

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Fernanda de Souza e Silva Ramos

**EFEITOS DE DIFERENTES DENTIFRÍCIOS NA
PERMEABILIDADE E RUGOSIDADE DE DENTINA
ERODIDA**

ARAÇATUBA – SP

2020

Fernanda de Souza e Silva Ramos

**EFEITOS DE DIFERENTES DENTIFRÍCIOS NA
PERMEABILIDADE E RUGOSIDADE DE DENTINA
ERODIDA**

ARAÇATUBA – SP

2020

Fernanda de Souza e Silva Ramos

**EFEITOS DE DIFERENTES DENTIFRÍCIOS NA
PERMEABILIDADE E RUGOSIDADE DE DENTINA
ERODIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Concentração em Dentística.

Orientadora: *Profa. Ass. Dra. Ticiane Cestari Fagundes*

Co-orientador: *Prof. Adj. Paulo Henrique dos Santos*

ARAÇATUBA – SP

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Ramos, Fernanda de Souza e Silva.

R175e Efeitos de diferentes dentífricos na permeabilidade e
 rugosidade de dentina erodida / Fernanda de Souza e Silva
 Ramos. - Araçatuba, 2020
 64 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Ticiane Cestari Fagundes Tozzi

1. Abrasão Dentária 2. Dentífricos 3. Dessensibilizantes
dentinários 4. Erosão dentinária 5. Permeabilidade da
dentina I. T.

Black D2
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dedicatória

Dedicatória

A Deus

Dedico este trabalho a Deus, pois ele tornou isso possível. Ele me deu força nas tormentas em que passei e não me dá fardo maior do que eu consiga carregar. Ele ouviu meus apelos e orações e me guiou durante todo o caminho.

Aos meus pais

Por serem meu exemplo, minha fortaleza, por sempre me apoiarem em todas as tribulações que passamos. Mesmo estando longe, são presentes em minha vida diária, com os valores que me passaram e o amor que dedicam a mim. Alcançar esta conquista foi um feito nosso.

Ao meu irmão

Por ser meu parceiro, melhor amigo. Com quem posso conversar sobre tudo, seu jeito leve de levar a vida, me passava a tranquilidade necessária nos momentos de estresse. Por todas as vezes que, em meio as suas férias, vinha me visitar e me “buscar” para que eu pudesse descansar um pouco.

Agradecimentos

Especiais

Agradecimentos especiais

A minha orientadora

Ticiane Cestari Fagundes

Por aceitar me orientar neste caminho, acreditar em meu potencial, mesmo sem me conhecer inicialmente. Por ser compreensiva com os desafios que se seguiram. Pela paciência e seu olhar para detalhes, pelo incentivo e objetividade. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador

Paulo Henrique dos Santos

Por todo o apoio, pela paciência. Por sempre estar a disposição para auxiliar no que fosse preciso para a melhoria do trabalho. Sempre foi aquele que apontava o que poderia melhorar e nos ajudou a chegar até aqui.

A minha amiga

Lara Maria Bueno Esteves

Por ser um anjo que me apareceu em Araçatuba. Aquela que passou as dificuldades junto a mim, sempre apoiando uma a outra. Muito obrigada pela paciência e força que me proporcionou.

A minha amiga

Ariane Rodrigues Barion

Por me abrir o caminho para vir para Araçatuba. Por me receber em sua casa na época em que tudo era apenas um sonho. Por ter pais maravilhosos que me receberam de braços abertos. Muito obrigada minha cara veterana da UFMS.

A minha amiga

Isabela Caroline de Sousa Ervolino

Por sempre ter a paciência e a disponibilidade de me ouvir e ajudar. Por ser uma vizinha e sempre desabafarmos dos problemas que enfrentamos. Por ter uma família maravilhosa e por ser uma pessoa experiente o suficiente para

aconselhar esta jovem estudante fora de casa. Minha companheira de graduação. Muito Obrigada!

Aos meus colegas e amigos da Pós-graduação

Por sempre compartilhamos todos os momentos de alegria e dificuldades em nosso humilde departamento. Que possamos compartilhar muito desses momentos ainda.

As minhas alunas de iniciação científica

Laryssa de Castro Oliveira e Érica Mayumi Omoto, pela paciência e disposição para desenvolver as pesquisas. Ambas possuem um futuro brilhante como pesquisadoras, pois possuem o comprometimento e a garra necessários para desenvolver e passar pelas dificuldades. Obrigada pela parceria e amizade que desenvolvemos.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, ao diretor Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara e ao vice-diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação em odontologia Prof. André Luiz Fraga Briso, pela disponibilidade e empenho para que o programa de pós-graduação seja de excelência.

Aos professores do curso de pós-graduação por todo o conhecimento que nos proporcionaram.

Ao Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem por abrir as portas do laboratório de Odontopediatria e nos apoiar para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do departamento de Odontologia Infantil e Social, por sempre me receberem de braços abertos e por terem a paciência de me ensinar quando necessário.

Aos professores da disciplina de Dentística, Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso, Prof. Dr. Renato Herman Sundfeld, Prof. Dr. Ricardo Coelho Okida, Prof. Dr. Sílvio José Mauro, Profa. Dra. Ticiane Cestari Fagundes. O acompanhamento das disciplinas na graduação nos proporcionou um experiencia muito importante para o nosso desenvolvimento acadêmico.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora, Carlos Suetake e Jorge Trevelim, pela paciência e disposição em sempre nos auxiliarem quando precisamos. Ao Peterson Moura, ex-secretário, que muito nos auxiliou logo no início da pós-graduação.

A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, faculdade de que sou egressa, mas que me abriu as portas quando precisei, em especial a Profa. Margareth Coutinho, minha orientadora do TCC a quem eu devo o fato de ter escolhido esse caminho na pós-graduação. Muito Obrigada!

O Presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Epígrafe

Epígrafe

A pessoa deve definir suas metas, assim ele pode dedicar toda a sua energia e talento para chegar lá. Com bastante esforço, ele pode conseguir. Ou ele pode achar algo ainda mais gratificante. Mas no final, não importa qual seja o resultado, ele saberá que ele viveu.

Walt Disney

Resumo

RAMOS F.S.S. Efeitos de diferentes dentifrícios na permeabilidade e rugosidade de dentina erodida [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Araçatuba 2020.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a rugosidade, a obliteração dos túbulos dentinários e a permeabilidade da dentina erodida e escovada com diferentes dentifrícios. Noventa dentes bovinos foram seccionadas em blocos, sendo que em trinta a hemiface foi protegida com verniz ácido resistente e sessenta foram submetidos ao teste de permeabilidade. Os espécimes foram divididos de acordo com os dentifrícios: sem flúor (SF), com fluoreto de sódio (NaF) e com fluoreto de estanho (SnF_2). Em seguida, os blocos foram submetidos a um protocolo erosivo-abrasivo por 5 dias. As análises de rugosidade superficial e obliteração dos túbulos dentinários ($n=10$) foram realizadas nas hemifaces controle e teste do mesmo espécime e a análise da permeabilidade ($n=20$) foi realizada novamente. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA a dois critérios medidas repetidas e pós teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os grupos NaF e SnF_2 apresentaram maior rugosidade comparando-se ao SF. O grupo SF apresentou a maior quantidade de túbulos abertos quanto comparado aos demais. Não houve diferença significativa na permeabilidade pós-ciclagem entre os dentifrícios SF e NaF, contudo o dentifrício SnF_2 apresentou maior permeabilidade comparando-se aos demais. Ambos os dentifrícios contendo flúor tiveram oclusão efetiva dos túbulos dentinários; contudo, os efeitos da presença de fluoreto de estanho na permeabilidade podem ser neutralizados pela abrasão deste dentifrício.

Palavras-chave: Abrasão dentária, Dentifrícios, Dessensibilizantes dentários, Erosão dentária, Permeabilidade da dentina

Abstract

RAMOS F.S.S. Effect of different toothpastes on permeability and roughness of eroded dentin [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; Araçatuba 2020.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the roughness, dentin tubule occlusion and permeability of eroded dentin brushed with different toothpastes. Ninety bovine teeth were sectioned in blocks. The hemiface of thirty specimens was protect with acid resistant varnish and sixty were submitted to permeability test. The specimens were divided according to the dentifrices: without fluoride (WF), sodium fluoride (NaF) and stannous fluoride (SnF₂). Then, the blocks were submitted to erosive-abrasive protocol for 5 days. The analysis of surface roughness and dentin tubule occlusion (n=10) were performed on control and test hemifaces of the same sample and permeability analysis (n=20) was again performed. Data were analyzed by two-way RM ANOVA and Tukey tests ($p \leq 0.05$). NaF and SnF₂ groups presented higher roughness when compared with WF. WF group presented larger number of opened tubules compared to the others. No significant differences were found between WF and NaF for permeability; however, SnF₂ presented higher hydraulic conductance compared to other dentifrices. In conclusion, both fluoride-containing toothpastes had promising tubule occlusion; however, the effects on permeability of stannous formulation may be counteracted by the effects of abrasion from this dentifrice.

Key Words: Dentin Permeability, Dentin desensitizing agents, Tooth erosion, Dentifrices, Tooth abrasion

Listas e Sumário

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma representativo do delineamento experimental.....	45
Figura 2: Exemplo do Image J software na contagem dos túbulos abertos. Superfície de dentina nos lados teste e controle	46

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1: Dentifrícios utilizados no estudo e sua composição segundo os fabricantes.....	47
Gráfico 1: Representação da rugosidade superficial (R_a μm) de blocos de dentina de acordo com o grupo de tratamento e a área do espécime (controle e teste).....	48
Gráfico 2: Avaliação da MEV: valores de túbulos dentinários abertos da dentina hígida e erodida.....	48
Gráfico 3: Representação da permeabilidade em $\mu\text{L}.\text{cm}^2/\text{min}.\text{cm H}_2\text{O}$, de blocos de dentina de acordo com o grupo de tratamento	49

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

HD= hipersensibilidade dentinária

LCNC= lesões cervicais não cariosas

ADA= American Dental Association

RDA= Abrasividade relativa da dentina

MEV= Microscopia eletrônica de varredura

NaF= Fluoreto de Sódio

SnF₂= Fluoreto de estanho

SF= Sem Flúor

H₂O= água

°C = grau Celsius

± = mais ou menos

% = percentagem

X = vezes

µm = micrometro

µL= microlitros

ANOVA = Análise da variância

ml= mililitros

mm= milímetros

cm= centímetros

s= segundos

min= minutos

h= horas

psi= libra força por polegada

Q= taxa de filtração

Vs = volume padronizado do túbulo capilar

D = deslocamento da bolha

L = comprimento do capilar

T= tempo em minutos

Lp= condutância hidráulica da dentina

PH= pressão hidrostática

Asup= área de superfície dentinária exposta

$\mu\text{L} \cdot \text{cm}^2 / \text{min} \cdot \text{cm H}_2\text{O}$ = microlitros por centímetros quadrados por minuto por centímetro de água

M= Massa molar

mmol= milimol

pH= potencial hidrogeniônico

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ = nitrato de cálcio tetrahidratado

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = fosfato de sódio monobásico

KCl=cloreto de potássio

F= Flúor

Ra= padrão de rugosidade

ppm= Partes por milhão

Sumário

Introdução	26
Materiais e métodos	29
<i>Delineamento experimental</i>	<i>29</i>
<i>Seleção dos dentes.....</i>	<i>29</i>
<i>Obtenção dos blocos de dentina.....</i>	<i>29</i>
<i>Análise inicial da micropermeabilidade dentinária</i>	<i>30</i>
<i>Processo de erosão-abrasão.....</i>	<i>30</i>
<i>Análise da rugosidade superficial</i>	<i>31</i>
<i>Análise da obliteração dos túbulos dentinários (MEV)</i>	<i>31</i>
<i>Análise final da micropermeabilidade dentinária.....</i>	<i>32</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>32</i>
Resultados	34
Discussão.....	36
Referências	41
Figuras	46
Tabela.....	48
Gráficos.....	49
ANEXO A.....	51
ANEXO B.....	52

Introdução

Introdução

A hipersensibilidade dentinária (HD) define-se como uma dor rápida e aguda que ocorre devido à exposição superficial dos túbulos dentinários como resposta a estímulos térmicos, táteis, químicos e osmóticos¹. De acordo com a teoria hidrodinâmica, os estímulos físicos promovem a movimentação de fluidos no interior dos túbulos dentinários, levando à contração e distensão dos processos odontoblásticos estimulando as fibras nervosas presentes na interface dentina-polpa².

A HD é uma das principais queixas dos pacientes que chegam ao consultório odontológico, bem como afeta sua saúde oral e qualidade de vida^{1,3}. A HD tem origem multifatorial sendo comum nas lesões cervicais não cariosas (LCNC)^{1,4,5}. As LCNCs podem ser a abrasão (desgaste mecânico exógeno), atrição (desgaste mecânico endógeno), erosão (degradação química), e abfração (excesso de carga oclusal)⁴. A prevalência de LCNCs, independente da etiologia, estão em torno de 11,5% e são mais frequentes em molares e pré-molares, tendo sua incidência e grau de severidade aumentados conforme a idade dos pacientes⁶. A profundidade e morfologia das LCNCs contribuem para altos níveis de HD, sendo influenciada pela presença de doença gástrica e consumo de bebidas ácidas⁴.

A erosão é um dos principais fatores da HD, ocorrendo devido à perda de tecido da superfície dentária por meio da ação de ácidos⁷. Estes ácidos podem ser de origem intrínseca ou extrínseca⁸. Os de origem intrínseca afetam a palatina de dentes anteriores e oclusal de dentes posteriores e os de origem extrínseca afetam a vestibular e cervical de dentes anteriores⁸. A ação de ácidos e de proteases levam à dissolução de glicopretíns e outros componentes responsáveis pela oclusão dos túbulos dentinários⁹. A redução do fluxo salivar, seja pelo uso de medicamentos ou por xerostomia dificulta o reestabelecimento do pH bucal e consequentemente contribui para o processo erosivo⁵.

Uma das terapêuticas indicadas para o tratamento da HD é a utilização de dentifrícios com componentes com ação dessensibilizante e anti-erosiva^{10,11}. Contudo, os efeitos benéficos destes dentifrícios ainda são limitados, com a literatura apresentando resultados que variam de nenhuma

ação à quase completa dessensibilização e inibição da erosão, sendo dependente do tipo de dentifrício; havendo assim necessidade de estudos de alta qualidade¹².

Dentro deste contexto, diferentes componentes têm sido acrescentados em dentifrícios com a proposta de aumentar a resistência do substrato dentário aos processos erosivos e/ou obliterar os túbulos dentinários, reduzindo a chegada de estímulos aos odontoblastos e consequentemente, minimizando a HD^{13,14,15,16}. Dentifrícios que contêm íons metálicos polivalentes, tal como o íon estanho, vêm apresentando uma boa efetividade na redução do processo erosivo pela deposição destes sobre o tecido erodido, impedindo o contato com os ácidos^{12,15,17}. Em contrapartida, os dentifrícios também têm acrescidos em sua composição, substâncias abrasivas com função de melhorar o potencial de limpeza dos mesmos, gerando um polimento da superfície dentária^{15,18}; no entanto, podendo influenciar na exposição dos túbulos dentinários após ciclos de erosão-abrasão, aumentando sua permeabilidade e consequentemente a HD¹⁹.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a rugosidade, a obliteração dos túbulos dentinários e a permeabilidade da dentina erodida após a escovação com dentifrícios sem flúor e a base de fluoreto de sódio e fluoreto de estanho. As hipóteses nulas são: (1) diferentes tipos de dentifrícios não possuem um efeito protetor contra ciclos erosivos-abrasivos em relação à rugosidade, obliteração dos túbulos dentinários e permeabilidade dentinária; (2) não haverá diferença entre os substratos dentinários (hígido e erodido) em relação à rugosidade e obliteração dos túbulos dentinários.

Materiais e
Métodos

Materiais e métodos

Delineamento experimental

Neste projeto foi analisado os seguintes fatores: (1) dentina bovina em dois níveis (hígida e erodida) e (2) dentifrícios em três níveis: sem flúor (controle negativo - Curaprox Enzycal Zero Trybol AG, Neuhausen am Rheinfall, Suíça); com NaF (controle positivo – 1450 ppm NaFColgate Total 12, Colgate Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e; SnF₂ (1100 ppm F de SnF₂ Crest Pro-Health, P&G, Cincinnati, Ohio, USA). A composição e características de cada dentifrício podem ser observadas na Tabela 1. As variáveis de resposta foram: rugosidade superficial, obliteração de túbulos dentinários e permeabilidade dentinária. A Figura 1 apresenta o fluxograma do delineamento do experimento.

Seleção dos dentes

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da FOA – UNESP (#00414-2018). Foram selecionados noventa incisivos bovinos recém extraídos, os quais foram limpos com curetas e armazenados em água destilada até o início da pesquisa. Todos os dentes com evidência clínica de cárie, reabsorção radicular, trincas ou fraturas foram excluídos do estudo.

Obtenção dos blocos de dentina

Os dentes tiveram a coroa separada da raiz através da cortadeira de precisão Isomet 1000 (Buheles, IL, USA) com disco diamantado (4" × 012 × ½, Buehler, IL, USA) sob refrigeração com água. Em seguida, trinta raízes foram cortadas transversalmente, obtendo blocos (8x8x1 mm) com espessura de 1mm. Após isso, os espécimes passaram por um polimento com lixas de carbetto de silício na politriz (Aropol E, Arotec, Cotia, SP, Brasil) em ordem decrescente de granulação (#320, #600, #800 e #1200) e o polimento final foi realizado com disco de feltro e pasta diamantada (1 µm, Arotec APL4). As outras sessenta raízes foram cortadas para a obtenção de blocos de dentina (4x4 mm), os quais foram lixados até a obtenção de 1mm de espessura (#320, #600, #800 e #1200).

Análise inicial da permeabilidade dentinária

Os sessenta espécimes (4×4×1mm) foram submetidos ao teste de permeabilidade dentinária inicial para uma padronização dos blocos de dentina. Para a remoção da *smear layer*, os espécimes foram imergidos durante 30s em uma solução de 37% de ácido fosfórico (1ml/bloco), lavados duas vezes por 1min em água deionizada e secos com papel toalha. Para a remoção do conteúdo celular e extracelular do interior dos túbulos dentinários, os blocos foram imergidos por 6h em uma solução de NaOH 10% (3ml/bloco) seguidos de 6h em água deionizada (3ml/bloco)²⁰.

Cada espécime foi acoplado a um sistema de infiltração de fluído (Permeabilidade Dentinária, Odeme, Luzerna, SC, Brasil) com pressão inicial de água deionizada de 1,9 psi, após isso, foi inserida uma bolha de ar no capilar do sistema. Então aumentou-se a pressão para 3psi e aguardou-se a estabilização da bolha de ar por 30s. Estabilizada a bolha, registrou-se o fluxo através do bloco durante 3min pelo registro do deslocamento da bolha por meio de um paquímetro digital com resolução de 0,01mm. O deslocamento em mm permite obter a taxa de filtração (Q), que é o volume de água deionizada que passa pelos túbulos dentinários, dada pela fórmula $Q = (V_s \times D) / (L \times T)$ onde V_s é volume padronizado do tubo capilar em μL , D é o deslocamento da bolha em mm, L é comprimento do capilar em mm e T é o tempo em minutos. Para obter a condutância hidráulica da dentina (L_p) em $\mu\text{L} \cdot \text{cm}^2 / \text{min} \cdot \text{cm H}_2\text{O}$, utiliza-se a taxa de filtração (Q) na seguinte fórmula: $L_p = Q / (PH \times A_{sup})$. Onde PH é a pressão hidrostática e A_{sup} é a área da superfície dentinária exposta^{16,19}. Foram selecionados espécimes com permeabilidade dentinária inicial de 1,5 a 2,5 $\mu\text{L} \cdot \text{cm}^2 / \text{min} \cdot \text{cm H}_2\text{O}$.

Processo de erosão-abrasão

Para o processo erosivo, os trinta blocos (8×8) receberam uma camada de um verniz ácido resistente (Colorama, São Paulo, SP, Brasil), criando uma área de referência (dentina hígida). Os outros sessenta blocos (4×4) foram submetidos totalmente ao processo erosivo. O protocolo de erosão consistiu de imersão em solução de ácido cítrico (Merk Bioquímica, Damstadt, Alemanha) 0.05M (pH 3.2 – 2 mL/espécime), sendo 4 ciclos de 2 min por dia, durante 5 dias²¹, com intervalos de 1 hora entre eles, utilizando-se de uma mesa agitadora

orbital (Tecnal TE – 420, Piracicaba, SP, Brasil)²². Após o primeiro e último ciclo erosivo do dia, os espécimes foram submetidos à escovação com os diferentes dentífrícios. Para isso, a máquina de escovação automática (MSET, Elquip, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizada, com as escovas fixadas paralelamente a superfície do espécime (Condor extra-macia, cerdas arredondadas, São Bento do Sul, SC, Brasil)²³ por 15s com o respectivo dentífrício (1:3 – dentífrício/água destilada – *slurry*), seguido por imersão em *slurry* por 2 min em temperatura ambiente²². Após cada ciclo, os espécimes foram enxaguados com água destilada por 30s e armazenados em uma solução remineralizante (saliva artificial: 1,5 mmol l⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O; 0,9 mmol l⁻¹ NaH₂PO₄.2H₂O; 150 mmol l⁻¹ KCl, 0,1 mol l⁻¹ Tampão Tris; 0,03 ppm F; pH 7,0) à 37°C. Ao final de cada dia experimental os espécimes permaneciam armazenados em saliva artificial à 37°C²⁴. Ao final do protocolo erosivo-abrasivo, os espécimes foram armazenados em 100% de umidade à 37°C até a realização das análises.

Análise da rugosidade superficial

Para essa análise, foram utilizados os blocos de 8x8 mm, sendo que no mesmo espécime se encontravam metade de dentina hígida e metade de dentina erodida, sendo ambos lados analisados após as ciclagens (Rugosímetro Surftest SJ 401 – Mitutoyo, Mitutoyo American Corporation, Aurora, Illinois, USA), no padrão de rugosidade Ra, que representa a média aritmética entre picos e vales. Foi realizado um cut-off de 0,25mm para maximizar a filtragem da ondulação superficial, realizando três leituras equidistantes em cada superfície e obtendo a média aritmética entre elas²⁵.

Análise da obliteração dos túbulos dentinários (MEV)

Três espécimes (8x8) representativos de cada grupo foram selecionados, mantidos sob gases secas por 24h e fixados em stubs metálicos para metalização em ouro (SCD 050, Balzers) e levados à microscopia eletrônica de varredura (EVO HD LS-15, Carl Zeiss do Brasil Ltda, SP, Brasil), operado com 15 KV com o objetivo de demonstrar a possível obliteração dos túbulos dentinários na superfície dos espécimes, sobre um aumento de 2000 X. A contagem dos túbulos obliterados foi realizada partindo do centro da amostra em direção noroeste e sudeste de cada espécime, realizando-se uma análise qualitativa, nas dentinas hígida e erodida. A partir desta análise, foi obtida uma

imagem representativa do espécime, sendo esta utilizada para análise quantitativa referente à contagem dos túbulos dentinários, utilizando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Contou-se todos os túbulos presentes na imagem para obter o total de túbulos da região (Figura 2A), em seguida, cotabilizou-se os túbulos que permaneceram abertos para o cálculo da porcentagem dos túbulos desobliterados^{26,27}.

Análise final da permeabilidade dentinária

Após a realização dos ciclos abrasivo-erosivo, foi realizada a permeabilidade dentinária final da mesma forma como descrito anteriormente.

Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA a dois critérios medidas repetidas e pós teste de Tukey, ($p \leq 0,05$) utilizando o *software* SigmaPlot 12.0 (System Software, San Jose, CA, EUA).

Resultados

Resultados

Os resultados referentes à análise de rugosidade estão presentes no Gráfico 1. O dentifrício SF apresentou a menor rugosidade após os ciclos erosivo-abrasivo, sendo significativamente diferente dos dentifrícios com flúor, os quais foram estatisticamente semelhantes. Avaliando a condição da dentina, todos os dentifrícios testados apresentaram um aumento significativo na rugosidade superficial após os ciclos erosivo-abrasivo.

Os resultados referentes à análise de obliteração dos túbulos dentinários por meio de MEV estão presentes no Gráfico 2 e Figura 2. Quanto à dentina hígida, não houve diferença entre os dentifrícios; contudo, após os ciclos erosivo-abrasivo, o grupo SF apresentou uma quantidade significativamente maior de túbulos dentinários abertos (84%) quando comparado aos grupos NaF (49,2%) e SnF₂ (61,4%), sendo que estes foram estatisticamente semelhantes. Quando a condição da dentina foi avaliada, todos os grupos tiveram um aumento significativo na quantidade de túbulos abertos na comparando a dentina hígida com a erodida após os ciclos erosivo-abrasivo. Na Figura 2 A é possível observar uma alteração na superfície dos espécimes causada devido à ação do ácido cítrico. Observando os diferentes grupos, na Figura 2 B e C é possível observar que o grupo SF apresenta o maior número de túbulos dentinários abertos. Na Figura 2 D à G o grupo NaF e SnF₂ apresentam um menor número de túbulos dentinários abertos e também, no grupo SnF₂, pode-se observar alguns grânulos depositados na superfície (Figura 2 G).

Os resultados referentes à permeabilidade dentinária estão presentes no Gráfico 3. Quando os diferentes tipos de dentifrícios foram avaliados, não houve diferença estatística entre os dentifrícios SF e NaF (redução de 45% e 40% respectivamente); contudo, o dentifrício SnF₂ apresentou diferença quando comparado aos demais, apresentando redução de 14% na permeabilidade dentinária após os ciclos erosivo-abrasivo. Avaliando a condição da dentina, foi encontrada diferença entre a máxima permeabilidade dentinária e após os ciclos erosivo-abrasivo para todos os dentifrícios.

Discussão

Discussão

Um dos principais fatores etiológicos da HD é a erosão⁷, por essa razão, diversos tipos de dentifrícios com componentes dessensibilizantes e anti-erosivos vêm sendo estudados quanto à sua ação na superfície dentinária^{10-12,15,28-31}. O dentifrício SF foi selecionado como um controle negativo devido ao fato de não ter fluoretos em sua composição. O dentifrício com NaF foi selecionado como um controle positivo, pois estudos apontam a sua capacidade protetiva sobre a superfície dentária erodida^{15,28,29,32}. O dentifrício que contém SnF₂ foi selecionado pois estudos apontam que seus componentes podem gerar uma obliteração superficial dos túbulos dentinários e reduzir a chegada de estímulos capazes de gerar HD^{12,29,31,33,34}. Por essa razão, torna-se importante avaliar a obliteração destes túbulos, bem como a chegada de estímulos através da permeabilidade dentinária^{16,19,27}. Foi também realizada a análise da rugosidade superficial para avaliar a influência da abrasividade dos dentifrícios testados na superfície do substrato dentinário erodido e abrasionado.

Os dentifrícios possuem em sua composição partículas abrasivas, que incluem principalmente os derivados de sílica, como agentes de polimento^{18,23,35}. Esses materiais são incorporados com a função de promover a remoção de bactérias, biofilme e reduzir o acúmulo de outros detritos na superfície dentária, gerando um polimento da mesma³⁵. A abrasividade de um dentifrício está relacionada com a concentração de sílica e partículas abrasivas em sua composição^{18,36}. O dentifrício SF apresentou uma rugosidade significativamente menor que os demais, provavelmente por possuir menor valor de RDA se comparado aos demais dentifrícios, negando-se a primeira hipótese³⁷. A quantidade de sílica, bem como a influência química de outros componentes presentes no dentifrício a base de NaF, podem explicar o fato deste apresentar uma rugosidade semelhante ao dentifrício SnF₂ na dentina erodida^{15,35,38}. Aguiar et al. (2017)³⁷ simulando a abrasão sobre o tecido dentinário equivalente há dois anos de escovação, encontrou que o dentifrício com RDA similar ao SnF₂ apresentou rugosidade semelhante ao dentifrício NaF, corroborando com os resultados do presente estudo.

Considerando este fato, a segunda hipótese nula também foi rejeitada, pois a rugosidade superficial aumentou na dentina erodida em relação

à dentina hígida para todos os dentifrícios testados. É importante ressaltar que uma superfície com valores de rugosidade acima de 0,2 a 0,3 μm , como o encontrado após a ciclagem, resulta em um aumento da adesão bacteriana na superfície dentinária³⁹. Em outros estudos, a abrasão do dentifrício sobre a superfície dentária aumentou a rugosidade na região abrasionada em torno de 8 vezes o valor inicial^{37,40}, corroborando com este trabalho, onde houve um aumento da rugosidade em torno de 8 a 10 vezes, pois além da abrasão o espécime também sofreu ação erosiva do ácido cítrico.

Dentifrícios com ação dessensibilizante ou anti-erosiva possuem em sua composição partículas capazes de gerar uma obliteração dos túbulos dentinários, que pode ocorrer de duas formas: pela obstrução de sua embocadura ou pela deposição de material no interior destes túbulos²⁸. A análise por MEV demonstrou uma alta porcentagem de túbulos abertos após o desafio erosivo-abrasivo, principalmente no dentifrício SF, que apresentou uma quantidade significativamente maior quando comparado aos demais dentifrícios. Isso ocorre principalmente devido à ausência de agentes funcionais capazes de induzir a obliteração dos túbulos dentinários ou a mineralização intratubular²⁸. O fluoreto de estanho apresenta resultados controversos na literatura, sendo que em estudos clínico e de análise por desgaste, resultados superiores aos dentifrícios com NaF foram encontrados^{33,34}; e em outros estudos clínico e por análise de MEV, o SnF_2 demonstrou resultados semelhantes aos dentifrícios convencionais^{28,32}, tal como encontrado no presente estudo. Existem relatos da presença de partículas de SnF_2 na superfície do substrato, obliterando somente a embocadura dos túbulos dentinários^{28,29}, com ausência dessas partículas no interior dos túbulos quando analisados em cortes transversais²⁸.

Dentro deste contexto, houve também um significativo aumento no número de túbulos abertos entre a dentina hígida e a dentina erodida para todos os grupos. Isso ocorre devido à exposição ao ácido cítrico, cujo consumo frequente leva à perda de estrutura dental e remoção da *smear layer* superficial, a qual é parcialmente reposta com a escovação¹⁹. Favretto et al. (2018)²⁰, utilizando um dentifrício experimental com sódio trimetafosfato associado ao flúor encontraram, em análise por MEV, uma maior quantidade de túbulos abertos, bem como uma maior área interna destes túbulos no grupo submetido

aos desafios erosivos, principalmente no grupo placebo, algo que também ocorreu neste estudo com o grupo SF.

Apesar de o SnF₂ obter uma obliteração dentinária semelhante ao NaF, foi observado que o mesmo teve uma permeabilidade da dentina erodida significativamente maior que os demais dentifrícios após as ciclagens. Isso ocorre provavelmente devido ao desgaste tecidual gerado pela abrasividade do dentifrício, que leva a uma perda de espessura do substrato, podendo interferir no seu efeito dessensibilizante²⁸. Arnold et al. (2015)²⁸ demonstrou que se pode perder em torno de 61,98 µm de dentina após um ciclo erosivo, quando utilizado um dentifrício com alta abrasividade a base de estanho, o que leva a análise de uma dentina sub-superficial. Em outro estudo realizado, um dentifrício com SnF₂ não foi capaz de reduzir a permeabilidade da dentina, sendo que o dentifrício NaF apresentou redução na permeabilidade dentinária, assim como apenas dois dentifrícios com ação dessensibilizante (com silicato de cálcio e fosfato de sódio, e outro com nitrato de potássio)³⁰. Além disso, a obliteração dentinária pode ser dissolvida por ácidos²⁸, bem como a alta concentração de componentes abrasivos nos dentifrícios com SnF₂ pode favorecer a ligação do íon estanho com a sílica, reduzindo a ação anti-erosiva do mesmo¹⁸. Um estudo de metanálise demonstrou que o dentifrício a base de SnF₂ foi superior aos demais compostos avaliados em um prazo de até 2 semanas, contudo, em avaliações de 4 e 8 semanas, perdeu eficácia, sendo classificado com um efeito de dessensibilização rápida¹⁰. Em outra revisão sistemática, os autores encontraram a ação na HD dos dentifrícios com SnF₂ após 8 a 15 dias de escovação³¹. O uso de saliva artificial, bem como a ausência de biofilme dentário e película salivar pode reduzir a retenção de flúor nas superfícies em protocolos erosivos *in vitro*⁴¹, supostamente sendo um protocolo de 5 dias de ciclagem mais agressivo que seria o mesmo período *in vivo*.

A literatura é conclusiva com relação a ação benéfica do flúor no tratamento de lesões cariosas, no entanto há especulações de que para o processo erosivo o seu efeito não é tão expressivo¹⁴. No presente estudo, o dentifrício com NaF possui 350 ppm de F a mais que a base de SnF₂, apesar da pequena ação do flúor no processo erosivo, supostamente essa diferença pode ter influenciado na menor redução da permeabilidade do SnF₂ em relação ao

NaF. No entanto, em outro estudo que também testou dentifrícios com NaF e SnF₂, ambos apresentaram diminuição da permeabilidade da dentina²⁹.

O dentifrício SF apresentou uma maior quantidade de túbulos abertos, contudo houve uma redução da permeabilidade na dentina erodida, isso pode ocorrer devido à deposição de fosfato de cálcio proveniente da saliva e *smear layer* na superfície da dentina^{42,43}. Uma metanálise que avaliou 30 ensaios clínicos randomizados concluiu que os dentifrícios convencionais com íon flúor não apresentaram diferença significativa em relação ao placebo na análise do efeito de dessensibilização dos dentifrícios¹⁰. Este fato também justifica a redução significativa na permeabilidade após o desafio erosivo-abrasivo para todos os grupos comparando-se a dentina hígida e erodida. Dentro deste contexto, a redução da permeabilidade da dentina após tratamento com diferentes dentifrícios anti-erosivos apresenta grande variação em torno de 5-50%^{30,42,43}. Neste estudo, essa redução ficou em torno de 14 a 45%.

Vale salientar que no presente estudo não foi identificada a composição das partículas presentes na embocadura dos túbulos dentinários, considerando-se como uma limitação. Futuros estudos que avaliem a eficácia de diferentes dentifrícios *in situ* e *in vivo* devem ser realizados para verificar-se a influência da saliva humana na dentina erodida, a fim de prolongar os efeitos dos dentifrícios na oclusão dos túbulos dentinários para o tratamento da HD.

Assim sendo, pode-se concluir que ambos os dentifrícios com flúor obtiveram a mesma capacidade de obliteração dos túbulos dentinários; contudo, os efeitos benéficos do estanho na formulação podem ser reduzidos pelos efeitos da abrasão deste dentifrício.

Referências

Referências

1. Goh, V., Corbet, E.F., Leung, W.k. Impact of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life in individuals receiving supportive periodontal care. *J Clin Periodontol.* **43**,595-602 (2016).
2. Chung, G., Jung, S.J., Oh, S.B. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res.* **92**, 948-55 (2013).
3. Bekes, K. & Hirsch, C. What is known about the influence of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life? *Clin Oral Investig.* **17**, 45– 51 (2013).
4. Teixeira, D.N.R, Zeola, L.F., Machado, A.C., Gomes, R.R, Souza, P.G, et al. Relationship between non carious cervical lesions, cervical dentin hypersensitivity, gingival recession, and associated risk factors: a cross-sectional study. *J Dent.* **76**, 93-97 (2018).
5. Davari, A., Ateri, E., Assarzadeh, H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment, a literature review. *J Dent.* **14**, 136-145 (2013).
6. Zeola, F. L., Soares, P.V., Cunha-Cruz, J. Prevalence of dentin hypersensitivity: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* **81**, 1-6 (2018).
7. Ganss, C. Is erosive tooth wear and oral disease? *Monogr Oral Sci. A*, **25**, 16-21 (2014).
8. Ganss, C., Lussi, A., Schlueter, N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci. B* **25**, 99-107 (2014).
9. Kanzow, P., Wegehaupt, F.J., Attin, T., Wiegand, A. Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence Int.* **47**940, 275-8 (2016).
10. Hu, M.L., Zheng, G., Lin, H., Yang, M., Zhang, Y.D, et al. Network meta-analysis on the effect of desensitizing toothpastes on dentin hypersensitivity. *J Dent.* 88,103170; 10.1016/j.jdent.2019.07.008 (2019)
11. Moraschini, V., da Costa, L.S., dos Santos, G.O. Effectiveness for dentin hypersensitivity treatment of non-carious cervical lesions: a meta-analysis. *Clin Oral Invest.* **22**, 617-631 (2018).

12. Hu, M.L., Zheng, G., Zhang, Y. D., Yan, X., Li, X.C., et al. Effect of desensitizing toothpastes on dentine hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis. *J Dent.* **75**, 12-21 (2018).
13. Hara, A.T., Gonzales-Cabezas, C., Creeth, J., Parmar, M., Eckert, G.J., et al. Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion-abrasion. *J Dent.* **37**, 781–785 (2009).
14. Lussi, A., Carvalho, T.S. The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res.* **49**, 18-29 (2015).
15. Aykut-Yetkiner, A., Attin, T., Wiegand, A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. *J Dent.* **42**, 856-61 (2014).
16. Pinto, S.C., Bandéca, M.C., Pinheiro, M.C., Cavassim, R., Tonetto, M.R., et al. Preventive effect of a high fluoride toothpaste and arginine-carbonate toothpaste on dentinal tubules exposure followed by acid challenge: a dentine permeability evaluation. *BMC Res Notes.* **24**, 385-92 (2014).
17. Ganss, C., Schlueter, N., Hardt, M., Schattenberg, P., Klimek, J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.*; **42**, 2–7 (2008).
18. Ganss, C., Möllers, M., Schlueter, N. Do abrasives play a role in toothpaste efficacy against erosion/abrasion? *Caries Res* **51**, 52-57 (2017).
19. Pinto, S.C., Batitucci, R.G., Pinheiro, M.C., Zandim, D.L., Spin-Neto, R., et al. Effect of an acid diet allied to sonic toothbrushing on root dentin permeability: an in vitro study. *Braz Dental J.* **21**, 390-5 (2010).
20. Favretto, C.O., Delbem, A.C.B., Moraes, J.C.S., Camargo, E.R., de Toledo, P.T.A., et al. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig.* **22**, 3021-29. (2018)
21. Cruz, N.V., Pessan, J.P., Manarelli, M.M., Souza, M.D., Delbem, A.C. In vitro effect of low-fluoride toothpastes containing sodium trimetaphosphate on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* **60**, 1231-36 (2015).
22. Pini, N.I.P., Lima, D.A., Lovadino, J.R., Ganss, C., Schlueter, N. In vitro efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel. *Carie Res.* **50**, 337-45 (2016).

23. Wiegand, A., Kuhn, M., Sener, B., Roos, M., Attin, T. Abrasion of eroded dentin caused by toothpaste slurries of different abrasivity and toothbrushes of different filament diameter. *J Dent.* **37**, 480-4 (2009).
24. Rodrigues, E., Delbem, A.C., Pedrini, D., Cavassan, L. Enamel remineralization by fluoride-releasing materials: proposal of a pH-cycling model. *Braz Dent J.* **21**, 446-51 (2010).
25. Neres, É.Y., Moda, M.D., Chiba, E.K., Briso, A.L.F., Pessan, J.P., et al. Microhardness and roughness of infiltrated white spot lesions submitted to different challenges. *Oper Dent.* **42**, 428-435 (2017)
26. Cunha, S.R., Garófalo, S.A., Scaramuccu, T., Zezell, D.M., Aranha, A.C.C. The association between Nd:YAG laser and desensitizing dentifrices for the treatment of dentin hypersensitivity. *Lasers Med Sci.* **32**, 873-880 (2017).
27. Garofalo, S.A., Sakae, L.O., Machado, A.C., Cunha, S.R., Zezell, D.M., et al. In vitro effect of innovative desensitizing agents on dentin tubule occlusion and erosive wear. *Oper Dent.* **44**, 168-177 (2019).
28. Arnold, W.H., Prange, M., Naumova, E.A. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *J Dent.* **43**, 440-9 (2015).
29. Lucchese, A., Bertacci, A., Zanna, S., Chersoni, S., Manuelli, M., et al. In vitro effects of fluoride-based and desensitizing toothpastes on dentin permeability. *J Biol Regul Homeost Agents.* **32**, 51-58 (2018).
30. João-Souza, S.H., Scaramucci, T., Bühler-Borges, A., Lussi, A., Saads-Carvalho, T., et al. Influence of desensitizing and anti-erosive toothpastes on dentine permeability: an *in vitro* study. *J Dent.* **24**, 30158-7(2019).
31. Marto, C. M., Baptista Paula, A., Nunes, T., Pimenta, M. Abrantes, A.M., et al. Evaluation of the efficacy of dentin hypersensitivity treatments- A systematic review and follow-up analysis. *J Oral Rehabil.* **46**, 952-990 (2019).
32. Sharma, N., Roy, S., Kakar, A., Greenspan, D.C., Scott, R. A clinical study comparing oral formulations containing 7.5% calcium sodium phosphosilicate (NovaMin), 5% potassium nitrate, and 0.4% stannous fluoride for the management of dentin hypersensitivity. *J Clin Dent.* **21**, 88–92 (2010).

33. Assunção, C.M., Schlueter, N., Rodrigues, J.A., Carvalho, T.S., Lussi, A. Do fluoride toothpastes have similar preventive effect in permanent and primary teeth against erosive tooth wear? *Int J Paediatr Dent* **29**,228-236 (2018)
34. He, T., Barker, M.L., Biesbrock, A.R., Miner, M., Qaqish, J., et al. A clinical study to assess the effect of a stabilized stannous fluoride dentifrice on hypersensitivity relative to a marketed sodium fluoride/triclosan control. *J Clin Dent*. **25**, 13–8 (2014).
35. Johannsen, G., Tellefsen, G., Johannsen, A., Liljeborg, A. The importance of measuring toothpaste abrasivity in both a quantitative and qualitative way. *Acta Odontol Scand*.**71**, 508-17 (2013).
36. Lippert, F., Arrageg, M.A., Eckert, G.J., Hara, A.T. Interaction between toothpaste abrasivity and toothbrush filament stiffness on the development of erosive/abrasive lesions in vitro. *Int Dent J*. **67**,344-350 (2017).
37. Aguiar, J.D., Medeiros, I.S., Souza-Junior, M.H.S.E., Loreto, S.C. Influence of extended use of desensitizing toothpaste on dentin bonding microhardness and roughness. *Braz Dent J*.**28**, 346-53 (2017).
38. Liljeborg, A., Tellefsen, G., Johannsen, G. The use of a profilometer for both quantitative and qualitative measurements of toothpaste abrasivity. *Int J Dent Hygiene*.**8**, 237-43 (2010).
39. Bollen, C.M., Lambrechts, P., Quirynen, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. **13**,258–269 (1997)
40. Cury, M.S., Silva, C.B., Nogueira, R.D., Campos, M.G.D., Palma-Dibb, R.G., et al. Surface Roughness and bacterial adhesion on root dentin treated with diode laser and conventional desensitizing agents. *Lasers Med Sci*. **33**, 257-62. (2018).
41. Alghilan, M.A., Cook, N.B., Platt, J.A., Eckert, G.J., Hara, A.T. Susceptibility of restorations and adjacent enamel/dentine to erosion under different salivary flow conditions. *J Dent* **43**,1476-1482. (2015)
42. Wang, Y., Sa, S., Sauro, H., Chen, W., Xing, X., et al. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine

- permeability measurement and SEM in vitro study. *J. Dent.* **38**, 400-10 (2010)
43. Suge, T., Kawasaki, A., Ishikawa, K., Matsuo, T., Ebisu, S. Ammonium hexafluorosilicate elicits calcium phosphate precipitation and shows continuous dentin tubule occlusion. *Dent Mater.* **24**; 192-98 (2008).

Figuras

Figura 1: Fluxograma represnetativo do delineamento experimental

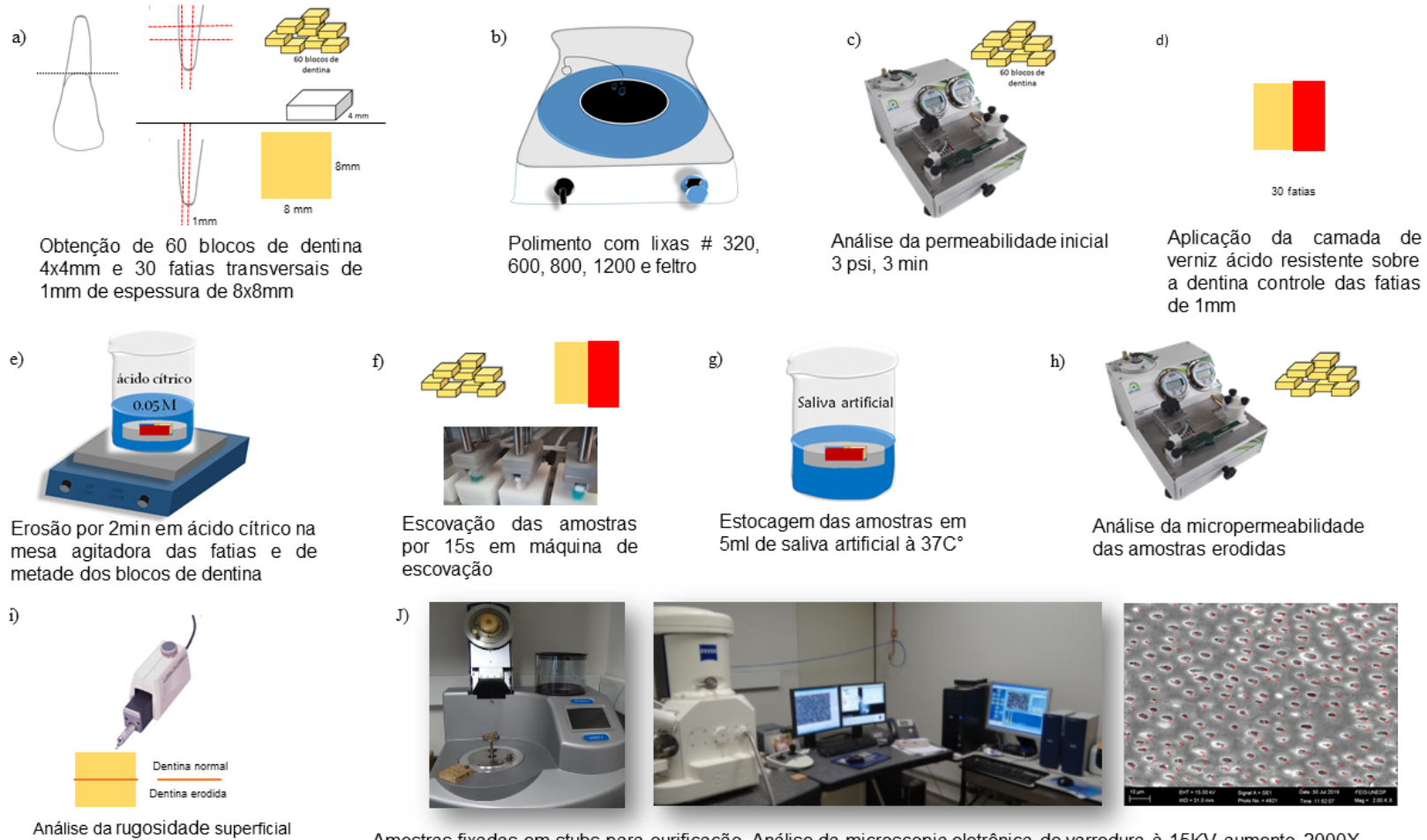
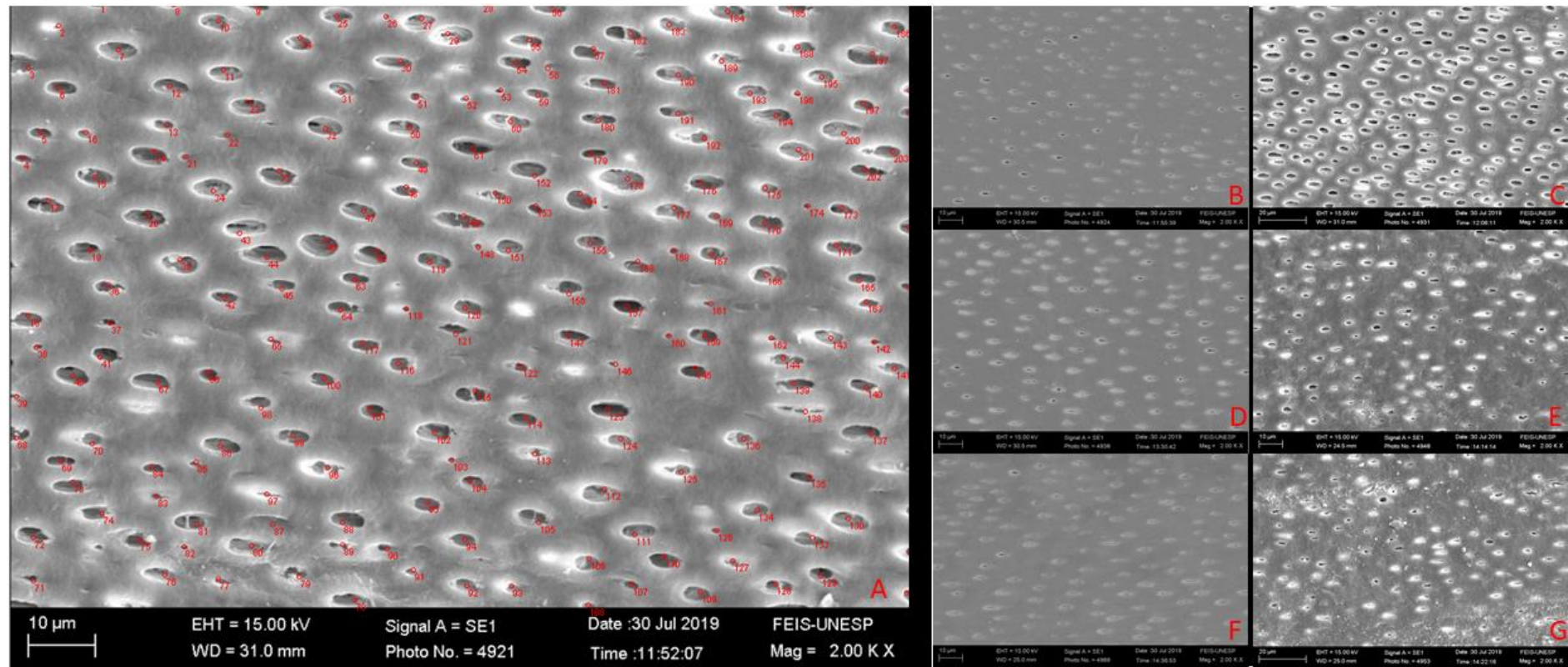


Figura 2: Exemplo do Image J software na contagem dos túbulos abertos. Superfície de dentina nos lados teste e controle



A: Contagem dos túbulos B: Grupo SF dentina controle; C: Grupo SF dentina teste; D: Grupo NaF dentina controle; E: Grupo NaF dentina teste; F: Grupo SnF₂ dentina controle; G: Grupo SnF₂ dentina teste.

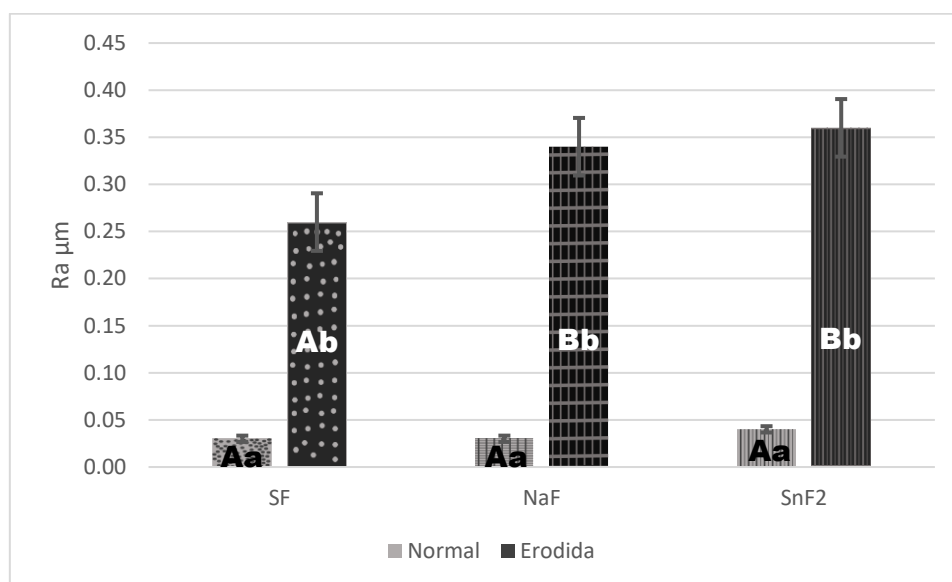
Tabela

Tabela 1: Dentifrícios utilizados no estudo e sua composição segundo os fabricantes.

Material	Tipo	Código	Composição	Fabricante
Curaprox Enzycal Zero (RDA-60)* Lote:442MHDEXP 1121	Dentifrício sem flúor	SF	Água, Sorbitol, Sílica hidratada, Glicerina, Steareth-20, Dióxido de titânio (CI 77891), Aroma, Fosfato de sódio, Carragenina, Cloreto de sódio, Ácido cítrico, Benzoato de sódio, Tiocianato de potássio, Glicose oxidase, Amiloglucosidase, Lactoperoxidase.	Trybol AG, Neuhausen AM Rheinfal, Suíça.
Colgate Total 12 (RDA-70/80)* Lote:6184BR121R	Dentifrício com Fluoreto de Sódio	NaF	Fluoreto de sódio 1450 ppm F (fonte NaF), Água, Triclosan, Sorbitol, Sílica, Lauril-Sulfato de sódio, Copolímero PMV/MA, Hidróxido de sódio, Sacarina sódica, <i>Dióxido de titânio</i>	Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.
Crest Pro-Health (RDA-155)* Lote:6039GF	Dentifrício com Fluoreto de estanho	SnF ₂	Fluoreto estanhoso 1100 ppm F (fonte SnF ₂), Glicerina, Sílica hidratada, Hexametafosfato de sódio, Propileno Glicol, PEG 6, Água, Lactato de Zinco, Fosfato trisódico, Aromatizante, Lauril-sulfato de sódio, Gluconato de sódio, Carragenina, Sacarina de sódio, Goma Xantana, Azul 1	P&G, Cincinnati, Ohio, USA.
*RDA valores de acordo com os fabricantes				

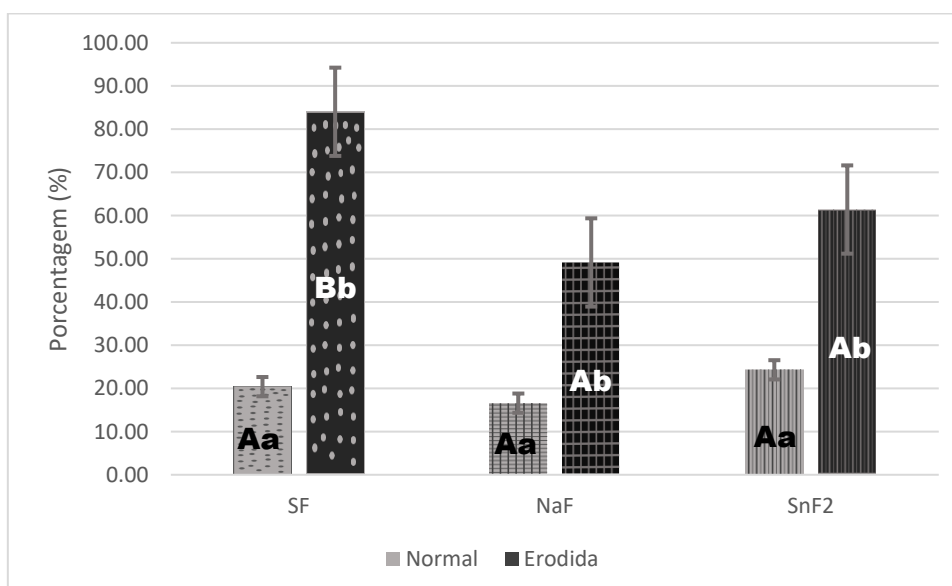
Gráficos

Gráfico 1: Representação da rugosidade superficial ($R_a \mu m$) de blocos de dentina de acordo com o grupo de tratamento e a área do espécime (controle e teste)



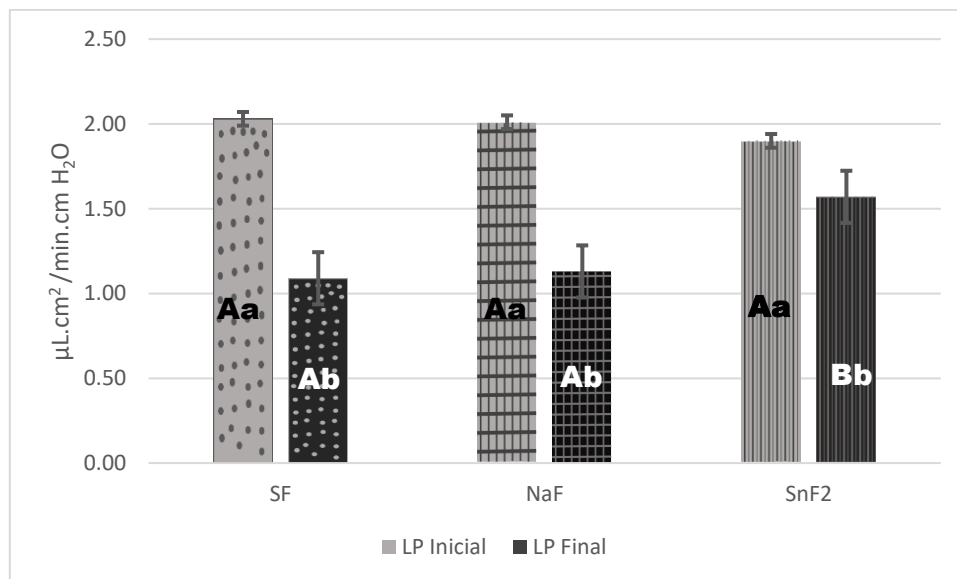
Letras distintas, maiúsculas entre os grupos e minúsculas intragrupos, indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 2: Avaliação da MEV: valores de túbulos dentinários abertos, em porcentagem da dentina hígida e erodida



Letras distintas, maiúsculas entre os grupos e minúsculas intragrupos, indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 3: Representação da permeabilidade em $\mu\text{L.cm}^2/\text{min.cm H}_2\text{O}$, de blocos de dentina de acordo com cada dentifrício.



Letras distintas, maiúsculas entre grupos e minúsculas intragrupos, indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Lp= condutância hidráulica da dentina

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos de diferentes dentifrícios na permeabilidade e rugosidade de dentina erodida"**, Processo FOA nº 00414-2018, sob responsabilidade de Ticiane Cestari Fagundes apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 08 de Junho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2020.

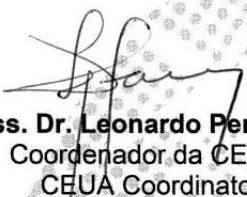
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of different toothpastes on permeability and roughness of eroded dentin"**, Protocol FOA nº 00414-2018, under the supervision of Ticiane Cestari Fagundes presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 08, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP

ANEXO B

Normas de submissão para a revista Scientific Reports

Submission guidelines

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 (i.e. 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.

The following file types can be uploaded for Article text:

txt, doc, docx, tex, (pdf [first submissions only])*

*We are unable to accept PDF files for article text for revised manuscripts.

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. 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 (i.e. not revised manuscripts), authors may choose to incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size in either a Microsoft Word, LaTeX, or PDF format - the figures may be inserted within the text at the appropriate positions, or grouped at the end.

For revised manuscripts authors should provide all textual content in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX. We do not accept PDF files for article text for revised manuscripts. Figures should be provided as individual files.

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 `wlscirep.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 'LaTeX supplementary 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. Any manuscript reporting an experiment/s on live vertebrates (or higher invertebrates), humans or human samples must include a statement of ethical approval in the Methods section (see [our detailed requirements](#) for further information on preparing these statements).

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 numerical within square brackets and 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 'LaTeX supplementary 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, D. H., Collins, R. N. & 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, D. L. *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, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. 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 papers submitted to *Scientific Reports*. If there is no conflict of interest, a statement declaring this must still be included in the paper.

The statement included in the article file must be explicit and unambiguous, describing any potential competing interest (or lack thereof) for EACH contributing author.

Examples of declarations are:

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Competing interests

Dr X's work has been funded by A. He has received compensation as a member of the scientific advisory board of B and owns stock in the company. He also has consulted for C and received compensation. Dr Y and Dr Z declare no potential conflict of interest.

Data availability

Scientific Reports requires a Data Availability Statement to be included in all submitted manuscripts (at the end of the main text, before the References section); 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.

Multiple pieces of Supplementary Information can be combined and supplied as a single file, or supplied separately (e.g. supplementary videos, spreadsheets [.csv or .xlsx] or data files).

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.

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.

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..."

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.

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.

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. 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 (s.e.m.) or a standard deviation (s.d.).

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.

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; see also www.genenames.org. Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory, e-mail: nomen@informatics.jax.org; see also 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 ^1H NMR and proton-decoupled ^{13}C NMR should be provided for all new compounds. Other NMR data should be reported (^{31}P NMR, ^{19}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 ^1H NMR or ^{13}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.^{ref} 99-101 °C); TLC (CHCl₃:MeOH, 98:2 v/v): R_f = 0.23; [α]_D = -21.5 (0.1 M in n-hexane); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 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); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 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⁻¹; UV/Vis: λ_{max} 267 nm; HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₂₀H₁₅Cl₂NO₅, 420.0406; found, 420.0412; analysis (calcd., found for C₂₀H₁₅Cl₂NO₅): C (57.16, 57.22), H (3.60, 3.61), Cl (16.87, 16.88), N (3.33, 3.33), 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 (≥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.