piece of supplementary material at the appropriate point(s) in the main article. Be sure to include the word "Supplementary" each time one is mentioned. Please do not refer to individual panels of supplementary figures.
4. Use the following examples as a guide (note: abbreviate "Figure" as "Fig." when in the middle of a sentence): "Table 1 provides a selected subset of the most active compounds. The entire list of 96 compounds can be found as Supplementary Table S1 online." "The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in animals involves intermediates of the D-glucuronic acid pathway (see Supplementary Fig. S2 online). Figure 2 shows..."
5. Remember to include a brief title and legend (incorporated into the file to appear near the image) as part of every figure submitted, and a title as part of every table.
6. File sizes should be as small as possible, with a maximum size of 50 MB, so that they can be downloaded quickly.

Further queries about submission and preparation of Supplementary Information should be directed to email: [scirep.admin@nature.com](mailto:scirep.admin@nature.com) .

### **Figure legends**

Figure legends begin with a brief title sentence for the whole figure and continue with a short description of what is shown in each panel in sequence and the symbols used; methodological details should be minimised as much as possible. Each legend must total no more than 350 words. Text for figure legends should be provided in numerical order after the references.

### **Tables**

Please submit tables in your main article document in an editable format (Word or TeX/LaTeX, as appropriate), and not as images. Tables that include statistical analysis of data should describe their standards of error analysis and ranges in a table legend.

### **Equations**

Equations and mathematical expressions should be provided in the main text of the paper. Equations that are referred to in the text are identified by parenthetical numbers, such as (1), and are referred to in the manuscript as "equation (1)".

For submissions in a .doc or .docx format please ensure that all equations are provided in an editable Word format. These can be produced with the equation editor included in Microsoft Word.

### **General figure guidelines**

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Figures should be numbered separately with Arabic numerals in the order of occurrence in the text of the manuscript. When appropriate, figures should include error bars. A description of the statistical treatment of error analysis should be included in the figure legend. Please note that schemes are not used; sequences of chemical reactions or experimental procedures should be submitted as figures, with appropriate captions. A limited number of uncaptioned graphics depicting chemical structures - each labelled with their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral - may be included in a manuscript.

Figure lettering should be in a clear, sans-serif typeface (for example, Helvetica); the same typeface in the same font size should be used for all figures in a paper. Use 'symbols' font for Greek letters. All display items should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, spurious decorative effects (such as three-dimensional 'skyscraper' histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. Labelling must be of sufficient size and contrast to be readable, even after appropriate reduction. The thinnest lines in the final figure should be no smaller than one point wide. Authors will see a proof that will include figures.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case bold a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with only the first letter of each label capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature (for example, ms rather than msec) or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by commas (1,000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined on the bar itself rather than in the legend. In legends, please use visual cues rather than verbal explanations such as "open red triangles".

Unnecessary figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced at the smallest size at which essential details are visible.

### **Figures for peer review**

At the initial submission stage authors may choose to upload separate figure files or to incorporate figures into the main article file, ensuring that any inserted figures are of sufficient quality to be clearly legible.

When submitting a revised manuscript all figures must be uploaded as separate figure files ensuring that the image quality and formatting conforms to the specifications below.

### **Figures for publication**

Each complete figure must be supplied as a separate file upload. Multi-part/panel figures must be prepared and arranged as a single image file (including all sub-parts; a, b, c, etc.). Please do not upload each panel individually.

Please read the [digital images integrity and standards](#) section of our [Editorial and Publishing Policies](#) . When possible, we prefer to use original digital figures to ensure the highest-quality reproduction in the journal. For optimal results, prepare figures to fit A4 page-width. When creating and submitting digital files, please follow the guidelines below. Failure to do so, or to adhere to the following guidelines, can significantly delay publication of your work.

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### **1. Line art, graphs, charts and schematics**

For optimal results, all line art, graphs, charts and schematics should be supplied in vector format, such as EPS or AI, and should be saved or exported as such directly from the application in which they

were made. Please ensure that data points and axis labels are clearly legible.

## **2. Photographic and bitmap images**

All photographic and bitmap images should be supplied in a bitmap image format such as tiff, jpg, or psd. If saving tiff files, please ensure that the compression option is selected to avoid very large file sizes.

Please do not supply Word or Powerpoint files with placed images. Images can be supplied as RGB or CMYK (note: we will not convert image colour modes).

Figures that do not meet these standards will not reproduce well and may delay publication until we receive high-resolution images.

## **3. Chemical structures**

Chemical structures should be produced using ChemDraw or a similar program. All chemical compounds must be assigned a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Structures should then be exported into a 300 dpi RGB tiff file before being submitted.

## **4. Stereo images**

Stereo diagrams should be presented for divergent 'wall-eyed' viewing, with the two panels separated by 5.5 cm. In the final accepted version of the manuscript, the stereo images should be submitted at their final page size.

## **Statistical guidelines**

Every article that contains statistical testing should state the name of the statistical test, the n value for each statistical analysis, the comparisons of interest, a justification for the use of that test (including, for example, a discussion of the normality of the data when the test is appropriate only for normal data), the alpha level for all tests, whether the tests were one-tailed or two-tailed, and the actual P value for each test (not merely "significant" or " $P < 0.05$ "). It should be clear what statistical test was used to generate every P value. Use of the word "significant" should always be accompanied by a P value; otherwise, use "substantial," "considerable," etc.

Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include the n value for each data set, a clearly labelled measure of centre (such as the mean or the median), and a clearly labelled measure of variability (such as standard deviation or range). Ranges are more appropriate than standard deviations or standard

errors for small data sets. Graphs should include clearly labelled error bars. Authors must state whether a number that follows the  $\pm$  sign is a standard error (sem) or a standard deviation (sd).

Authors must justify the use of a particular test and explain whether their data conform to the assumptions of the tests. Three errors are particularly common:

- Multiple comparisons: When making multiple statistical comparisons on a single data set, authors should explain how they adjusted the alpha level to avoid an inflated Type I error rate, or they should select statistical tests appropriate for multiple groups (such as ANOVA rather than a series of t-tests).
- Normal distribution: Many statistical tests require that the data be approximately normally distributed; when using these tests, authors should explain how they tested their data for normality. If the data do not meet the assumptions of the test, then a non-parametric alternative should be used instead.
- Small sample size: When the sample size is small (less than about 10), authors should use tests appropriate to small samples or justify their use of large-sample tests.

There is a [checklist](#) available to help authors minimize the chance of statistical errors.

### **Chemical and biological nomenclature and abbreviations**

Molecular structures are identified by bold, Arabic numerals assigned in order of presentation in the text. Once identified in the main text or a figure, compounds may be referred to by their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral (as long as the compound is referred to consistently as one of these three).

When possible, authors should refer to chemical compounds and biomolecules using systematic nomenclature, preferably using [IUPAC](#). Standard chemical and biological abbreviations should be used. Unconventional or specialist abbreviations should be defined at their first occurrence in the text.

### **Gene nomenclature**

Authors should use approved nomenclature for gene symbols, and use symbols rather than italicized full names (for example Ttn, not titin). Please consult the appropriate nomenclature databases for correct gene names and symbols. A useful resource is LocusLink.

Approved human gene symbols are provided by HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), e-mail: [hgnc@genenames.org](mailto:hgnc@genenames.org) ;

see also [www.genenames.org](http://www.genenames.org) . Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory, e-mail: [nomen@informatics.jax.org](mailto:nomen@informatics.jax.org) ; see also [www.informatics.jax.org/mgihome/nomen](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen) .

For proposed gene names that are not already approved, please submit the gene symbols to the appropriate nomenclature committees as soon as possible, as these must be deposited and approved before publication of an article.

Avoid listing multiple names of genes (or proteins) separated by a slash, as in 'Oct4/Pou5f1', as this is ambiguous (it could mean a ratio, a complex, alternative names or different subunits). Use one name throughout and include the other at first mention: 'Oct4 (also known as Pou5f1)'.

## **Characterization of chemical and biomolecular materials**

*Scientific Reports* is committed to publishing technically sound research. Manuscripts submitted to the journal will be held to rigorous standards with respect to experimental methods and characterization of new compounds. Authors must provide adequate data to support their assignment of identity and purity for each new compound described in the manuscript. Authors should provide a statement confirming the source, identity and purity of known compounds that are central to the scientific study, even if they are purchased or resynthesized using published methods.

### **1. Chemical identity**

Chemical identity for organic and organometallic compounds should be established through spectroscopic analysis. Standard peak listings (see formatting guidelines below) for <sup>1</sup>H NMR and proton-decoupled <sup>13</sup>C NMR should be provided for all new compounds. Other NMR data should be reported (<sup>31</sup>P NMR, <sup>19</sup>F NMR, etc.) when appropriate. For new materials, authors should also provide mass spectral data to support molecular weight identity. High-resolution mass spectral (HRMS) data are preferred. UV or IR spectral data may be reported for the identification of characteristic functional groups, when appropriate. Melting-point ranges should be provided for crystalline materials. Specific rotations may be reported for chiral compounds. Authors should provide references, rather than detailed procedures, for known compounds, unless their protocols represent a departure from or improvement on published methods.

### **2. Combinational compound libraries**



Authors describing the preparation of combinatorial libraries should include standard characterization data for a diverse panel of library components.

### **3. Biomolecular identity**

For new biopolymeric materials (oligosaccharides, peptides, nucleic acids, etc.), direct structural analysis by NMR spectroscopic methods may not be possible. In these cases, authors must provide evidence of identity based on sequence (when appropriate) and mass spectral characterization.

### **4. Biological constructs**

Authors should provide sequencing or functional data that validates the identity of their biological constructs (plasmids, fusion proteins, site-directed mutants, etc.) either in the manuscript text or the Methods section, as appropriate.

### **5. Sample purity**

Evidence of sample purity is requested for each new compound. Methods for purity analysis depend on the compound class. For most organic and organometallic compounds, purity may be demonstrated by high-field  $^1\text{H}$  NMR or  $^{13}\text{C}$  NMR data, although elemental analysis ( $\pm 0.4\%$ ) is encouraged for small molecules. Quantitative analytical methods including chromatographic (GC, HPLC, etc.) or electrophoretic analyses may be used to demonstrate purity for small molecules and polymeric materials.

### **6. Spectral data**

Detailed spectral data for new compounds should be provided in list form (see below) in the Methods section. Figures containing spectra generally will not be published as a manuscript figure unless the data are directly relevant to the central conclusions of the paper. Authors are encouraged to include high-quality images of spectral data for key compounds in the Supplementary Information. Specific NMR assignments should be listed after integration values only if they were unambiguously determined by multidimensional NMR or decoupling experiments. Authors should provide information about how assignments were made in a general Methods section.

Example format for compound characterization data. mp: 100-102 °C (lit. <sup>ref</sup> 99-101 °C); TLC ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 98:2 v/v):  $R_f = 0.23$ ;  $[\alpha]_D = -21.5$  (0.1 M in n-hexane);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.30 (s, 1H), 7.55-7.41 (m, 6H), 5.61 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.40 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.20 (q,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.25 (t,  $J = 8.5$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.4, 165.0, 140.5,

138.7, 131.5, 129.2, 118.6, 84.2, 75.8, 66.7, 37.9, 20.1; IR (Nujol): 1765 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis:  $\lambda_{\text{max}}$  267 nm; HRMS (m/z): [M]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O, 420.0406; found, 420.0412; analysis (calcd., found for C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O): C (57.16, 57.22), H (3.60, 3.61), N (16.87, 16.88), O (19.04, 19.09).

## 7. Crystallographic data for small molecules

Manuscripts reporting new three-dimensional structures of small molecules from crystallographic analysis should include a .cif file and a structural figure with probability ellipsoids for publication as Supplementary Information. These must have been checked using the IUCR's [CheckCIF](#) routine, and a PDF copy of the output must be included with the submission, together with a justification for any alerts reported. Crystallographic data for small molecules should be submitted to the [Cambridge Structural Database](#) and the deposition number referenced appropriately in the manuscript. Full access must be provided on publication.

## 8. Macromolecular structural data

Manuscripts reporting new structures should contain a table summarizing structural and refinement statistics. Templates are available for such tables describing [NMR](#) and [X-ray crystallography](#) data. To facilitate assessment of the quality of the structural data, a stereo image of a portion of the electron density map (for crystallography papers) or of the superimposed lowest energy structures ( $\geq 10$ ; for NMR papers) should be provided with the submitted manuscript. If the reported structure represents a novel overall fold, a stereo image of the entire structure (as a backbone trace) should also be provided.

**ANEXO 2**  
**Questionário**

**RESPONSÁVEL**

1- Nome \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2- Dia, mês e ano de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 3- Idade em anos/meses: \_\_\_\_\_

4- Sexo: ( ) masculino ( ) feminino 5- Raça: ( ) branca ( ) parda ( ) preta ( ) amarela ( ) indígena

5- Quantas pessoas moram em sua casa?  
\_\_\_\_\_

6- Nível de instrução da mãe:  
( ) Analfabeto; ( ) Ensino fundamental incompleto até o 5º ano; ( ) Ensino fundamental incompleto após o 5º ano; ( ) Ensino fundamental completo; ( ) Ensino médio incompleto (antes do 3º ano); ( ) Ensino médio completo; ( ) Ensino superior incompleto; ( ) Ensino superior completo; ( ) Pós-graduação

7- Qual é a renda mensal do grupo familiar?  
( ) menos de um salário mínimo; ( ) de um a menos de dois salários mínimos; ( ) de dois a menos de cinco salários mínimos; ( ) de cinco a menos de dez salários mínimos; ( ) acima de quinze salários mínimos

8- Quantas pessoas, incluindo você próprio, vivem da renda mensal familiar?  
( ) Uma; ( ) duas ou três; ( ) quatro ou cinco; ( ) seis ou sete; ( ) oito ou nove; ( ) dez ou mais

9. Já fez tratamento dentário? ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fiz.

10. Concluiu o tratamento? ( ) Sim ( ) Não

**CRIANÇA**

11. Você está com dor de dente? ( ) Não ( ) Sim

12. Você já teve dor de dente? ( ) Não ( ) Sim

13. Nos últimos 6 meses, você teve dor de dente? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não me lembro

14. Como classifica sua saúde bucal? ( ) 0- Ótima; ( ) 1- Boa; ( ) 2- Regular; ( ) 3- Ruim; ( ) 4- Péssima.

### ANEXO 3

#### **Critérios para avaliação da cárie dentária, segundo a OMS (1999):**

Para a dentição permanente, foi utilizado o índice CPO-D. Os componentes do índice são para dentição permanente: **C**, para dentes cariados; **P (E+Ei)**, para perdidos e **O**, para obturados. O componente “**P**” é dividido em **E** e **Ei**, sendo **E**, extraído e **Ei**, extração indicada. Os componentes **C** e **Ei** correspondem à história atual da cárie dentária e os componentes **E** e **O** correspondem à história passada da cárie dentária.

Para a dentição decídua, utilizou-se o índice ceo-d. Este indica através de seus componentes os dentes cariados (c), dentes com extração indicada (e), dentes obturados (o). A condição “extraído” não é avaliada neste índice, porque clinicamente não se conclui se o dente foi perdido por cárie ou se sofreu esfoliação dentária natural para aguardar a substituição pelo dente permanente.

#### **Critérios para classificação:**

- ✓ Hígido: não há evidências clínicas de cárie tratada ou não;
- ✓ Cariado: presença de lesão em fóssula, fissura ou em superfície lisa, com cavidade inconfundível, esmalte socavado e assoalho ou parede detectavelmente amolecido.
- ✓ Restaurado sem cárie: existência de uma ou mais restaurações permanentes e não existe cárie em nenhum ponto do dente;

- ✓ Restaurado com cárie: presença de uma ou mais restaurações permanentes e uma ou mais áreas estão com cárie;
- ✓ Dente ausente devido à cárie: dentes decíduos ou permanentes que tiveram que ser extraídos devido à cárie;
- ✓ Dente perdido por outras razões. Ausência se deve a razões ortodônticas, periodontais, traumáticas ou congênitas.
- ✓ Dente não erupcionado. Quando o dente permanente ainda não irrompeu.
- ✓ Selante. Há um selante de fissura ou a fissura oclusal foi alargada para receber um compósito.
- ✓ Resto radicular. Quando a coroa está completamente destruída pela cárie, restando apenas a raiz.
- ✓ Trauma (Fratura). Parte da superfície coronária foi perdida em consequência de trauma e não há evidência de cárie. Restaurações decorrentes de fratura coronária devem ser registradas como Trauma.
- ✓ Dente excluído. Aplicado a qualquer dente permanente que não possa ser examinado (bandas ortodônticas, hipoplasias severas etc.)

**Critérios para avaliação de defeitos do esmalte, segundo a OMS (1997):**

Opacidades/hipoplasias do esmalte

Para esta verificação, é usado o índice modificado de Defeitos de Desenvolvimento do Esmalte (Developmental Defects of Enamel - DDE). As anormalidades do esmalte são classificadas com base em sua aparência. Elas variam de acordo com a extensão, posição na superfície do dente e distribuição na dentição. Os códigos e critérios utilizados são:

0 – Normal;

1 - Opacidade delimitada. Quando, em um esmalte de espessura normal e com uma superfície intacta, observa-se uma alteração na translucidez, em graus variáveis. Possui um limite claro e distinguível do esmalte normal adjacente e pode ser de cor branca, creme, amarela ou marron;

2 - Opacidade difusa. Tipo de anormalidade que também envolve uma alteração na translucidez do esmalte, em graus variáveis e de cor branca. Não há um limite claro entre o esmalte normal adjacente e a opacidade, a qual pode se apresentar de forma linear ou como manchas esparsas ou ainda tendo uma distribuição confluyente;

3 - Hipoplasia. É um tipo de defeito que está associado a uma redução localizada da espessura do esmalte. Pode ocorrer nas seguintes formas: (a) fóssulas - simples ou múltiplas, rasas ou profundas, dispersas ou arranjadas em linhas horizontais que atravessam a superfície do dente; (b) ranhuras - simples ou múltiplas, estreitas ou largas (no máximo 2 mm); ou (c) ausência parcial ou total de esmalte sobre uma área considerável de dentina. O esmalte afetado pode ser translúcido ou opaco.

4 - Outros defeitos;

5 - Opacidades difusas e delimitadas;

6 - Opacidade delimitada e hipoplasia;

7 - Opacidade difusa e hipoplasia;

8 - Todas as três condições;

9 - Sem registro.

Exame clínico. Dez dentes-índices devem ser examinados somente nas superfícies vestibulares e codificados. Se algum dente-índice estiver ausente, a (s) casela (s) correspondente (s) deve (m) ficar em branco.



As superfícies vestibulares, ou seja, da borda incisal ou ponta cuspídica até a gengiva, e da borda mesial até a distal, devem ser inspecionadas visualmente para a detecção de defeitos e, se houver alguma dúvida, no caso de fissuras hipoplásicas, por exemplo, estas devem ser checadas com a sonda periodontal para confirmação de diagnóstico. O dente deve estar úmido ao ser examinado e resíduos grosseiros de placa ou restos alimentares devem ser removidos.

Algumas áreas específicas de interesse na diferenciação entre opacidades de esmalte e outras mudanças podem ser citadas: (a) mancha branca de cárie; e (b) cristas esbranquiçadas em cúspides e margens de molares e pré-molares e, ocasionalmente, de incisivos laterais.

Se houver alguma dúvida com relação à presença de anormalidade, a superfície dentária deve ser codificada como "normal" (código 0). Da mesma forma, uma superfície dentária com uma única anormalidade com menos de 1 mm de diâmetro, deve ser codificada como "0". Alguma anormalidade que não possa ser classificada prontamente em um dos três tipos básicos deve ser codificada como "outros defeitos" (código 4). Um dente deve ser considerado como presente quando qualquer parte já irrompeu à cavidade bucal e alguma anormalidade presente na porção erupcionada possa ser registrada. Se mais de dois terços da superfície dentária estiver restaurada, com cárie extensa ou fraturada, o dente não deve ser examinado (código 9).

### **Índice de Placa Visível (IPV)**

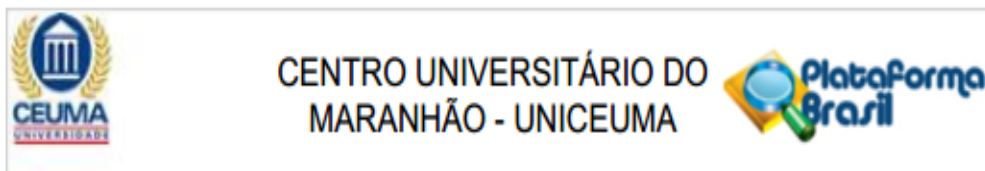
Para analisar placa visível foi utilizado espelho e sonda clínica (Silness & Loe, 1964). Os critérios para avaliação da placa visível foram os seguintes escores: 0=sem biofilme visível na área gengival; 1=biofilme visível recobrimdo a margem gengival livre do dente, detectado com o uso da sonda ou de corante; 2= moderado acúmulo de depósitos moles na margem gengival do dente, que pode ser visível a olho nu; 3= grande presença de biofilme visível sobre a superfície dental, envolvendo a área interdental. O cálculo do índice de placa visível (IPV) foi obtido em porcentagem, somando-se o número de superfícies com placa visível, dividindo-se pelo total de superfícies examinadas multiplicadas por 100.



## **Índice de Sangramento Gengival (ISG)**

Para sangramento gengival (SG) foi utilizado fio dental. O fio dental foi introduzido na superfície interproximal e levado até o fundo do sulco. O fio foi movimentado no sentido inciso-gengival, em ambos os lados da papila, e em todos os dentes. Aguardou-se 30 segundos para verificar a presença ou ausência de SG (Carter & Barnes, 1974). Para a obtenção do índice de SG foi computado o número de espaços interproximais (para cada dente foi contabilizado um espaço interproximal) com SG, dividido pelo número de dentes presentes na cavidade bucal e multiplicados por 100.

## ANEXO 4



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DA SALIVA, PELÍCULA ADQUIRIDA E FLUIDO CREVICULAR DE PACIENTES PORTADORES DE

**Pesquisador:** PATRICIA LUCIANA SERRA NUNES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 60298016.0.0000.5084

**Instituição Proponente:** Centro Universitário do Maranhão - UniCEUMA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.756.478

#### **Apresentação do Projeto:**

O presente estudo tem como finalidade analisar o perfil proteômico da saliva, película adquirida e fluido crevicular de pacientes com

Mucopolissacaridose (MPS). Será realizado um estudo clínico, cuja amostra constará de 20 pacientes, de ambos os sexos com idade entre 06 e 14

anos, divididos em dois grupos: o grupo de estudo será composto de 10 pacientes portadores de MPS regularmente atendidos no Hospital

Universitário Materno Infantil, São Luís/MA e o grupo controle, composto de pacientes saudáveis. A coleta