



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PPGO

EMILLY GODINHO CORRÊA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS IRF6 E
TGFA E FATORES DE RISCO DA HIPOMINERALIZAÇÃO
MOLAR-INCISIVO**

Curitiba

2021

EMILLY GODINHO CORRÊA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS IRF6 E
TGFA E FATORES DE RISCO DA HIPOMINERALIZAÇÃO
MOLAR-INCISIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, com área de concentração em Saúde Coletiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Iani Werneck
Coorientadores: Prof. Dr. Cleber Machado de Souza
Prof. Dr. Samuel Jorge Moysés
Prof^a. Dra^a. Juliana Schaia Rocha Orsi

Curitiba

2021

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

C824e
2021

Corrêa, Emilly Godinho

Estudo de associação dos genes candidatos IRF6 e TGFA e fatores de risco da hipomineralização molar-incisivo / Emilly Godinho Corrêa ; orientadora: Renata Iani Werneck ; coorientadores: Cleber Machado de Souza, Samuel Jorge Moyses, Juliana Schaia Rocha Orsi. – 2021.
65 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021
Inclui bibliografia

1. Odontologia. 2. Dente molar. 3. Desmineralização do dente. 4. Estudos de associação genética. 5. Esmalte dentário. 6. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Werneck, Renata Iani. II. Souza, Cleber Machado de. III. Moyses, Samuel Jorge. IV. Orsi, Juliana Schaia Rocha. V. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Odontologia. VI. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

EMILLY GODINHO CORRÊA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES CANDIDATOS *IRF6* E *TGFA* E
FATORES DE RISCO DA HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Saúde Coletiva**.

Orientador(a):

Profª Drª Renata Iani Werneck
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Samuel Jorge Moysés
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira
Universidade de Pittsburgh, PITT

Curitiba, 14 de maio de 2021.

Dedicatória

Aos meus pais, minhas maiores inspirações.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela possível realização do mestrado com bolsa integral.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná por me oportunizar a inserção em um ambiente de aprendizagem acolhedor e com profissionais excepcionais.

Aos meus pais, que nunca deixaram de me apoiar em minhas escolhas e me encorajam a cada nova etapa. Ao Francisco, meu pai, principalmente por sempre deixar explícito que a dedicação nos traz realizações, que a justiça não é bela, mas nós podemos contribuir para que seja. À minha mãe, Mailza, que me doou seus olhares de empatia, pelos quais eu vejo uma humanidade sensível, principalmente ao observar as almas ricas das pessoas em situação de vulnerabilidade.

Ao meu irmão, Lucas, com nome escolhido por mim por puro desvelo, a partir de sua existência a minha vida fez sentido. Sublime e cheio de luz, mergulho em orgulho todos os dias.

Ao Douglas, meu amigo e namorado que permanece ao meu lado em momentos especialmente importantes. Agradeço por toda paciência, todo entusiasmo, e toda inspiração que me traz. A admiração que tenho aumenta a cada detalhe.

Aos meus sogros, Mary e Carlos que me acolheram e me acolhem tão bem e torcem por minhas vitórias. À minha cunhada, Ana Carolina, que se desafia a fim de realizar seus sonhos e é merecedora de todas as conquistas, e ao seu marido Renan, cientistas que a academia precisa.

Aos meus colegas, e principalmente aos meus amigos íntimos que ensinam vínculos para encarar momentos difíceis, e comemorar todas as conquistas.

À minha orientadora e amiga, professora Renata, que me proporcionou momentos de reflexão essenciais durante a minha jornada acadêmica, e que me desperta o desejo de dedicação contínua para alcançar meus sonhos. Ao Pedro, que me disponibilizou horários de reunião remota com sua mãe, e às vezes, tímido, aparecia na câmera.

Aos professores e amigos Samuel e Simone, que são referência para o meu crescimento no âmbito acadêmico e pessoal, em que muitas vezes me fizeram perceber quebras de paradigmas, e me oportunizaram grandes experiências durante a graduação e o mestrado. Diante dos diferentes projetos e aulas, importantes aspectos serão levados para a academia e para a vida.

Ao professor Samuel, por toda a mão estendida todas as vezes que o procurava com alguma dúvida ou ideia. Por todo conforto que seus textos, *lives*, e poesias trazem, especialmente diante do atual momento de pandemia.

À professora Simone, que me permitiu compartilhar o amor por um projeto chamado COOSMIC. Além disso, destaco o amor que sinto pela pessoa que é.

À professora e amiga Juliana, que possibilitou em aulas e conversas, a admiração pela didática e inspiração para docência. Por toda palavra de incentivo, e toda oportunidade que me ofereceu.

Ao professor Cleber, por sua disponibilidade de orientação para a condução dos experimentos em laboratório, por toda a ajuda e conhecimento transmitido. À Irenice Cairo pelo acolhimento no laboratório e por me apoiar na trajetória desta pesquisa. Ao professor Sérgio Ignácio por me explicar sobre a temerosa estatística.

Aos professores, Paulo e Luciana, que me proporcionaram uma linda experiência na CAOSC. Aprendi que a empatia quando incompreendida pode inabilitar, e que os desafios na clínica trouxeram olhares com diferentes perspectivas diante das situações.

Ao professor Alexandre, por me oportunizar momentos de discussão no *Lab Meeting*, por me proporcionar experiências acadêmicas que me fizeram refletir sobre a atuação do pesquisador em diferentes âmbitos da academia, e competências exigidas a um revisor.

Às queridas Tayla e Laís, que sempre solícitas me guiaram com seus olhares calmos em diferentes etapas desse percurso.

À todos os integrantes do projeto COOSMIC, todas as mães e seus filhos que participam desse acompanhamento multiprofissional. À Isabela, Jéssica e Saulo que foram essenciais no meu caminho. Ao Prof Samuel, Profa Simone, Profa Juliana e Profa Renata, mais uma vez.

À Isabela, obrigada pela amizade que criamos, por toda troca de conhecimento e por dividir comigo momentos de grandes aprendizados.

À Brenda, Gabriela, Isteicy, Jullyana e Nayara, que foram fundamentais nessa trajetória, obrigada por todo acolhimento, tenho muito orgulho de todas e do caminho que estão trilhando!

À toda equipe da Saúde Coletiva, por todo conhecimento propagado, pelo compartilhamento de aflições e alegrias, por todas as sugestões e apontamentos realizados para um crescimento em conjunto, com olhares interdisciplinares. À todos os professores das diferentes áreas.

À coordenação do PPGO da PUCPR, por toda competência durante o período que estive no programa. À Neide, sempre solícita, e aos funcionários.

À todos, que de algum modo, me proporcionam felicidade e contribuem para a minha evolução, especialmente neste momento pândemico que estamos vivendo.

Sou muito grata.

*“Vem soleníssima,
Soleníssima e cheia
De uma oculta vontade de soluçar,
Talvez porque a alma é grande e a vida pequena,
E todos os gestos não saem do nosso corpo
E só alcançamos onde o nosso braço chega,
E só vemos até onde chega o nosso olhar.*

*Vem, dolorosa,
Mater-Dolorosa das Angústias dos Tímidos,
Turris-Eburnea das Tristezas dos Desprezados,
Mão fresca sobre a testa em febre dos humildes,
Sabor de água sobre os lábios secos dos Cansados.*

*Vem, lá do fundo
Do horizonte lívido,
Vem e arranca-me
Do solo de angústia e de inutilidade
Onde vicejo”*

Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HMI	Hipomineralização Molar-Incisivo
MIH	Molar-Incisor Hypomineralization
IRF6	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i> - Fator regulador de interferon 6
TGFA	<i>Transforming Growth Factor Alpha</i> - Fator Transformador do Crescimento alfa
DDEs	Defeitos de desenvolvimento do esmalte
EAPD	<i>European Association of Paediatric Dentistry</i> – Associação Europeia de Odontopediatria
HMD	Hipomineralização Molar Decíduo
FDI	<i>Fédération Dentaire Internationale</i> - Federação Internacional de Odontologia
ppm F	Partes por milhão de Fluoreto
CPP-ACP	Complexo de fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucléico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
DNA	<i>Deoxyribonucleic (ADN)</i> - Ácido desoxirribonucleico
VIC	4,7,2'-triclouro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína
FAM	6-carboxifluoresceína
TANRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
qPCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> - Reação da Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
ICDAS	<i>International Caries Detection and Assessment System</i>
Nm	Nanômetros
Pellet	Precipitado do material (denominação genérica)
µL	Microlitro
Rpm	Rotação por minuto
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> - Tris(hidroximetil)aminometano
mM	Milimolar
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Solução de dodecilsulfato de sódio
tag SNP	SNP Representativo
FLP	Fissura lábio-palatina
DL	Desequilíbrio de ligação

RESUMO

Introdução: A hipomineralização molar-incisivo (HMI) é considerada uma desordem de mineralização do esmalte dentário caracterizada por lesões brancas a acastanhadas, que apresenta rápida progressão da doença cárie e afeta, principalmente, os primeiros molares e, ocasionalmente, incisivos permanentes. Geralmente, ocorre quando há distúrbios durante o estágio de maturação da amelogenese. Fatores genéticos e ambientais desempenham um papel no seu desenvolvimento, mas nenhum fator de risco conclusivo explica a origem da desordem. **Objetivo:** Avaliar a interação e contribuição do gene *IRF6* (Fator regulador de interferon 6) e *TGFA* (Fator transformador de crescimento epitelial alfa), assim como a influência de fatores ambientais durante o período gestacional, puerpério, e alterações de zero a três anos, na possível etiologia da HMI. **Material e métodos:** O estudo consistiu em análise de associação genética do tipo caso-controle. A amostra foi composta por 200 participantes, 100 (grupo caso – com HMI) e 100 (grupo controle), com faixa etária entre seis a 10 anos. Células da mucosa bucal foram obtidas por meio de bochechos com solução de glicose 3%. O protocolo de extração do DNA foi executado com acetato de amônio e EDTA. A amplificação do material genético foi conduzida por meio da técnica de reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) com uso de sondas TaqMan® predefinidas. O teste qui-quadrado foi aplicado para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos. **Resultados:** Na análise bivariada os achados para o gene *IRF6* no modelo aditivo foram: rs2235371 ($p=0,157$), rs2013162 ($p=0,090$). Para o gene *TGFA* no modelo recessivo: rs930655 ($p=0,115$). Adicionalmente, para as variáveis sexo ($p=0,023$), febre ($p=0,168$) e otite ($p=0,087$). Após a análise multivariada houve uma diferença estatisticamente significativa para a variável sexo feminino (OR=0,52, 95%CL=0,29-0,91, $p=0,024$). **Conclusão:** Neste estudo as variantes genéticas do *IRF6* e *TGFA* não contribuíram no desenvolvimento da HMI em dentes permanentes de crianças. Entretanto, a doença apresentou maior prevalência nas mulheres.

Palavras-chave: Hipomineralização dentária, estudos de associação genética, esmalte dentário, polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Introduction: Molar-incisor hypomineralization (MIH) is considered a dental enamel mineralization disorder characterized by white to brownish lesions, which presents a rapid progression of caries disease. Specifically, it affects the first permanent molars and occasionally incisors. It happens when disturbances occur during the amelogenesis maturation stage. Genetic and environmental factors play a role in its development, but no conclusive risk factors explain disease aetiology. **Objective:** To evaluate an interaction and contribution of the *IRF6* (interferon regulatory factor 6) and *TGFA* (transforming growth factor-alpha gene), as well as influence of environmental factors in the gestational period, puerperium, and changes from 0 to 3 years, in the possible aetiology of the MIH. **Material and methods:** This research consisted of analysis of case-control genetic association study. The sample enrolled 200 participants, 100 with MIH (case group with MIH) and 100 (control group), with 6 to 10 years of age. Cells of the oral mucosa were obtained using mouthwashes with a 3% glucose solution. The DNA extraction protocol was performed with ammonium acetate and EDTA. The amplification of the genetic material was carried out using the quantitative polymerase chain reaction technique in real time (qPCR) with the use of TaqMan® predesigned probes. The chi-square test was designed to compare both allelic and genotypic frequencies between groups. **Results:** The bivariate analysis of *IRF6* gene markers in the additive model presented the following p-values: rs2235371 (p=0.157), rs2013162 (p=0.090), and for the *TGFA* gene markers in the recessive model: rs930655 (p=0.115). In addition to the variables: sex (p=0.023), fever (p=0.16) and otitis (p=0.08). In the multivariate analysis, the gender variable (p=0.024) demonstrated statistically significant. **Conclusion:** In this study, the genetic variants of *IRF6* and *TGFA* did not contribute to the development of MIH in children's permanent teeth. However, the disease was more prevalent in women.

Keywords: Tooth demineralization, genetic association studies, dental enamel, single nucleotide polymorphism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografias (a-b-c) representando dentes afetados por HMI.....	9
Figura 2. Representação simplificada da estrutura do DNA.....	17
Figura 3. Representação das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
Figura 4. Representação de discriminação alélica através do software utilizado no sistema de qPCR QuantStudio™ da marca Applied Biosystems.....	22
Figura 5. Localização, função, frequências dos marcadores propostos para a análise genética.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística de variáveis ambientais nos grupos caso e controle.....38

Tabela 2. Análise genotípica nos modelos dominante e recessivo dos tag SNPs do gene *IRF6*.....40

Tabela 3. Análise genotípica nos modelos dominante e recessivo dos tag SNPs do gene *TGFA*.....41

APÊNDICES

A. Desequilíbrio de ligação entre os tagSNPs selecionados para cobertura do gene <i>TGFA</i> e similar seleção para o gene <i>IRF6</i>	92
B. Questionário da pesquisa.....	93
C. Odontograma.....	95
D. Fotografia de paciente com HMI.....	96

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.	Parecer do Comitê de Ética.....	97
-----------------	---------------------------------	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Hipomineralização Molar-Incisivo.....	1
1.2	Epidemiologia da HMI.....	10
1.3	Tratamento da HMI.....	13
1.4	Genética - Aspectos gerais.....	15
1.5	Reação em cadeia da polymerase (PCR) - Técnica utilizada no experimento...	18
1.6	Ensaio TaqMan™ - Sistema utilizado no experimento.....	20
1.7	Método dos genes candidatos.....	23
1.8	Gene <i>IRF6</i> (Fator regulador de interferon 6).....	23
1.9	Gene <i>TGFA</i> (Fator transformador de crescimento epitelial alfa).....	24
2.	OBJETIVO.....	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Estratégia de recrutamento e coleta de dados.....	27
3.2	Diagnóstico da HMI.....	29
3.3	Critérios de inclusão.....	29
3.4	Critérios de exclusão.....	30
3.5	Coleta de material biológico.....	30
3.6	Protocolo para extração e purificação do DNA de células bucais.....	30
3.7	Seleção de marcadores.....	33
3.8	Análise estatística.....	34
4.	RESULTADOS.....	36
5.	DISCUSSÃO.....	43
6.	CONCLUSÃO.....	48
7.	ARTIGO 1.....	49
8.	REFERÊNCIAS.....	82
9	APÊNDICES.....	92
10.	ANEXOS.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipomineralização molar-incisivo

A hipomineralização molar-incisivo (HMI) é considerada uma desordem de mineralização do esmalte dentário, que apresenta defeito qualitativo durante sua formação. Expõe alterações na translucidez do esmalte e afeta de um a quatro primeiros molares permanentes, associada ou não aos incisivos (ALALUUSUA, 2010; GIUCA *et al.*, 2020). Considerada um distúrbio que ocorre durante o estágio de maturação, ela é clinicamente visível como opacidades do esmalte e representa uma discussão necessária em Odontopediatria uma vez que apresenta um conjunto relevante de desafios aos profissionais (GIUCA *et al.*, 2020; RODD *et al.*, 2020; WEERHEIJM, 2003).

O primeiro estudo epidemiológico sobre hipomineralização idiopática do esmalte em dentes permanentes relatado na literatura, foi em 1987, na Suécia (KOCH *et al.*, 1987). Entretanto, apenas em 2001 foi definido o termo HMI (WEERHEIJM; JALEVIK; ALALUUSUA, 2001).

A HMI foi observada em extratos arqueológicos de esqueletos de séculos passados (KÜHNISCH *et al.*, 2016; OGDEN; PINHASI; WHITE, 2008). Sugeriu-se que esta condição poderia ter sido mascarada por elevados índices de doença cárie (OGDEN; PINHASI; WHITE, 2008). Entretanto, a hipótese de que a HMI está possivelmente relacionada às condições de vida contemporâneas, ou a outros fatores biológicos, também foi evidenciada devido pouca aparição desta condição nas séries esqueléticas arqueológicas (KÜHNISCH *et al.*, 2016).

As características do esmalte dentário o tornam o tecido mais duro do corpo humano, devido ao padrão de organização e mineralização. Ele é produzido pelos ameloblastos, que consistem em células especializadas diferenciadas (PATEL; AGHABABAIE; PAREKH, 2019). Apesar de sua dureza, o esmalte é extremamente friável devido à sua composição (97% material inorgânico, 1% material orgânico e 2% água) (KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

Classificada como um defeito de desenvolvimento de esmalte (DDE), a HMI se manifesta através de alterações na qualidade do esmalte, e os aspectos histológicos desse tecido fundamentam a origem dos DDE. O início da formação do esmalte dentário ocorre na fase de amelogênese, na fase de coroa da odontogênese, que se inicia, aproximadamente, na 18^a semana de vida intrauterina. A amelogênese se divide em cinco fases, sendo elas, morfogenética, de diferenciação, secretora, de maturação e protetora. A literatura destaca que os ameloblastos são altamente suscetíveis a pequenas mudanças (CROMBIE; MANTON; KILPATRICK, 2009). Suas atividades, assim como de células relacionadas, determinam as origens dos DDE. Destarte, os principais fatores na influência do aparecimento dessas condições são: a fase da atividade dos ameloblastos, a gravidade e duração da injúria que leva a atividade temporária ou inatividade permanente das células e, especialmente, a observação de alterações da camada papilar e da espessura do esmalte, e avaliação de componentes químicos e bioquímicos desses defeitos (SUCKLING, 1989).

A formação desse tecido pode ser separada em estágios iniciais, que envolvem a secreção de proteínas da matriz e estágios posteriores de maturação. Enfatiza-se que as proteínas da matriz do esmalte são primordiais para um desenvolvimento adequado, sendo a fase de maturação essencial para a constituição final da dureza do esmalte (KATCHBURIAN; ARANA, 2017). A mineralização do esmalte dos dentes decíduos se inicia aproximadamente entre a 13^a e 19^a semana do período de vida intrauterino e é finalizada durante o primeiro ano de vida pós-natal (LUNT; LAW, 1974).

A mineralização do esmalte se inicia instantaneamente após o começo da secreção da matriz orgânica e, posteriormente, eventos celulares conduzem a

1 uma maturação do tecido, o qual se torna altamente mineralizado, devido à
2 degradação e remoção da matriz orgânica que possibilita o crescimento dos
3 cristais de mineral de hidroxiapatita (KATCHBURIAN; ARANA, 2017). Sendo
4 assim, os DDE são definidos como distúrbios, que surgem nas matrizes dos
5 tecidos duros e, em sua mineralização, durante a odontogênese (FAGRELL,
6 2011).

7 Existem principalmente dois maiores exemplos de DDE, a hipoplasia e a
8 hipomineralização. Na hipoplasia, há sensibilização durante a fase de secreção
9 da amelogênese e pode existir uma redução na espessura do esmalte, que se
10 trata de um defeito quantitativo observado microscopicamente (SUCKLING,
11 1989). Nesse caso, ela pode se apresentar em formato irregular nos dentes
12 afetados, mais finos ou menores em tamanho, com possíveis linhas ou orifícios,
13 além de bordas arredondadas e suaves (FAGRELL, 2011; PATEL;
14 AGHABABAIE; PAREKH, 2019).

15 Na hipomineralização, as células são afetadas na fase tardia da
16 mineralização ou maturação do esmalte, induzindo a um defeito na translucidez
17 deste tecido (SUCKLING, 1989). Esses defeitos constituem alterações visíveis
18 resultantes de danos precoces ao órgão do esmalte, que apresentam redução
19 na sua qualidade, devido à mineralização incompleta e espessura normal.
20 Clinicamente, as opacidades podem ser demarcadas e/ou difusas, localizadas
21 ou generalizadas (PATEL; AGHABABAIE; PAREKH, 2019; SUCKLING, 1989).
22 A HMI encontra-se nessa classificação.

23 Outras alterações podem ser citadas no diagnóstico diferencial da HMI,
24 uma vez que seu correto diagnóstico é primordial para condutas de prevenção e
25 tratamentos adequados. Um exemplo é a fluorose, que está diretamente
26 relacionada com a ingestão do fluoreto no período de formação do esmalte, fator

que também pode causar hipomineralização, mas comumente afeta os dentes de modo generalizado, sem limites claros da alteração, ou em forma de estrias esbranquiçadas e normalmente difusas. Afetam os dentes homólogos de forma simétrica, e podem variar para coloração mais escura conforme gravidade (PATEL; AGHABABAIE; PAREKH, 2019).

A amelogênese imperfeita apresenta defeitos hipomineralizados ou hipoplásicos que tendem a ser generalizados e afeta ambas as dentições. Os dentes se apresentam na cor acastanhada-escura, devido à transparência da dentina adjacente, e como possui predisposição genética, sua prevalência ocorre na proporção de 1 a cada 15 mil indivíduos, em média (PATEL; AGHABABAIE; PAREKH, 2019).

A lesão de mancha branca também deve ser destacada, e é definida por manifestação clínica da cárie precoce do esmalte que apresenta áreas opacas e esbranquiçadas. Além disso, exibe descalcificação com formato e tamanho variáveis e com contornos relativamente nítidos, e pode ocorrer sempre que a placa bacteriana é retida na superfície do esmalte por um período prolongado, como em período de tratamento ortodôntico. Encontra-se, principalmente, nos locais onde a placa bacteriana se acumula, preferencialmente ao redor dos braquetes ou no terço cervical labial (DENIS *et al.*, 2013).

Em comparação com as demais condições citadas previamente, a HMI se manifesta quando os ameloblastos são afetados no estágio tardio da amelogênese, precisamente na fase de maturação. Pode ser diagnosticada através das diferentes colorações/opacidades de esmalte que evidenciam o grau de severidade, como coloração branca, amarela ou marrom e pela presença de restaurações atípicas. Observa-se que o indivíduo ao apresentar extração

1 precoce dos molares deve ser investigado para a o diagnóstico de HMI, segundo
2 os critérios estabelecidos pela Academia Europeia de Odontopediatria (EAPD,
3 do inglês *European Association of Paediatric Dentistry*) (ALALUUSUA, 2010;
4 KÜHNISCH *et al.*, 2014).

5 As opacidades amareladas e amarronzadas são mais porosas do que as
6 brancas e possuem pior organização de prismas do esmalte, além de serem
7 mais suscetíveis à ataque ácido. Nos casos mais graves, as cúspides e as
8 superfícies oclusais dos molares podem se desintegrar, favorecendo o
9 aparecimento de uma rápida progressão de doença cárie. Essa condição é um
10 fator de risco para a presença de cárie dentária, principalmente em populações
11 que apresentam baixos níveis da doença (Fagrell *et al.*, 2008). Segundo estudo
12 longitudinal, a cárie precoce de infância em pré-escolares possui uma forte
13 relação com os DDE, quando comparada com crianças que não apresentam
14 esses defeitos no mesmo intervalo de idade (TARGINO *et al.*, 2011).

15 A partir do desenvolvimento dos segundos molares decíduos, ocorre uma
16 sobreposição do início da amelogenese dos primeiros molares permanentes,
17 podendo ocorrer a hipomineralização molar decíduo (HMD), fator preditor para
18 HMI. Estudos que demonstraram associação entre HMI e HMD, determinaram
19 que crianças que apresentam HMD possuem 4,7 vezes mais chances de
20 desenvolver HMI (ELFRINK *et al.*, 2012; GAROT *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019).
21 Igualmente, a presença de opacidades em caninos decíduos também faz com
22 que esses dentes sejam considerados preditores para o desenvolvimento de
23 HMI (SÉ *et al.*, 2017).

24 De acordo com os fenótipos dos DDE, um estudo com profissionais de
25 serviço público de saúde revelou que a equipe odontológica não treinada para

1 reconhecer e diferenciar essas lesões possui capacidade insuficiente para
2 identificação desses defeitos, uma vez que menos de 50% dos resultados
3 obtidos para as superfícies afetadas demonstraram diagnósticos corretos
4 (JÄLEVIK; SZIGYARTO-MATEI; ROBERTSON, 2019). Frente a isso, observa-
5 se uma grande importância clínica no correto diagnóstico.

6 Fatores distintos que afetam as mesmas ou as diferentes funções dos
7 ameloblastos, durante os estágios de maturação, podem ser responsáveis pela
8 hipomineralização do esmalte (MALMBERG; NORÉN; BERNIN, 2019). A
9 etiologia da HMI não é completamente conhecida e a hipótese de herança
10 multifatorial é comumente observada. Muitas doenças e condições da infância
11 estudadas tentam explicar os DDE, incluindo doenças no pré-natal, perinatal e
12 pós-natal (infantil), além da predisposição genética (ALALUUSUA, 2010; GIUCA
13 *et al.*, 2020; JEREMIAS *et al.*, 2021; RODD *et al.*, 2020; SUCKLING, 1989;
14 SUNDFELD *et al.*, 2020).

15 Resultados significativamente associados ao aparecimento desta
16 condição, como estresse psicológico, parto cesáreo, doença materna,
17 complicações no parto, febre e doenças respiratórias durante os primeiros anos
18 de vida da criança foram relatados (ALALUUSUA, 2010; FATTURI; MENEZES;
19 *et al.*, 2019; TOURINO *et al.*, 2016). Dados sobre a prevalência geral de HMI
20 foram demonstrados, de acordo com o desfecho do uso de medicamentos
21 inalados para o tratamento da asma, uma vez que HMI e asma são doenças
22 comuns da infância, e os resultados apontaram que não houve associação entre
23 o uso da medicação e HMI (WOGELIUS; HANSEN VIUFF; HAUBEK, 2020).
24 Dados relevantes foram encontrados em estudo atual sobre a prevalência de
25 HMI (46,6%) e associação com diabetes gestacional e sofrimento fetal agudo,
26 em primeiro estudo sobre HMI e população quilombola residente em zona rural

do Brasil (DOURADO *et al.*, 2020). O estudo propõe também que fatores como acesso restrito a alimentos e serviços de saúde, além da baixa renda, observados na população, podem ser agravantes do surgimento da HMI.

A utilização de amoxicilina, fármaco antibiótico, também pode estar associada com o surgimento da condição, devido à atuação na modificação no processo da amelogenese (LAISI *et al.*, 2009; WHATLING; FEARNE, 2008). A penicilina também foi investigada e apresentou resultados de associação com HMI (GIUCA *et al.*, 2018). Outrossim, ao investigar a relação entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e HMI, associações significativas foram encontradas, sendo que as menores concentrações de 25-hidroxivitamina D foram associadas a uma maior razão de chances de apresentar HMI (KÜHNISCH *et al.*, 2015). Resultados significativos também foram demonstrados quanto ao alto teor de bifenilas policloradas (PCB) no leite materno, que são compostos altamente tóxicos, maléficos ao meio ambiente e aos seres vivos, sendo que em longo prazo pode ocorrer alteração na formação do esmalte (JAN; VRBIČ, 2000).

Por outro lado, fatores genéticos abordados em diferentes estudos de epidemiologia molecular sugerem que a HMI possui um componente que envolve a variação genética durante a formação do esmalte dentário, resultando em diferentes fenótipos dessa condição (BUSSANELI *et al.*, 2019; CROMBIE; MANTON; KILPATRICK, 2009; FATTURI *et al.*, 2020; FATTURI; WAMBIER; *et al.*, 2019; HOČEVAR *et al.*, 2020; JEREMIAS *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2017; WUOLLET *et al.*, 2016), que serão abordados posteriormente.

Em estudo realizado na Polônia, em região com maior e menor índice de poluição (Silésia e Pomerânia, respectivamente), o diagnóstico da HMI foi observado com maior frequência em crianças residentes em área com maior

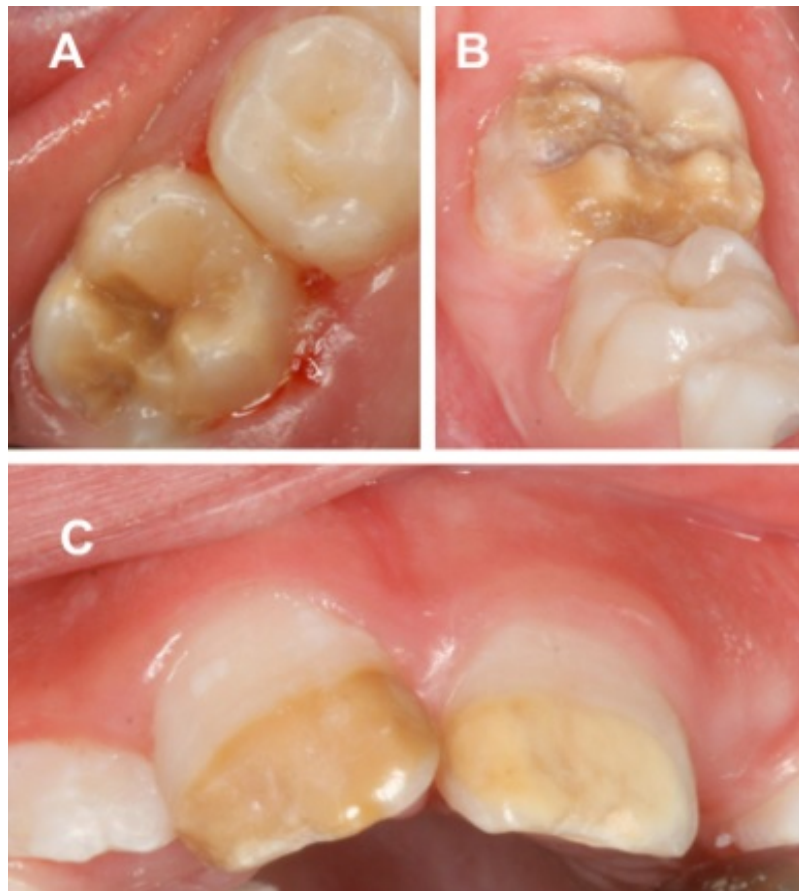
1 poluição do ar, sendo assim, os autores sugerem uma correlação entre maiores
2 concentrações de poluentes atmosféricos e desenvolvimento de HMI
3 (GŁÓDKOWSKA; EMERICH, 2021).

4 Em revisão sistemática e meta-análise realizada em 2020, sugeriu-se que
5 o nascimento prematuro apresenta chance 1,6 vezes maior de suscetibilidade, e
6 baixo peso ao nascer chance 3,3 vezes maior de desenvolvimento da HMI (WU
7 *et al.*, 2020).

8 A HMI é uma condição que pode ser grave e acarretar sintomatologia
9 dolorosa nos pacientes, como o colapso de estruturas e cavitações no esmalte,
10 bem como doença cárie de rápida progressão – devido à estrutura anormal do
11 esmalte dentário – e hipersensibilidade. Em nível microscópico foi observada a
12 presença de bactérias bucais, indicadas como Gram-positivas, em molares não
13 cariados apresentando HMI, sugerindo fissuras nesses dentes que não são
14 observadas clinicamente (FAGRELL *et al.*, 2008). O espaço interprismático é
15 mais acentuado, portanto o esmalte é mais poroso comparado com o tecido
16 sadio (GIUCA *et al.*, 2020). Ademais, a inflamação pulpar subclínica crônica é
17 considerada uma consequência do aumento da porosidade do esmalte e da
18 dureza reduzida (RODD; BOISSONADE; DAY, 2007).

19 Outro fator considerável, já apontado na literatura (AGUIRRE *et al.*, 2020),
20 foi o fato dessa condição não exibir resultados expressivos, em termos
21 bibliográficos, em buscas na base de dados do Google, entre Janeiro de 2004 à
22 Novembro de 2018. Parece também haver um aumento lento de
23 interesse/conhecimento por parte da população, sugerindo que o conhecimento
24 da HMI está confinado a profissionais cirurgiões-dentistas e pessoas que
25 apresentam as características dos defeitos citados, conforme Figura 1.

1 **Figura 1. Fotografias (a-b-c) representando dentes afetados por HMI**



2

3 **Legenda:** O primeiro molar permanente (A) apresenta uma coloração marrom/amarelo cremosa,
4 principalmente na superfície oclusal e sem perda de esmalte (leve a moderado). Em contraste,
5 o primeiro molar permanente (B) do mesmo indivíduo apresenta severa perda de esmalte em
6 grande parte do dente. Esta criança possui uma relação fenótipo de esmalte marcado dos
7 incisivos centrais permanentes (C) enquanto o incisivo lateral permanente aparece normal.

8 Fonte: Lacruz, Rodrigo S., et al. "Dental enamel formation and implications for oral health and
9 disease." *Physiological Reviews* 97.3 (2017): 939-993. (LACRUZ et al., 2017).

1.2 Epidemiologia da HMI

Divergências sobre a prevalência de HMI, em diferentes países, têm sido observadas na literatura. A prevalência relatada em 2010 variou de 2,4% na Alemanha e na Bulgária, até 40,2% no Rio de Janeiro (Brasil). Foi destacado também que 40% das crianças em Leeds (Inglaterra) e 44% das crianças em Sydney (Austrália) possuem pelo menos um primeiro molar permanente com opacidade demarcada. No Quênia foi constatada uma prevalência de 13,7% (JÄLEVIK, 2010).

Para melhor compreensão, diferentes meta-análises vem sendo conduzidas tratando deste tema e de sua prevalência na população. Uma revisão sistemática e meta-análise (SCHWENDICKE *et al.*, 2018, 2019) apresentou uma projeção da taxa de prevalência de 43 países, com o número estimado de pessoas afetadas por HMI, em 2015, alcançando 849.278 milhões (12.9%) e incidência estimada em 9.498 milhões, para 2016. A maioria dos novos casos de HMI foi observada, principalmente, em regiões com acesso limitado aos cuidados de saúde bucal. Em outra meta-análise, realizada em 2018, a partir da análise estatística de 70 estudos, foi encontrado um aumento do número de casos, com um percentual reportado de 18% de casos na América do Sul, 16,3% na Oceania, 14,3% na Europa, 13% na Ásia e 10,9% na África, apresentando uma porcentagem global estimada em 14,2% (ZHAO *et al.*, 2018). Já em meta-análise realizada em 2020, que utilizou um modelo de efeitos aleatórios, a prevalência de MIH encontrada foi de 10,1%, baseada em 70 estudos. Foi enfatizado também que há necessidade de mais estudos de prevalência envolvendo populações isoladas, em diferentes partes do mundo (ÖZÜKOÇ; AKGÖL; MÜNEVVEROĞLU, 2020).

1 No Brasil, o primeiro estudo sobre HMI realizado com crianças de 7 a 13
2 anos expôs uma taxa de prevalência de 40,2%, no Rio de Janeiro, em 2010
3 (SOVIERO *et al.*, 2009). Em pesquisa realizada em Minas Gerais (COSTA-
4 SILVA *et al.*, 2010), com participação de 918 crianças com HMI, observou-se
5 prevalência de 17,6% em áreas urbanas e 24,3% em áreas rurais. Já a
6 porcentagem de crianças que tiveram pelo menos um primeiro molar
7 permanente com HMI foi de 19,8%. Em Belém (Pará) foi constatada prevalência
8 de 8,84% (JÚNIOR *et al.*, 2015), seguido de Manaus (Amazonas) com 9,18%
9 (HANAN *et al.*, 2015) e em Paranoá (Distrito Federal) 16,1% (RAPOSO *et al.*,
10 2019). A partir de meta-análise já citada, o Brasil apresentou prevalência de
11 19,9% (ZHAO *et al.*, 2018).

12 A prevalência de HMI na cidade de Araraquara, situada em São Paulo,
13 foi de 12,3% (JEREMIAS *et al.*, 2013). Esse dado é fundamental, pois a
14 porcentagem revelada em Araraquara em 2013 foi utilizada como parâmetro de
15 prevalência da cidade de Curitiba no presente estudo. Isto é justificado pelo ano
16 de coleta das amostras, visto que, não havia dados de prevalência dessa
17 condição publicados com dados da cidade de Curitiba em 2018, cidade e ano de
18 realização do estudo. Em 2019, Curitiba apresentou prevalência de 12,1%
19 (PORTELLA *et al.*, 2019; REYES *et al.*, 2019).

20 Conclui-se que a HMI, ao considerar um aumento do número de casos a
21 cada ano, pode ser classificada como uma das ocorrências mais comuns no
22 mundo atual (SCHNEIDER; SILVA, 2018). Pode ser considerada como um
23 problema de saúde pública silencioso, devido a implicações individuais – como
24 custos significativos a longo prazo e diminuição da qualidade de vida –, e

1 populacionais podendo implicar em um agravante socioeconômico substancial
2 por meio da alta prevalência da condição (HUBBARD *et al.*, 2017).

3 Alguns aspectos importantes em estudos epidemiológicos, que nesse
4 caso se revela nas distintas variações da taxa de prevalência de HMI em
5 diferentes populações, são os aspectos devidos a critérios de idade, metodologia
6 dos estudos e aqueles utilizados no diagnóstico dessa alteração (MERCHÁN-
7 HAMANN; TAUILL; COSTA, 2000).

8

9

10

1.3 Tratamento da HMI

Existem distintas modalidades de tratamento para a HMI disponíveis atualmente, incluindo a prevenção da doença cárie – comumente associada a esta condição –, prevenção da quebra do esmalte devido ao aumento da porosidade, tratamento de hipersensibilidade ou dor pela maior vascularização pulpar em dentes afetados, tratamentos restauradores, com fins de funcionalidade e estética e, inclusive, a extração dentária prematura, mediante cárie extensa e/ou fratura (RODD; BOISSONADE; DAY, 2007). Contudo, a ansiedade frente aos procedimentos dentários e a falta de cooperação são covariáveis frequentes (LINNER *et al.*, 2020).

Na prevenção, assim que os dentes afetados entrarem em erupção, deve-se iniciar as estratégias em domicílio e nos consultórios odontológicos, principalmente devido a maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de lesões de cárie. Frente a isto, o aconselhamento dietético e cremes dentais com flúor (1450 ppm F) podem ser utilizados para minimizar o risco de desenvolver a doença cárie e a hipersensibilidade dentária. Para pacientes que apresentam dor leve, a aplicação caseira de complexo de fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) pode ajudar na mineralização dos dentes, e pode ser encontrada em produtos como enxaguante bucal, dentífrico e goma de mascar (GHANIM *et al.*, 2017).

Para pacientes com maior porosidade no esmalte, perda de esmalte e quebra durante a erupção, os selantes de fóssulas e fissuras são opções viáveis. Acerca da hipersensibilidade espontânea, aplicação profissional de selantes e de vernizes de flúor pode ser realizada (GHANIM *et al.*, 2017).

1 Em dentes posteriores, o tratamento restaurador pode ser realizado a
2 partir de restauração com ionômero de vidro ou ionômero de vidro modificado
3 por resina, e posteriormente restauração definitiva, com resina composta. Como
4 também, a utilização de resina composta, incluindo a remoção de todo o esmalte
5 poroso. Mesmo coroas de metal pré-formadas são indicadas para molares
6 gravemente danificados, com alta taxa de sobrevivência (GHANIM *et al.*, 2017).

7 Em relação a extração dentária, a indicação é feita para crianças com
8 idade entre oito anos e meio a nove anos, que apresentam molares severamente
9 afetados. Para tratamentos estéticos em dentes anteriores, encontram-se à
10 disposição tratamentos conservadores, como a abrasão e o clareamento. Em
11 casos mais severos, a remoção de esmalte afetado e restauração com resina
12 composta é uma alternativa (GHANIM *et al.*, 2017).

13 Odontopediatras devem contribuir para alcançar um diagnóstico precoce
14 e resultados satisfatórios no tratamento escolhido, principalmente devido a esses
15 pacientes se submeterem aos tratamentos dentários quase 10 vezes mais do
16 que crianças não afetadas pela condição. Pode-se concluir que esses pacientes,
17 com sintomas graves, necessitam de uma atenção multiprofissional por
18 demonstrarem aumento de ansiedade ao longo do dia. (GIUCA *et al.*, 2020;
19 JÄLEVIK; KLINGBERG, 2002).

1 **1.4 Genética – Aspectos gerais**

2 Em 1965, Morton e outros pesquisadores começaram a desenvolver o
3 conceito de epidemiologia genética, que pode ser considerado como o estudo
4 de doenças crônicas comuns, de etiologia poligênica, excluindo as doenças
5 mendelianas (BEATY; KHOURY, 2000; MORTON, 2003). Além disso, o conceito
6 de “genético” pode incluir as heranças biológicas e as heranças culturais, do
7 mesmo modo as relações familiares podem ser amplas e incluir associações de
8 gêmeos, como também grupos étnicos, por exemplo (GONÇALVES;
9 GONÇALVES, 1990). Isto posto, as estratégias da metodologia da epidemiologia
10 genética constituem sistematizações quantitativas com o objetivo de conciliar
11 objetos de estudo da área em questão (GONÇALVES; GONÇALVES, 1990).

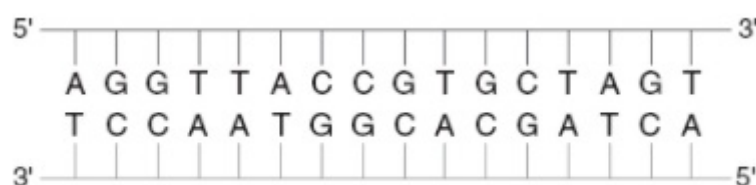
12 Atualmente, o campo da genética inclui desfechos importantes a serem
13 considerados e se encontra com destaque no Índice Global de Inovação de 2019,
14 um dos principais instrumentos que apresenta dados sobre campos promissores
15 de inovação no mundo, incluindo inovação e tecnologias médicas (CORNELL
16 UNIVERSITY INSEAD AND WIPO, 2019). O progresso nas análises e
17 descrições fenotípicas tem sido notável nos últimos 50 anos. Biomarcadores
18 como proteínas, carboidratos, lipídios, hormônios, ácido ribonucleico (RNA),
19 entre outros, foram descobertos e correlacionados com diferentes doenças e
20 distúrbios humanos. Desde o final da década de 1930, muitos profissionais de
21 saúde adotaram a genética humana e recomendaram que fosse incluída como
22 um requisito de competência em educação odontológica (SLAVKIN, 2014).

23 As doenças genéticas podem ser classificadas como mendelianas
24 simples, que antigamente era o foco primário da genética médica, e como
25 doenças complexas (herança multifatorial). No entanto, as doenças mendelianas

1 não explicam as formas mais comuns de doenças humanas. Algumas doenças
2 mais prevalentes com um importante componente genético, como diabetes,
3 doença cardiovascular, periodontite em adultos e fissuras orofaciais, são
4 doenças geneticamente complexas. Estas condições não são tipicamente
5 causadas por mutações, mas sim por alterações mais sutis na estrutura ou
6 função do gene, caracterizadas como polimorfismos funcionais. Estas variantes
7 genéticas estão tipicamente presentes na população em frequências
8 razoavelmente altas (> 1%) (KERR, 2003).

9 Por meio de estudos de sequenciamento, houve elucidação de que a
10 maioria da sequência genética é similar a todos os seres humanos, ou seja
11 99,9% idêntica. A diferença de 0,1% é quase totalmente proveniente de
12 diferenças de um único nucleotídeo, conforme pode ser depreendido da Figura
13 2. Destarte, é possível trabalhar com uma sequência de referência que ampara
14 parte da variabilidade fenotípica de uma população (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

Figura 2 – Representação simplificada da estrutura do DNA



Legenda: Nesta escala, que representa apenas uma fita do DNA na direção 5' a 3', os degraus são representados pelas bases de nucleotídeos complementares. Existem quatro bases de nucleotídios presentes no DNA, são elas: adenina (A) e guanina (G) (purinas) – e timina (T) e citosina (C) (pirimidinas).

Fonte: Koneman E, *et al.* Woods G. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. Bras - Guanabara Koogan. 2018.

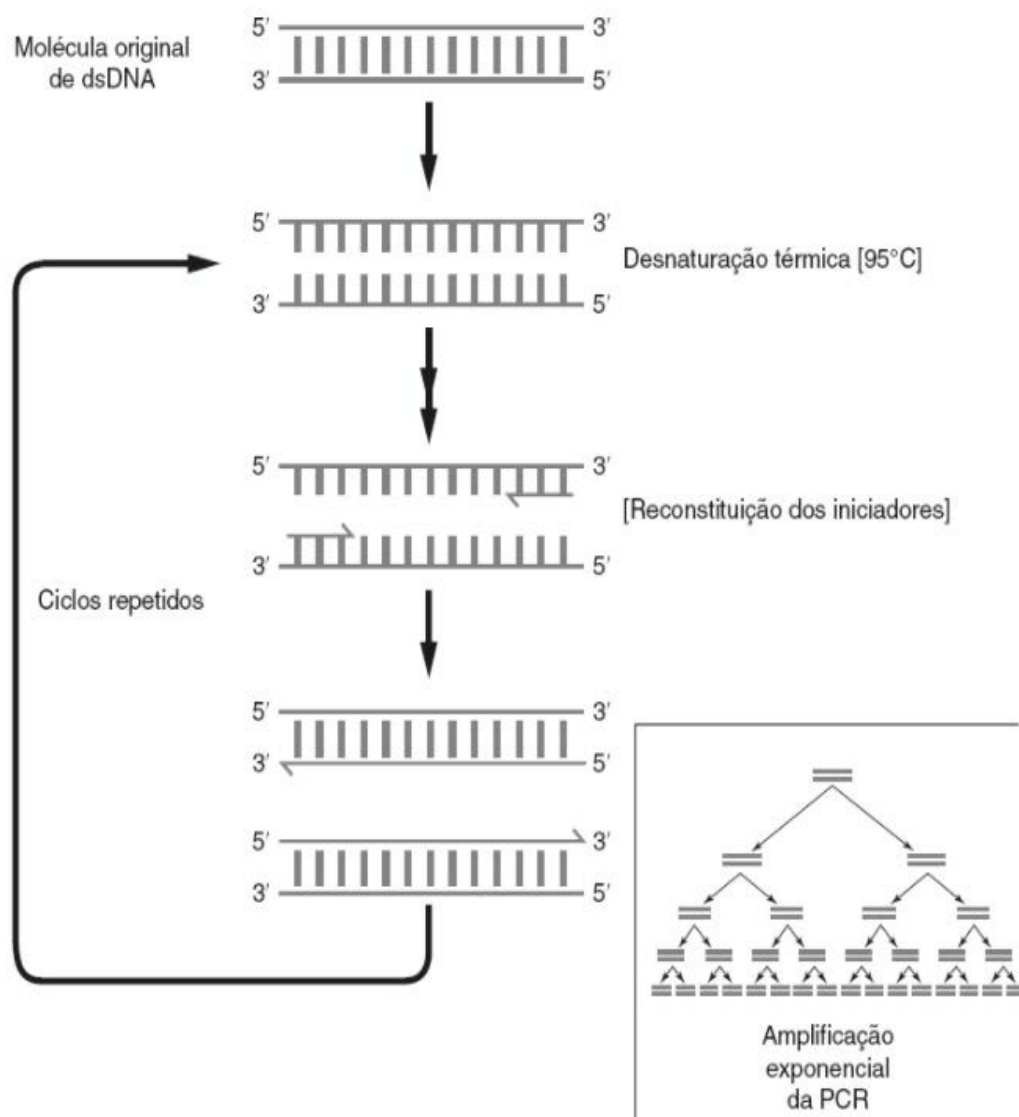
No presente trabalho, foram genotipados marcadores de Polimorfismos de Base (nucleotídeo) Única (SNP – do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*), um dos principais tipos de marcadores moleculares usados em mapeamento, que são nucleotídeos que apresentam variação de posições definidas na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) (**Figura 2**). Eles são comumente detectados por meio de comparação de sequência de DNA e podem ser encontrados em regiões codificadoras ou em espaços intergênicos (CAETANO, 2009). O SNP é definido pela substituição de um único nucleotídeo em determinada posição do DNA, e neste caso o nucleotídeo denomina-se alelo, pois representa uma forma alternativa do gene. Usualmente são encontrados dois variantes em uma espécie, logo considera-se o SNP como bi-alélico (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

1.5 Reação em cadeia da polymerase (PCR) – Técnica utilizada no experimento

Para a genotipagem foi utilizado o sistema de reação da cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), descrito por Kary Mullis, em 1983 (MULLIS, 1990), que possui como objetivo amplificar determinada parte do DNA, que contém informações importantes sobre o diagnóstico do indivíduo. Para realização da PCR é necessário o DNA alvo, iniciadores de oligonucleotídios do DNA, os quatro trifosfatos de nucleotídeos, DNA-polimerase termoestável, cloreto de magnésio e água ou agentes tampões (KONEMAN *et al.*, 2018).

A PCR convencional consiste em três fases de ciclos repetitivos. Na primeira fase ocorre a desnaturação do DNA molde, a partir de quando se atinge uma temperatura de 95°C, com a separação das duas fitas da molécula de DNA dupla-hélice. Na segunda fase, acontece o anelamento/hibridização dos iniciadores de oligonucleotídeos, que são fragmentos curtos de DNA, com as fitas complementares de DNA-alvo a uma temperatura aproximada de 55°C. O iniciador/primer que possui o mesmo sentido que a fita superior do DNA (5' - 3') é conhecido como *forward*, o outro primer possui o sentido da fita oposta e é conhecido como *reverse*. Por último, a extensão da reação a 72°C com os iniciadores é realizada pela DNA-polimerase, na qual ocorre a síntese de DNA. Após a ampliação completa do *amplicon* (produto), a temperatura da reação é elevada a 95°C para iniciar outro ciclo de PCR, e esta amplificação do DNA-alvo acontece de modo exponencial até formar milhões de *amplicons*, o que determina a sensibilidade da técnica (KONEMAN *et al.*, 2018) (**Figura 3**).

1 **Figura 3. Representação das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase**



2

3 Fonte: Koneman E, et al. Woods G. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. Bras - Guanabara
4 Koogan. 2018.

Ressalta-se a utilização de uma modificação dessa técnica, conhecida como ensaio de PCR em tempo real (qPCR), que possui um método de troca térmica mais rápida e uma mistura de reação homogênea, na qual as moléculas fluorogênicas utilizadas para detectar os produtos amplificados apresentam-se dentro da mesma câmara de reação (KONEMAN *et al.*, 2018). Esse método facilita a quantificação da expressão gênica em determinadas amostras biológicas, devido a se caracterizar como um método automático e rápido, ao dispensar a análise na eletroforese em gel de agarose, e conter um agente fluorescente que permite o monitoramento da reação, ao detectar ácidos nucleicos amplificados. Desse modo, o nível de fluorescência aumenta proporcionalmente ao aumento do número de cópias do DNA alvo em cada ciclo (VALARINI *et al.*, 2011). Entretanto, implica em um elevado custo para a realização desta técnica.

1.6 Ensaio TaqMan™ - Sistema utilizado no experimento

Para a realização da técnica foi utilizado o sistema TaqMan™, para discriminação entre dois alelos de um SNP específico no processo da qPCR. Utilizou-se uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR, conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. (*Todos os reagentes foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante).

Nesse sistema, uma sonda (oligonucleotídeo) demarcada com corantes de DNA fluorescentes distintos hibridiza uma região amplificada de interesse entre os dois iniciadores de PCR, e a combinação popular de corantes utilizada é FAM™ (6-carboxifluoresceína) e VIC™ (4,7,2'-triclóro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína) para o corante *reporter* e TAMRA para o corante

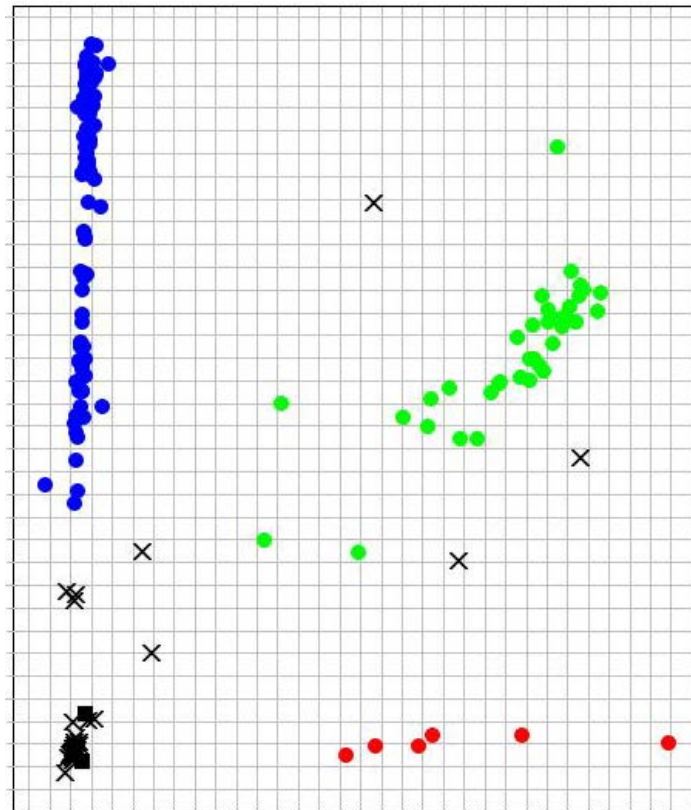
1 inibidor/silenciador - *quencher*. Sendo os corantes *reporter* – VIC™ específico
2 para o alelo "1", anexado à extremidade 5' do DNA, ou FAM™ específico para
3 o alelo "2". Como também, um corante inibidor *quencher* - 6-carboxi-tetrametil-
4 rodamina (TANRA), na extremidade 3' do DNA (HOLLAND *et al.*, 1991; MALKKI;
5 PETERSDORF, 2012).

6 Na maioria das vezes, a sonda é projetada para ter uma temperatura de
7 anelamento mais alta quando comparada com os *primers*, de modo que a sonda
8 é hibridizada quando a extensão (polimerização) destes *primers* começar, ou
9 seja, a enzima Taqpolimerase cliva a sonda que havia se ligado na fita de DNA,
10 devido a síntese da fita deslocar qualquer sonda TaqMan que hibridiza com a
11 sequência alvo, e então, um sinal fluorescente é gerado, que é captado
12 automaticamente pelo software de detecção da sequência implementado no
13 sistema qPCR (HOLLAND *et al.*, 1991).

14 Isto é, anteriormente quando a sonda está intacta e o corante *reporter* está
15 em proximidade com o corante *quencher*, nenhuma fluorescência é emitida
16 porque existe uma supressão da fluorescência desse corante *reporter* devido a
17 uma transferência de energia entre os dois corantes. Logo, é necessária a
18 hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente e
19 gerar acúmulo do alvo durante os ciclos da reação.

20 Posteriormente, para realizarmos as análises de interpretação, considera-
21 se que, quando o sinal fluorescente é emitido apenas do corante VIC, indica que
22 a amostra é homozigota para o alelo "1"; diferente da presença do sinal
23 fluorescente apenas para o corante FAM, que indica homozigose para o alelo
24 "2", e a presença de ambos os sinais fluorescentes indica heterozigosidade
25 (HOLLAND *et al.*, 1991) (Figura 4).

1 **Figura 4. Representação de discriminação alélica através do software**
2 **utilizado no sistema de qPCR QuantStudio™ da marca Applied Biosystems**



3

4 **Legenda:** Interpretação do exemplo de agrupamento dos genótipos - Marcação em vermelho:
5 genótipo homozigoto para alelo 1 = AA; em azul: genótipo homozigoto para alelo 2 = GG; em
6 verde: genótipo heterozigoto = AG. (Corante VIC=Alelo A/ FAM=Alelo G). Letra X = Genótipo
7 indefinido. Quadrado preto = Controles.

8 Fonte: Dados do trabalho.

9 Os ensaios de PCR em tempo real estão sendo amplamente utilizados, e
10 resultados atuais sugerem que pré-disposições genéticas específicas podem
11 contribuir para o aparecimento de HMI em indivíduos expostos a fatores

1 ambientais nocivos, durante o processo de amelogênese. Deste modo, esta
2 condição é causada por uma combinação de fatores ambientais e hereditários
3 (HOČEVAR *et al.*, 2020).

4 A hipótese desta dissertação é fundamentada pela possível contribuição
5 e/ou interação dos genes *IFR6* e *TGFA* no desenvolvimento da HMI, por meio
6 da estratégia de genes candidatos.

7 **1.6 Método dos genes candidatos**

8 Os genes candidatos são estruturas que potencialmente podem pertencer
9 à etiologia de um determinado distúrbio, uma vez que podem ser identificados
10 através de estudos em modelos animais ou de tecidos em estágio embrionário
11 específico (MURRAY, 1995).

12 A estratégia do gene candidato foi utilizada na pesquisa para investigar
13 possível etiologia multifatorial da HMI, devido as potenciais interações de mais
14 de um gene e o meio ambiente (VIEIRA; MANTON, 2019; JEREMIAS *et al.*,
15 2021).

16 **1.8 Gene *IRF6* - Fator regulador de interferon 6** (do inglês *Interferon*
17 *Regulatory Factor 6*) - Está localizado no cromossomo 1q32. Este gene codifica
18 um membro da família do fator de transcrição regulador do interferon (IRF), e a
19 proteína codificada pode ser um ativador de transcrição. Pertence a uma família
20 de nove fatores de transcrição que compartilham um domínio de ligação ao DNA
21 e um domínio de ligação de proteína. Mutações que acometem regiões desse
22 gene podem causar Oligodontia, Síndrome de Van Der Woude e Síndrome
23 Pterígio Poplíteo Autossômico Dominante. Além disso, as mutações também
24 estão associadas à fissura orofacial não sindrômica tipo 6, Sendo que, a Fissura

Lábio Palatina (FLP) é uma malformação orofacial que pertence a um distúrbio ou fenótipo mais amplo associado a outras anomalias morfológicas (GHASSIBÉ *et al.*, 2005).

Considerado como maior fator de suscetibilidade para o desenvolvimento de Fenda do lábio isolada, fenda do lábio/palato e fenda lábio-alveolar, este gene é elemento fundamental para a diferenciação do epitélio bucal, de acordo com sua participação na definição de uma adequada adesão epitelial para a formação do palato, sendo considerado indispensável para o desenvolvimento do palato e lábio e, portanto, no desenvolvimento bucal e maxilofacial. (INGRAHAM *et al.*, 2006; KONDO *et al.*, 2002; LETRA *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2007).

1.9 Gene *TGFA* – Fator Transformador do Crescimento alfa (do inglês *Transforming growth factor-alpha gene*)

Está localizado no cromossomo 2p13. Este gene codifica uma proteína secretora que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico que está localizado no epitélio palatino, durante o processo de fechamento do palato, ao ativar uma via de sinalização para proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular. Sendo assim, pode promover a síntese da matriz extracelular e migração celular mesenquimal, garantindo a fusão do palato (TUFEKCI *et al.*, 2018). Inclusive, existem estudos de associação com relação de diferentes tipos de câncer, além de apresentar associação em casos de fissura lábio-palatina não síndrômica (LETRA *et al.*, 2012).

1 Camundongos com deficiência da proteína *TGFA* mostraram anomalias
2 oculares e pêlos anormais, porém não demonstraram anomalias dentárias. Por
3 outro lado, foi evidenciado por hibridação *in situ*, em fetos de camundongos, que
4 o TGF- α está presente não apenas na placenta, onde aparentemente está
5 localizado no compartimento fetal, mas também na cavidade bucal. Concluindo
6 que o gene *TGFA* se expressa durante o desenvolvimento craniofacial (WILCOX;
7 DERYNCK, 1988).

8 Os genes *IRF6* e *TGFA* são expressos na mandíbula humana com seis
9 semanas de gestação e o gene *IRF6* é expresso na lâmina dentária humana com
10 oito semanas e meia de gestação (VIEIRA *et al.*, 2007).

11

2. OBJETIVO

Análise de associação genética de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes *IRF6* e *TGFA* e possíveis fatores ambientais, na suscetibilidade ou resistência da hipomineralização molar-incisivo, em crianças de seis a 10 anos de idade residentes em Curitiba.

Objetivos específicos

Analisar potenciais fatores proximais, distais e intermediários que podem estar associados ao acometimento da doença durante o período gestacional da mãe, puerpério, e alterações de zero a três anos da criança por meio de questionário previamente aplicado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná: PARECER 1.971.986.

A pesquisa caracterizou-se como estudo observacional, longitudinal, descritivo-analítico com abordagem quantitativa. O cálculo amostral foi realizado a partir do número de crianças matriculadas em diferentes escolas municipais de Curitiba (85 mil crianças) e a prevalência utilizada nesta pesquisa foi de 12,3%, de acordo com o número de casos de HMI em Araraquara/São Paulo (JEREMIAS, 2010). A utilização da porcentagem referida é justificada pela inexistência de estudos de prevalência na cidade de Curitiba, no início da coleta de dados. O desenho amostral prevê margem de erro de 6.35% e intervalo de confiança de 95%.

3.1 Estratégia de recrutamento e coleta de dados

A amostra populacional foi constituída por indivíduos afetados e não afetados por HMI, matriculados em Escolas Municipais localizadas em Curitiba, no ano de 2018. A amostra foi planejada para 100 casos e 100 controles, apresentando faixa etária entre seis a 10 anos, sendo 108 do sexo feminino e 92 do sexo masculino, escolhidos aleatoriamente. Previamente foi realizada coleta de saliva para análise genômica e realizado questionário abordando possíveis fatores proximais, intermediários e distais (SOUZA, 2019).

A calibração para determinar o fenótipo de HMI foi realizada por uma especialista em odontopediatria por meio de fotos, através dos critérios estabelecidos pela pesquisadora Aghareed Ghanim, em 2017. Portanto, para serem incluídas no grupo caso, as crianças apresentavam um ou mais dentes

(incisivo ou primeiro molar permanente) com uma pontuação de 2 a 5 baseado nos critérios do manual da autora (GHANIM *et al.*, 2017).

O diagnóstico do grupo controle foi realizado através de calibração, por meio de banco de dentes extraídos, a partir dos critérios estabelecidos pelo Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS, do inglês *International Caries Detection and Assessment System*). Todos os dentes possuindo score de 0 a 2 do ICDAS foram incluídos, porém para ser adicionado ao grupo controle todos os pacientes deviam possuir score entre 0 e 1.

A concordância intra-examinador foi efetuada um mês após a primeira avaliação para diagnóstico dos grupos caso e controle ($Kappa = 1$). Os exames clínicos foram realizados nas escolas, utilizando luz natural, espelho bucal e sonda exploratória quando necessário.

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório Experimental Multiusuário, localizado no Parque Tecnológico da PUCPR, por meio de um banco de dados já existente, e extração do DNA com células bucais seguindo protocolo de Trevilatto & Line, 2000 (TREVILATTO; LINE, 200AD). As amostras utilizadas foram estocadas em congeladores do laboratório. O congelamento é considerado o método mais comum para armazenar evidências de casos, amostras de referência e fragmentos de DNA correspondentes (CORRADINI *et al.*, 2019).

Posteriormente executou-se a genotipagem de nove marcadores genéticos do tipo tag SNP, que se refere à escolha de um subconjunto de SNPs representativos, determinada pelo desequilíbrio de ligação entre eles, que retrata informações suficientes para ser utilizada em estudos genômicos, com a

ausência da utilização do conjunto de SNPs total/completo. É necessário que esse conjunto seja pequeno para diminuir a sobrecarga dos ciclos de processamento de dados.

3.2 Diagnóstico da HMI

A HMI possui como diagnóstico diferencial principalmente a hipoplasia do esmalte, a fluorose, lesões de mancha branca e amelogenese imperfeita. No entanto, podem ser distinguidas pelo número de características clínicas únicas, a partir de um manual que cujo objetivo é auxiliar os pesquisadores no planejamento de estudos epidemiológicos dessa condição. O manual utilizado nesta pesquisa foi escrito pelas autoras Aghareed Ghanim, Mihiri Silva, Marlies E C Elfrink e outros (GHANIM *et al.*, 2017), com o intuito de capacitar a examinadora (T.C.) para a realização do exame clínico e diagnóstico correto da HMI.

O exame clínico foi conduzido pela mesma examinadora. Espátulas de madeira foram utilizadas para o afastamento das bochechas das crianças, os dentes foram secos com o auxílio de gaze, lanterna e espelho intra oral foram utilizados quando necessário. Após cada exame clínico uma Odontopediatra realizou os registros do exame clínico no Odontograma.

3.3 Critérios de inclusão

Indivíduos entre 6 a 10 anos cujos pais/responsáveis assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido.

Indivíduos que apresentavam HMI em dentes totalmente erupcionados em boca.

1 Indivíduos com *score* 0 e 1 *ICDAS*.

2 Indivíduos com *score* 2 à 5 a partir dos critérios estabelecidos por Ghanim, *et al*,
3 2017.

4

5 **3.4 Critérios de exclusão**

6 Indivíduos em tratamento ortodôntico.

7

8 **3.5 Coleta de material biológico**

9 Os indivíduos foram requisitados a bochechar durante 1 um minuto, 5ml
10 de solução autoclavada de glicose 3% e cuspir em um copo plástico descartável.
11 Em seguida, uma espátula de madeira foi utilizada para raspar a mucosa jugal
12 (Trevilato & Line, 2000). A saliva foi depositada em frascos de vidro/plástico
13 identificados e mantidos sob refrigeração para posterior transporte e
14 armazenamento a -20C°, em congeladores.

15

16 **3.6 Protocolo para extração e purificação do DNA de células bucais**

17 O protocolo de extração e purificação de DNA com células bucais foi
18 efetuado em etapas. Primeiramente, após a coleta de saliva com 5 ml de glicose
19 à 3% (a glicose possui função de lise celular), a amostra foi centrifugada a 2000
20 RPM, durante 10 minutos. Caso houvesse células suspensas, um novo ciclo de
21 centrifugação era realizado.

1 Após a centrifugação, as células e demais estruturas formaram um *pellet*
2 depositado no fundo do frasco. O sobrenadante (saliva e glicose à 3%) foi vertido
3 fora. Em seguida acrescentou-se 1300 µL de tampão de extração
4 (Tris(hidroximetil)aminometano [TRIS] 10mM, ácido etilenodiamino tetra-acético
5 [EDTA] 4mM, Solução de dodecilsulfato de sódio [SDS] 0,5% pH 7,76) em cada
6 frasco. Por fim, as amostras foram armazenadas em congelador (-20°C). O TRIS
7 vai manter o pH estável e o EDTA é um agente quelante de íon magnésio, cofator
8 de enzima que degrada DNA, evitando que as nucleases que estejam
9 contaminando a reação degradem a amostra.

10 Na segunda etapa as amostras foram descongeladas e acrescentados
11 10µL de proteinase K (em uma concentração de 20mg/mL), homogeneizando a
12 solução. Os frascos foram mantidos em banho-maria durante a noite (*overnight*)
13 a uma temperatura de 50°C, para otimização da enzima.

14 A terceira etapa ocorreu no dia seguinte da etapa anterior. O conteúdo de
15 cada frasco foi vertido em microtubos de centrifugação tipo *Eppendorf* de 2mL e
16 acrescentado 500µL de acetato de amônio (8M em 1mM EDTA), deixado
17 previamente em temperatura ambiente. Homogeneizou-se a solução em Vórtex
18 durante 5 minutos e em seguida, centrifugada por 16 minutos a uma velocidade
19 de 13000 RPM.

20 Após esse processo, o conteúdo líquido foi dividido igualmente em 2
21 microtubos *Eppendorf* de 1,5mL (cerca de 900µL em cada) e o *pellet* foi
22 desprezado.

23 Acrescentou-se 540µl de Isopropanol em cada microtubo e mais um ciclo
24 de centrifugação foi realizado por 7 minutos com 13000 RPM e o conteúdo

1 líquido foi descartado. Seguidamente foi pipetado 1mL de etanol 70% e
2 centrifugado por 7 minutos com 13000 RPM, descartando o conteúdo líquido.

3 Os tubos foram deixados para secar abertos em temperatura ambiente
4 por 4 horas e depois de totalmente secos foi adicionado 50µl de solução de
5 extração (TRIS 10mM; EDTA 1 mM; pH 7,76) em cada tubo, agitando
6 delicadamente para homogeneizar o DNA. Posteriormente à extração, as
7 amostras foram acondicionadas em geladeira durante dois dias e, após esse
8 tempo, congeladas em -20°C (TREVILATTO; LINE, 200AD) para futura
9 genotipagem.

10 A quantidade de DNA e a pureza de cada amostra foram determinadas
11 por espectrofotometria (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, US). A
12 concentração de DNA foi obtida por leituras a 260 nm. Para estimar a pureza, a
13 proporção usada foi 260 nm / 280 nm.

14

15

16

3.7 Seleção de marcadores

As variantes escolhidas para a pesquisa foram selecionadas com base no International HapMap Project, ao delinear os dados sobre desequilíbrio de ligação entre os marcadores pretendidos, localização dos genes e possível função.

O gene *IRF6* foi escolhido devido comprovação de sua presença no processo da odontogênese de camundongos pela técnica de hibridização *in situ*, que revelou expressão do gene na lâmina dentária na 8ª semana de vida intrauterina (LAUGEL-HAUSHALTER *et al.*, 2012).

O gene *TGFA* também foi eleito para genotipagem devido estudo que sugeriu interação dos genes *IRF6* e *TGFA* na formação da fenda lábio-palatina (LETRA *et al.*, 2012) e estudos anteriores que evidenciaram essa interação em agenesia dentária (VIEIRA *et al.*, 2004, 2007).

Portanto, a escolha dos marcadores foi proveniente de estudos anteriores, sendo cinco SNP do gene *IRF6*, que está localizado no braço longo do cromossomo 1 e cuja função é a codificação de proteína 1) rs2235371 (variante da sequência de codificação; variante *missense*), 2) rs2013162 (variante da sequência de codificação; variante sinônima), 3) rs861019 (variante intrônica), 4) rs2073487 (variante intrônica), 5) rs642961 (variante de região regulatória) e quatro SNP de *TGFA*, que está localizado no braço curto do cromossomo 2 e cuja função é a codificação de proteína 1) rs2166975 (variante da sequência de codificação; variante sinônima), 2) rs930655 (variante intrônica), 3) rs1523305 (variante intrônica), rs2902345 (variante intrônica) selecionados para a pesquisa (Figura 5).

Figura 5: Localização, função, frequências dos marcadores propostos para a análise genética:

Marcador		Localização	Consequência funcional	Frequência alélica	Frequência genotípica
IRF6	rs2235371	Cromossomo 209,790,685-209,790,785	variante <i>missense</i>	C: 87% T: 13%	CC: 78% CT: 17% TT: 5%
	rs2013162	Cromossomo 1: 209,795,289-209,795,389	variante sinônima	C: 60% A: 40%	CC: 37% AC: 46% AA: 17%
	rs861019	Cromossomo 1: 209,801,991-209,802,091	variante intrônica	A: 61% G: 39%	AA: 40% AG: 43% GG: 17%
	rs2073487	Cromossomo 1: 209,803,251-209,803,351	variante intrônica	T: 60% C: 40%	TT: 37% CT: 46% CC: 17%
	rs642961	Cromossomo 1: 209,815,875-209,815,975	variante de região regulatória	A: 18% G: 82%	AA: 3% AG: 29% GG: 68%
TGFA	rs2166975	Cromossomo 2: 70,450,812-70,450,912	variante sinônima	G: 79% A: 21%	GG: 62% AG: 34% AA: 4%
	rs930655	Cromossomo 2: 70,457,269-70,457,369	variante intrônica	A: 34% G: 66%	AA: 13% AG: 41% GG: 46%
	rs1523305	Cromossomo 2: 70,471,674-70,471,774	variante intrônica	C: 46% T: 54%	CC: 22% CT: 48% TT: 30%
	rs2902345	Cromossomo 2: 70,489,417-70,489,517	variante intrônica	T: 40% C: 60%	TT: 17% CT: 46% CC: 37%

Fonte: Dados obtidos através da plataforma Ensembl Genome Browser 103. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas da Fase 3 do *Projeto 1000 Genomes* - a partir de amostras de população Africana, Americana, Leste e Sul Asiáticas e Europeia.

As reações de qPCR foram repetidas duas vezes quando necessário e as frequências alélicas foram calculadas.

Para cada tag SNP foram avaliados os modelos aditivo, dominante e recessivo. Para o modelo de dominância considerando o alelo Y e Z foi testada a hipótese de que os genótipos YY e YZ estão associados com o aumento ou diminuição do risco em comparação com o genótipo ZZ (modelo de dominância para o alelo Y); ZZ e ZY estão associados com o aumento ou diminuição do risco em comparação com o genótipo YY (modelo de dominância para o alelo Z).

3.8 Análise estatística

Foram realizadas análises de desequilíbrio de ligação e blocos de haplótipos a partir do software Haploview 4.2, método ideal para a pesquisa (BARRETT *et al.*, 2005). Em um primeiro momento o software IBM SPSS® 25 foi utilizado para realização dos testes χ^2 (qui-quadrado), exato de Fisher e t de Student a fim de comparar frequências das variáveis biológicas e ambientais e

1 testar desvios nas distribuições de alelos e genótipos entre os grupos. Para a
2 análise multivariada, os modelos de regressão logística binária foram realizados
3 e ajustados para analisar as frequências genotípicas, incluindo variáveis com
4 valor de $p \leq 0,20$.

5 Os SNP em todas as amostras foram testados quanto ao desvio do
6 equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir do teste qui-quadrado. Razões de chances
7 e intervalos de confiança de 95% foram calculados. Para explicar os testes
8 múltiplos, a correção de Bonferroni foi realizada e valores de p de 0,001 (0,05 /
9 36) ou abaixo foram considerados significativos.

10

11

4. RESULTADOS

Dos 200 pacientes, 54% (108) eram do sexo feminino e 46% (92) do sexo masculino. Em relação a raça/cor, 70,2% (134) eram brancos, 17,8% (34) pardos, 9,4% (18) morenos e 2,6% (5) negros, e 4,5% (9) casos omissos. A idade variou de 6 a 10 anos. A variável parto normal apresentou 48,7% (96) do total, e cesariana 51,3% (101), e 1,5 (3) casos omissos. Os nascimentos prematuros representaram 7,8% (15) da amostra, e 4,0 (8) casos omissos.

As perguntas do questionário foram aplicadas previamente e embasadas nos possíveis fatores etiológicos da HMI presentes na literatura. Fatores biológicos e ambientais foram investigados, sendo eles: dados da criança sobre cor/etnia, idade, sexo, peso ao nascer, comprimento ao nascer, prematuridade, infecção respiratória, doença celíaca, otite, infecção do trato urinário, asma, febre alta, exposição à fumaça do cigarro pela mãe e exposição à fumaça do cigarro por pessoas de convívio. Dados da mãe: tipo de parto, primeiro filho, condições socioeconômicas da família, alterações durante a gestação febre alta, diabetes, pressão alta, uso de medicamentos, exposição à fumaça do cigarro e mãe fumante, frequência da ingestão de álcool durante a gestação.

A condição socioeconômica familiar de até 1 salário mínimo representou 26,4% (51), destes, 54,9% (28) no grupo caso. Até 2 salários mínimos 39,4% (76), destes, 51,3% (39) no grupo caso. Até 3 salários mínimos 22,3% (43), destes, 44,2% (19) no grupo caso. Até 4 salários mínimos 11,3% (11), destes, 50% no grupo caso. Os casos omissos representaram 3,5% (7).

No grupo caso, as alterações durante a gestação corresponderam à: 60% (6) febre alta, 58,3% (7) mãe fumante, 57,4% (8) exposição a fumaça do cigarro

1 de outros fumantes, 50% (2) uso de medicamentos, 37,5% (3) diabetes, 46,2%
2 (6) pressão alta, 52,3% (23) ingestão de álcool mensalmente ou menos, 45%
3 (54) sem ingestão de álcool e 49,6% (58) sem alteração. As alterações
4 observadas na criança apresentaram: 43,5% (27) infecção respiratória, 31,8%
5 (7) otite, 38,1% (8) infecção do trato urinário, 48,1% (13) asma, 46% (52) febre
6 alta, 62,5% doença celíaca (5), 55% (11) exposição a fumaça do cigarro da mãe.
7 Todos apresentando casos omissos. **(Tabela 1).**

8

9

1 **Tabela 1.** Análise estatística de variáveis proximais, distais e intermediárias nos
2 grupos caso e controle:

Alterações durante a gestação	Caso	Controle
Febre alta	6	4
Diabetes	3	5
Pressão alta	6	7
Uso de medicamentos	2	2
Exposição a fumaça do cigarro	8	6
Mãe fumante	7	5
Outros	0	1
Sem alteração	58	59
Total	100	99

Valor de p 0,62

Ingestão de álcool durante a gestação		
Nunca	54	66
Mensalmente ou menos	23	21
De 2 a 3 vezes por semana	1	0
Total	77	88

Valor de p 0,45

Infecção respiratória		
Sim	27	35
Não	72	65
Total	99	10

Valor de p 0,23

Doença celíaca		
Sim	5	3
Não	90	92
Total	95	95

Valor de p 0,47

Exposição a fumaça do cigarro de outros fumantes		
Sim	27	20
Não	72	77
Total	99	97

Valor de p 0,27

Exposição a fumaça do cigarro da mãe		
Sim	11	9
Não	89	89
Total	100	98

Valor de p 0,67

Otite		
Sim	7	15
Não	88	84
Total	95	99

Valor de p 0,08

Infecção do trato urinário		
Sim	8	13
Não	92	85
Total	100	98

Valor de p 0,22

Sexo	Caso	Controle
Feminino	46	62
Masculino	54	38
Total	100	100

Valor de p = 0,023

Cor		
Negro	2	3
Pardo	21	13
Moreno	6	12
Branco	68	66
Total	97	94

Valor de p 0,25

Nascimento		
Parto cesáreo	50	51
Parto normal	47	49
Total	97	100

Valor de p 0,93

Prematuridade		
Sim	7	8
Não	89	88
Total	96	96

Valor de p 0,78

Primeiro filho		
Sim	44	42
Não	55	57
Total	99	99

Valor de p 0,77

Condição socioeconomica familiar		
Até 1 salário mínimo	28	23
Até 2 salários mínimos	39	37
Até 3 salários mínimos	19	24
Até 4 salários mínimos	11	11
5 ou mais salários mínimos	0	1
Total	97	96

Valor de p 0,7

Asma		
Sim	13	14
Não	87	84
Total	100	98

Valor de p 0,79

Febre		
Sim	52	61
Não	47	37
Total	99	98

Valor de p 0,16

Fonte: dados do trabalho.

Um total de 200 amostras de saliva foram amplificadas através da técnica de qPCR. O sistema utilizado foi QuantStudio™ da marca Applied Biosystems. Para cada amostra de DNA (1,0 uL) foi adicionado 0,3uL de marcador + 3,7uL de água ultrapura Milli-Q® + 5,0 de primers e TaqMan master mix.

Após análise genotípica dos tag SNPs no modelo aditivo para os grupos caso e controle, considerando ($p \leq 0,2$) na análise bivariada, foram obtidos os seguintes resultados para o gene *IRF6* rs2235371 ($p=0,157$), rs2013162 ($p=0,090$), rs861019 ($p=0,536$), rs2073487 ($p=0,358$) e rs642961 ($p=0,850$) e para o gene *TGFA* rs2166975 ($p=0,954$), rs930655 ($p=0,288$), rs1523305 ($p=0,903$) e rs2902345 ($p=0,421$).

As análises genotípicas nos modelos dominante e recessivo para o gene *IRF6* (**Tabela 2**) e para o gene *TGFA* (**Tabela 3**) também foram realizadas.

Os resultados dos marcadores do gene *IRF6* no modelo aditivo: rs2235371 ($p=0,157$), rs2013162 ($p=0,090$) e do marcador do gene *TGFA* no modelo recessivo: rs930655 ($p=0,115$) foram obtidos na análise bivariada.

Após a análise multivariada, considerando ($p \leq 0,05$), a variável sexo feminino permaneceu estatisticamente significativa OR = 0,52, 95% CL = 0,29-0,91, $p = 0,024$.

19

20

Tabela 2. Análise genotípica nos modelos dominante e recessivo dos tag SNPs do gene *IRF6*:

GENE <i>IRF6</i>	Modelo	Amostra	Genótipo		Valor de <i>p</i>
SNP			CC	TT + CT	
rs2235371	Efeito Dominante T	Caso	61	25	0,073
		Controle	63	13	
	Efeito Recessivo T	Caso	1	85	0,346
		Controle	0	76	
rs2013162	Efeito Dominante A	Caso	21	74	0,029
		Controle	35	61	
	Efeito Recessivo A	Caso	12	83	0,803
		Controle	11	85	
rs861019	Efeito Dominante A	Caso	11	72	0,470
		Controle	15	72	
	Efeito Recessivo A	Caso	31	52	0,303
		Controle	26	61	
rs2073487	Efeito Dominante C	Caso	28	62	0,227
		Controle	38	58	
	Efeito Recessivo C	Caso	20	70	0,250
		Controle	15	81	
rs642961	Efeito Dominante A	Caso	64	31	0,572
		Controle	69	28	
	Efeito Recessivo A	Caso	8	87	0,756
		Controle	7	90	

Tabela 3. Análise genotípica nos modelos dominante e recessivo dos tag SNPs do gene *TGFA*:

GENE TGFA	Modelo	Amostra	Genótipo		Valor de <i>p</i>
SNP			AA	GG + AG	
rs2166975	Efeito Dominante G	Caso	73	26	0,783
		Controle	72	28	
	Efeito Recessivo G	Caso	7	92	0,804
		Controle	8	92	
rs930655	Efeito Dominante A	Caso	32	65	0,683
		Controle	34	61	
	Efeito Recessivo A	Caso	18	79	0,115
		Controle	10	85	
rs1523305	Efeito Dominante C	Caso	24	60	0,227
		Controle	28	64	
	Efeito Recessivo C	Caso	52	32	0,664
		Controle	54	38	
rs2902345	Efeito Dominante C	Caso	19	59	0,686
		Controle	22	59	
	Efeito Recessivo C	Caso	52	26	0,261
		Controle	47	34	

1 Os genes propostos neste estudo não demonstraram associação
2 estatisticamente significativa, em relação ao desenvolvimento da HMI, após
3 análise genotípica dos tag SNPs nos modelos aditivo, dominante e recessivo. O
4 risco associado aos alelos individuais ou genótipos foi calculado através de *odds*
5 *ratio* (OR) com intervalos de confiança (CI) de 95%.

6 As variáveis distais e intermediárias, similarmente, não obtiveram
7 resultados estatisticamente significantes nesta amostra.

8

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, após realizar análise de associação genética de SNP dos genes *IRF6* e *TGFA*, e investigar fatores de risco que podem contribuir para a suscetibilidade ou resistência da HMI, houve associação estatisticamente significativa para o acometimento de HMI em pacientes do sexo feminino ($p=0,024$).

A hipótese desta pesquisa foi sustentada pelo debate atual sobre a etiologia multifatorial da HMI, devido as possíveis interações de mais de um gene e o meio ambiente (VIEIRA; MANTON, 2019; JEREMIAS *et al.*, 2021). Essa hipótese também considerou a escolha dos genes devido interação do *IRF6* e *TGFA*, constatado no desenvolvimento de fissura lábio-palatina (FLP), a partir de estudo genético de associação caso-controle com 1000 indivíduos e em conjuntos de dados familiares com diferentes coortes disponíveis, que incluiu também análises imuno-histoquímica em camundongos (LETRA *et al.*, 2012). Evidenciou-se, em estudos científicos, que os defeitos da HMI e fenda palatina/labial isolada aparentemente podem estar geneticamente interligados. A associação do SNP rs622260 do gene *NCAPD3* com HMI isolada e quando combinada com indivíduos portadores de fissura labiopalatina (FLP) isolada foi observada (KORUYUCU *et al.*, 2018).

Além disso, esta hipótese abrangeu a fundamentação dos estudos de associação dos genes com alterações dentárias (CALLAHAN *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2004; WALSHAW *et al.*, 2020). Os resultados associados a expressão gênica sugerem que as interações entre *IRF6* e *TGFA* ou a expressão alterada dessas combinações de genes podem levar à agenesia dentária em humanos (VIEIRA *et al.*, 2007), uma vez que, a agenesia dentária é comumente

1 encontrada em portadores de FLP isolada. Em estudo observacional
2 prospectivo, que levantou questões sobre a etiologia da HMI, a partir de
3 avaliações de radiografias panorâmicas de 101 pacientes com idade entre 6 a
4 15 anos revelou uma alta prevalência de anomalias dentárias, com destaque
5 para hipodontia em crianças afetadas por HMI. Ou seja, do total dos
6 participantes, 29% possuíam outra anomalia dentária diferente da HMI já
7 existente, e além disso houve uma maior prevalência estatisticamente
8 significativa de hipodontia em pacientes do sexo feminino (16,1%) quando
9 comparada com o sexo masculino (2,6%) (WALSHAW *et al.*, 2020). Portanto, é
10 possível considerar uma provável associação da presença de HMI e da fissura
11 lábio-palatina, e/ou outras anomalias dentárias, como fatores a serem
12 investigados na etiologia da doença em futuros estudos genéticos, associados
13 com fatores de risco intermediários e distais.

14 Nesta pesquisa houve uma predileção da HMI por pacientes do sexo
15 feminino (54%), com prevalência estatisticamente significativa OR = 0,52, 95%
16 CL = 0,29-0,91, p = 0,024. Corroborando com estudo que exibiu 1.5 vezes mais
17 chances da HMI afetar mais pacientes do sexo feminino do que o sexo masculino
18 (JEREMIAS *et al.*, 2013)

19 Por outro lado, dados revelaram chances mais elevadas de acometimento
20 de HMI entre o gênero masculino em comparação com o gênero feminino
21 (WOGELIUS; HANSEN VIUFF; HAUBEK, 2020). Todavia, diferentes estudos
22 apontam não existir qualquer predileção de gênero para HMI (COSTA-SILVA *et al.*, 2010; FATTURI *et al.*, 2020; GARCIA-MARGARIT *et al.*, 2014; HOČEVAR *et al.*, 2020; IRIGOYEN-CAMACHO *et al.*, 2020; JASULAITYTE *et al.* 2007; JÚNIOR *et al.*, 2015; KILINÇ *et al.*, 2019; RAI *et al.*, 2019; SCHWENDICKE *et al.*, 2018; ABDALLA; ABUAFFAN; KEMOLI, 2021), tampouco os gêneros diferiram quanto
27 à presença de lesões nos incisivos (GŁÓDKOWSKA; EMERICH, 2021).

1 Alguns autores avaliaram a HMI e possíveis associações genéticas. Um
2 estudo de associação genética familiar demonstrou um resultado positivo entre
3 genes envolvidos na amelogênese e suscetibilidade para o desenvolvimento de
4 HMI, observadas em variações dos genes *AMELX*; *ENAM*; *AMBN*; *FAM83H*;
5 *BMP2*; *BMP7*; *BMP4* ; *MMP20*; *DLX3*; *FGFR1* (MARIA *et al.*, 2016). Importante
6 ressaltar que alguns desses genes demonstraram associação com o
7 desenvolvimento de FLP, como *BMP4* e *FGFR1*, e que foi possível inferir
8 associação de *MMP20* em famílias brasileiras (KÜCHLER *et al.*, 2011). Outro
9 resultado atual, que analisou a variante rs2245803 do gene *MMP20*, a atribuiu a
10 uma maior probabilidade de desenvolvimento da doença HMI (HOČEVAR *et al.*,
11 2020).

12 De acordo com artigo que apresentou os resultados das análises
13 realizadas nesta dissertação (BEZAMAT *et al.*, 2021), em conjunto com análises
14 similares de estudos observacionais de populações de outras regiões, foi
15 evidenciado que a associação encontrada em uma população da Turquia diferiu
16 dos resultados obtidos no Brasil, o que de fato indica que os fatores genéticos
17 que contribuem para o fenótipo de HMI podem variar dependendo da área
18 geográfica. Nesta pesquisa, a população total consistiu em 1065 indivíduos de
19 quatro grupos, incluindo grupos de Curitiba/Brasil, Rio de Janeiro/Brasil e
20 Istambul/Turquia, a partir de estudo de associação dos genes *IRF6* e *TGFA*.
21 Além disso, foi identificada potencial interação do marcador rs930655 do gene
22 *TGFA* com todos os marcadores testados no grupo da Turquia e não
23 identificadas interações no restante dos grupos. Sendo assim, o trabalho relata
24 evidências de interações gene-gene (*IRF6-TGFA*) e gene-ambiente (*IRF6*-
25 medicamentos ingeridos e *TGFA*-medicamentos ingeridos), o que sustenta a
26 hipótese de que a HMI é uma condição genética complexa. Ademais, nenhum

1 dos genes pode ser considerado, por si só, com uma função importante sobre o
2 aparecimento da doença, e associações encontradas entre HMI e uso de
3 medicamentos até os três anos de idade também foram encontradas (BEZAMAT
4 *et al.*, 2021), ressaltando a importância de fatores proximais, intermediários e
5 distais na investigação etiológica.

6 Em pesquisa transversal (TEIXEIRA *et al.*, 2017), cuja população incluiu
7 gêmeos com idade variando entre 8 e 15 anos, houve uma maior concordância
8 de diagnóstico de HMI entre pares de gêmeos monozigóticos comparado com
9 gêmeos dizigóticos, o que sugere uma influência genética nessa condição, uma
10 vez que gêmeos monozigóticos compartilham 100% do mesmo genoma. No
11 entanto, variáveis ambientais como renda familiar e a ocorrência de
12 sangramento durante o parto também foram associadas ao desenvolvimento de
13 HMI, indicando uma comprovação de doença multifatorial e relevância científica
14 na área, uma vez que estudos genéticos com gêmeos podem demonstrar as
15 influências na variação fenotípica, através dos similares genótipos e ambientes,
16 bem como a possível interação entre eles.

17 A possível influência no desenvolvimento de HMI associada a SNP no
18 gene *VDR* (receptor de vitamina D) foi retratada em casos mais graves da
19 condição. Além de apresentar um resultado importante, que revela que crianças
20 com HMI apresentaram maior prevalência de doença cárie do que crianças que
21 não apresentam este DDE (FATTURI *et al.*, 2020).

22 A limitação deste estudo incluiu o possível viés de recordação da
23 mãe/responsável sobre as alterações locais e sistêmicas que acometeram as
24 crianças, além de uma perda amostral, que consistiu na impossibilidade de
25 amplificação de algumas amostras.

1 Através do levantamento teórico realizado nesta pesquisa, conclui-se que
2 os estudos de associação genética do tipo caso-controle cresceram vastamente
3 no campo da epidemiologia molecular, principalmente no âmbito da investigação
4 de polimorfismos genéticos, com foco na probabilidade da interação genética e
5 meio ambiente (RÊGO, 2010).

6 No que se refere a coleta das amostras para a realização do ensaio, a
7 saliva permanece como um dos principais determinantes da saúde bucal, e os
8 componentes salivares exercem pressões seletivas significativas na microbiota.
9 Além disso, este material consiste em uma variedade de moléculas,
10 glicoproteínas e proteínas, com funcionalidade e estruturas complexas (MARSH
11 *et al.*, 2016), incluindo função de limpeza, proteção da boca, e digestão.
12 Secretada pelas glândulas salivares, a saliva é reconhecida por possuir um
13 conjunto de marcadores biológicos e pode ser utilizada no diagnóstico precoce
14 de doenças, como doença periodontal, doença cárie, câncer, diabetes e outros
15 distúrbios sistêmicos (ZHANG *et al.*, 2016).

16 Este material, que se caracteriza como uma fonte de coleta não invasiva,
17 pode substituir o sangue no diagnóstico de doenças, e seus biomarcadores
18 podem variar de alterações nos índices bioquímicos de DNA, RNA e proteínas,
19 a diversificação de estruturas da microbiota (ZHANG *et al.*, 2016).

20 Através dos resultados obtidos não foi possível inferir que os genes
21 *IRF6/TGFA* estão associados com a HMI na população estudada, porém um
22 achado revelou maior prevalência do acometimento da HMI em mulheres.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho não foi encontrada associação estatisticamente significativa para os marcadores selecionados dos genes *IRF6* e *TGFA*, todavia, foi constatada maior prevalência do sexo feminino no acometimento da HMI, nesta população estudada.

Sendo assim, trabalhos futuros, com diferentes populações em pesquisas de análise de associação e outros desenhos de estudo são necessários para investigar mais detalhadamente os fatores que podem influenciar no desenvolvimento da HMI, considerando que fatores dos níveis proximal, intermediário e distal que atuam durante a formação do esmalte dentário podem alterar a expressão das proteínas que são codificadas pelos genes.

7. ARTIGO

Bezamat, M., Souza, J. F., Silva, F. M., Corrêa, E. G., Fatturi, A. L., Brancher, J. A., ... & Vieira, A. R. (2021). Gene-environment interaction in molar-incisor hypomineralization. *Plos one*, 16(1), e0241898.

Gene-environment interaction in molar- incisor hypomineralization

Mariana Bezamat¹, Juliana F. Souza², Fernanda M.F. Silva³, Emilly G. Corrêa⁴, Aluhe L. Fatturi², João A. Brancher⁵, Flávia M. Carvalho⁶, Tayla Cavallari⁴, Laís Bertolazo⁴, Cleber M. Souza⁷, Mine Koruyucu⁸, Merve Bayram⁹, Andrea Racic¹, Benjamin M. Harrison¹, Yan Yan Sweat¹⁰, Ariadne Letra¹¹, Deborah Studen-Pavlovich¹², Figen Seymen⁸, Brad Amendt¹⁰, Renata I. Werneck⁴, Marcelo C. Costa³, Adriana Modesto¹², Alexandre R. Vieira¹

1 Department of Oral Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, **2** Department of Stomatology, Federal University of Paraná, Curitiba, State of Paraná, Brazil, **3** Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Graduate Program of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, State of Paraná, Brazil, **5** Graduate Program of Dentistry, Positivo University, Curitiba, State of Paraná, Brazil, **6** Department of Genetics, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **7** Graduate Program of Applied Biotechnology to Child and Adolescent Health, Pequeno Príncipe College, Curitiba, State of Paraná, Brazil, **8** Department of Pedodontics, Istanbul University, Istanbul, Turkey, **9** Department of Pedodontics, Medipol Istanbul University, Istanbul, Turkey, **10** Craniofacial Anomalies Research Center and Department of Orthodontics, College of

Dentistry, The University of Iowa, Iowa City, Iowa, United States of America, **11**
Department of Diagnostic and Biomedical Sciences, and Center for Craniofacial
Research, UTHealth School of Dentistry at Houston, Houston, Texas, United
States of America, **12** Department of Pediatric Dentistry, University of Pittsburgh,
Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America.

Declaration of Interests: The authors certify that they have no conflict of
interests

Keywords: Genetic Association Study; Dental Enamel; Amelogenesis

Abstract

Molar incisor hypomineralization (MIH) is an enamel condition characterized by lesions ranging in color from white to brown which present rapid caries progression, and mainly affects permanent first molars and incisors. These enamel defects usually occur when there are disturbances during the mineralization or maturation stage of amelogenesis. Both genetic and environmental factors have been suggested to play roles in MIH's development, but no conclusive risk factors have shown the source of the disease. During head and neck development, the interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene is involved in the structure formation of the oral and maxillofacial regions, and the transforming growth factor alpha (*TGFA*) is an essential cell regulator, acting during proliferation, differentiation, migration and apoptosis. In this present study, it was hypothesized that these genes interact and contribute to predisposition of MIH. Environmental factors affecting children that were 3 years of age or older were also hypothesized to play a role in the disease etiology. Those factors included respiratory issues, malnutrition, food intolerance, infection of any sort and

medication intake. A total of 1,065 salivary samples from four different cohorts were obtained, and DNA was extracted from each sample and genotyped for nine different single nucleotide polymorphisms. Association tests and logistic regression implemented in PLINK were used for analyses. A potential interaction between *TGFA* rs930655 with all markers tested in the cohort from Turkey was identified. These interactions were not identified in the remaining cohorts. Associations ($p < 0.05$) between the use of medication after three years of age and MIH were also found, suggesting that conditions acquired at the age children start to socialize might contribute to the development of MIH.

Introduction

The hardest biological material in the human body is tooth enamel, composed of both mineral and organic phases [1]. Disturbances during amelogenesis impact maturation or mineralization stages, and can lead to defects in enamel translucence, known as enamel hypomineralization [2]. Molar-incisor hypomineralization (MIH) is an example of an enamel condition, and is characterized by the appearance of lesions ranging from white to brownish coloration which present rapid caries progression and hypersensitivity [3]. These asymmetrical lesions affect the first permanent molars, usually with the permanent incisors [4], and more recently MIH has been reported to affect canines too [5]. Prevalence of MIH varies but has been consistently reported to range between 1% and 35% in all parts of the world, with most reported frequencies around 12% [6–22].

Regarding the timing of these lesions' appearance, reports have shown a variation in the chronology of crown completion and enamel formation of incisors

1 and molars. Gleiser and Hunt documented crown completion of first permanent
2 molars to be between 2.5 and 4.4 years [23]. Boyde reported the chronological
3 age of enamel completion in the upper central incisor as 4.64 years and Reid
4 documented complete crown formation in lower central incisors to be at 3.8 years
5 [24].

6 The enamel maturation stage is particularly important for tissue development,
7 and a very sensitive stage in terms of hypomineralized enamel dysplasia [25].

8 Different systematic reviews concluded that most of the previously studied
9 environmental factors that were believed to be risk factors for MIH did not fully
10 explain the disease etiology [5, 26, 27]. In contrast, etiological factors associated
11 with enamel forming genes [2, 28] or in immune response-related genes [28, 29]
12 have been reported to play a role in the condition's onset.

13 Over the past few years, our group has focused on studying different
14 phenotypes that may be present in the same individuals with the hypothesis that
15 they may be influenced by the same underlying genetic variation [30]. Conditions
16 such as cleft lip and palate, have shown an increased frequency of abnormal
17 tooth sizes and morphology [31]. Furthermore, this work has shown that the
18 frequency of dental anomalies as a consequence of disturbances in dental
19 development was much higher in individuals born with clefts, indicating that
20 dental phenotypes should be considered an extended phenotype of oral clefts
21 [32]. Later, it was also shown that *IRF6* and *TGFA* interaction might contribute to
22 oral clefts [33], and that genetic associations for MIH can be identified when
23 studied in combination with cleft lip and palate [34]. *IRF6* is a gene involved in
24 the structure formation of the oral and maxillofacial regions and has been
25 documented as responsible for not only influence amelogenesis, but also play a
26 role in root and crown anomalies of first molars in mice [35]. This same study

showed that *IRF6* conditional knockout mouse presented reduced enamel density preeruption and delayed enamel formation [35]. *TGFA* on the other hand, is an essential cell regulator, acting during proliferation, differentiation, migration and apoptosis. *TGFA* has also been associated with orofacial clefts [36], and a previous study using the case-parent trio design raised the possibility that *IRF6* and *TGFA* interact and lead to orofacial clefts [37], supporting the finding from our group [33].

8

Table 1. Breakdown of populations used in the study.

Population	Total Sample	MIH Affected	MIH Unaffected	Sex	
				Male	Female
Curitiba (Federal University of Paraná, Brazil)	356	87	269	187	169
Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil)	200	100	100	92	108
Rio de Janeiro, Brazil	174	78	96	101	73
Istanbul, Turkey	355	163	172	171	164
Total	1,065	428	637	551	514

9

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241898.t001>

In light of the aforementioned evidence, it was hypothesized that *IRF6* and *TGFA* interact and contribute to predisposition of MIH. Additionally, it was hypothesized that environmental factors affecting children that were 3 years of age or older could play a role in the etiology of the disease. Those factors included the presence of any respiratory issues, malnutrition, any type of food intolerance, infection of any sort, and the use of any type of medication.

16

Results

One thousand and sixty-five individuals from both Brazilian and Turkish cohorts were analyzed. All four cohorts are described in detail in the (S1–S4 Files) and a breakdown of the populations included in the study is described in Table 1. All markers were in Hardy-Weinberg equilibrium (PLINK threshold p-value below

0.001), with the exception of rs930655 in the sample from Curitiba (Federal University of Paraná), that was excluded from further analysis (Table 2). It was also excluded rs2073487, rs642961 and rs2902345 in the sample from Rio de Janeiro, and rs1523305 and rs2902345 in the sample from Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná). The numbers in bold in Table 2 highlight the distribution of the genotypes deviating from Hardy-Weinberg equilibrium.

Single marker analysis

No significant associations between the selected SNPs and MIH were detected in the study populations.

Gene-gene interaction analyses

The cohort from Rio de Janeiro showed a trend toward statistical evidence of interaction between *TGFA* rs1523305 and *IRF6* rs642961 ($p = 0.03$, OR = 1.77) and between *IRF6* rs2073487 and *TGFA* rs2902345 ($p = 0.04$, OR = 1.60). Significant results ($p < 0.0004$) were found for the cohort from Istanbul between *TGFA* rs930655 and all *IRF6* markers (Table 3).

Gene expression analysis

It was investigated the localization of *Tgfa* and *Irf6* in wild type mice at critical stages of dental development. It was observed expression of *Irf6* in ameloblasts, apparently more membranebound than cytoplasmic or nuclear, whereas expression of *Tgfa* was not observed (Fig 1).

1 Environmental factors

Table 2. Characteristics of the selected variants and genotyping frequencies.

Gene	SNP marker	Base change	Consequence	Population	Genotyping Calls	
					MIH Affected	MIH Unaffected
IRF6	rs2073487	T>C	Intron variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	14/40/32	52/118/88
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	20/43/28	15/42/38
				Rio de Janeiro	5/6/55	11/11/56
				Istanbul	15/56/75	21/70/80
	rs2013162	A>C	Synonymous variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	16/41/29	51/121/88
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	12/63/21	11/49/35
				Rio de Janeiro	4/14/33	2/10/50
				Istanbul	16/54/73	23/68/81
	rs17015215	C>T	Missense variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	0/21/62	5/38/209
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	Not genotyped	
				Rio de Janeiro	6/18/30	5/33/24
				Istanbul	2/3/130	1/7/144
	rs861019	A>G	Intron variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	15/37/35	41/120/97
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	11/42/31	11/49/26
				Rio de Janeiro	9/35/13	10/33/15
				Istanbul	34/70/42	38/69/42
	rs642961	A>G	None	Curitiba (Federal University of Paraná)	4/21/61	7/70/184
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	8/23/65	7/21/68
				Rio de Janeiro	3/39/31	2/53/33
				Istanbul	5/43/99	5/36/105
TGFA	rs2902345	T>C	Intron variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	10/42/30	59/102/90
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	20/7/52	21/12/47
				Rio de Janeiro	19/15/36	11/19/45
				Istanbul	42/62/47	38/60/54
	rs2166975	G>A	Synonymous variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	2/29/56	20/72/164
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	7/19/74	8/20/71
				Rio de Janeiro	Not genotyped	
				Istanbul	9/38/98	7/62/98
	rs1523305	C>T	Intron variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	13/51/22	66/106/86
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	24/8/53	28/10/53
				Rio de Janeiro	9/21/35	7/22/61
				Istanbul	43/57/43	40/62/46
	rs930655	A>G	Intron variant	Curitiba (Federal University of Paraná)	11/31/44	61/60/136
				Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná)	18/48/32	10/50/34
				Rio de Janeiro	Not genotyped	
				Istanbul	9/39/98	9/54/82

Bold indicates figures deviating from Hardy-Weinberg.

Associations were identified between MIH and any type of medications taken at three years of age (Table 4). This variable was designed to capture medication used early in life. In this analysis MIH was used as the dependent variable and medication intake as the independent variable. In the Curitiba cohort (Federal University of Paraná), out of 191 individuals who reported having taken medications, 52 were affected by MIH and 139 were not. In contrast, out of 166 individuals who reported not taking any medications, 36 were affected with MIH and 130 were not. In the cohort from Rio de Janeiro, 35 individuals reported having taken medications and were affected by MIH, 15 reported having taken medications and were not affected by MIH, 43 did not take any medications and were affected with MIH and 81 did not take medications and were not affected by MIH. In both groups it was found statistical evidence for an interaction of *IRF6* and *TGFA* genotypes and medication intake at 3 years of age (Table 4).

Table 3. Summary results of gene-gene interaction analysis between *TGFA* rs930655 and the other *IRF6* markers in the samples from Istanbul. The odds of the less common allele of *TGFA* rs930655 in addition to the *IRF6* marker allele to increase the chance of MIH to occur.

SNP	Allele	Prevalence Ratio (95% confidence interval)	p-value
rs17015215	T	1.33 (1.25–1.42)	2.603e-016
rs2013162	A	1.25 (1.16–1.34)	2.992e-019
rs861019	A	1.34 (1.26–1.42)	1.379e-016
rs2073487	C	1.24 (1.16–1.34)	8.509e-019
rs642961	A	1.39 (1.31–1.47)	1.842e-015

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241898.t00>

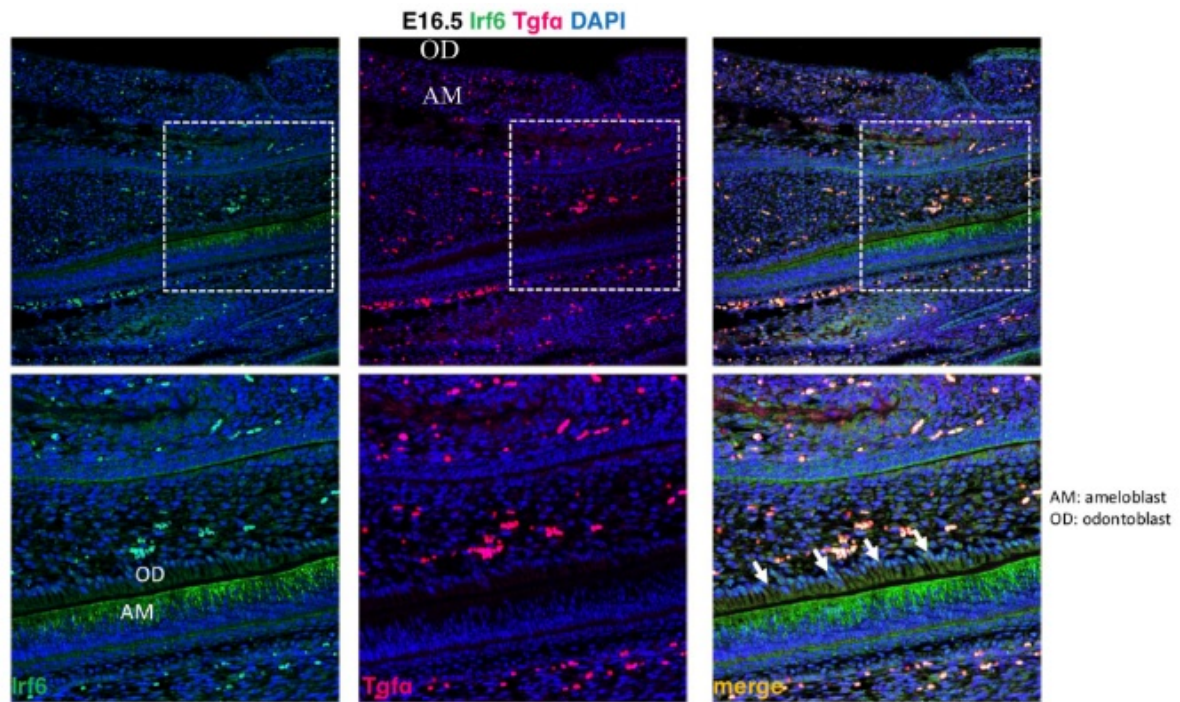


Fig 1. Expression of Irf6 and Tgfa in sagittal sections of E16.5 wild type murine embryos. Irf6 is expressed in ameloblasts (AM) but not odontoblasts (OD), whereas Tgfa expression was not detected.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241898.g001>

1

2 Discussion

3 MIH was originally defined as hypomineralization of systemic origin of one to four
 4 permanent first molars frequently associated with affected incisors [38]. This
 5 definition influenced the work done for more than a decade that focused on the
 6 identification of an environmental etiological factor [27]. Our group brought to light
 7 the possibility that MIH, in fact, has a multifactorial mode of inheritance [2, 5], and
 8 therefore has a genetic component, which was estimated in a proportion
 9 explaining the variation in the population of at least 20% based on data from twins
 10 [39]. Further, our group has proposed that MIH is possibly a localized and
 11 multifactorial expression of amelogenesis imperfecta [40].

Table 4. Summary of gene-environment interaction results considering medications (taken after three years of age) and its association with MIH phenotype in the cohort from Curitiba (Federal University of Paraná) and Rio de Janeiro.

Sample from Curitiba (Federal University of Paraná, Brazil)					
Gene	SNP	Allele	Odds Ratio (95% confidence	p-value with the genetic	p-value of medications and MIH
IRF6	rs17015215	T	2.49 (1.31–4.69)	0.028	0.22
	rs2013162	A	2.33 (1.29–4.38)	0.04	
	rs861019	G	2.5 (1.29–4.72)	0.026	
	rs2073487	C	2.34 (1.29–4.39)	0.04	
	rs642961	A	2.36 (1.28–4.44)	0.037	
TGFA	rs2166975	A	2.43 (1.3–4.57)	0.032	0.044
	rs1523305	C	2.3 (1.3–4.32)	0.044	
	rs2902345	T	2.4 (1.33–4.47)	0.038	
Sample from Rio de Janeiro, Brazil					
Gene	SNP	A1	Odds Ratio (95% confidence	p-value with the genetic	p-value of medications and MIH
IRF6	rs17015215	T	4.11 (1.81–7.42)	0.0009	0.0002
	rs2013162	A	5.16 (2.43–8.87)	0.0002	
	rs861019	G	6.86 (3.33–10.4)	0.0004	
	rs2073487	T	5.74 (2.47–10.02)	1.9e-005	

1 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241898.t004>

2

3 Some argue that the genetic condition affecting enamel is called amelogenesis

4 imperfecta, and that affect all teeth and have a Mendelian mode of inheritance.

5 On the other hand, enamel hypomineralization (enamel hypoplasia or enamel

6 hypocalcification) would be simply caused by impaired ameloblast function and

7 not by altered genes. Therefore, enamel hypomineralization would be a

8 chronological disturbance that would encompass MIH. This line of thought has led

9 to the hypothesis that the cause of the impaired ameloblast function could be

10 identified because that would be the result of systemic or local causes and this

11 hypothesis has hindered progress of the field for the last 20 years. MIH, like dental

12 caries or periodontitis, fits well in the complex or multifactorial inheritance

13 framework, and similar to cardiovascular diseases as an example, is determined

14 by more than one gene and can be influenced by the environment.

15

1 The evidence that MIH frequency varies across the world [6–22] is supported by
2 the results found in the present study. The association found in the Turkish
3 population was different from the results obtained in the cohorts from Brazil, which
4 indeed indicates that genetic factors contributing to the MIH phenotype may vary
5 depending on geographic origin. Both MIH and clefts apparently have higher
6 frequencies in the north of Europe and this frequency declines as one travels
7 toward the Mediterranean [36, 41]. Interestingly enough, these differences are not
8 clearly seen for the figures from the Americas, with Brazil and the United States
9 with reported frequencies of 10% to 13% [16, 19–21]. Additional evidence that
10 interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) and transforming growth factor alpha (*TGFA*)
11 may interact, as previously suggested in the formation of cleft lip and palate [33],
12 is also supported here as for the formation of MIH in the Turkish population. It was
13 not possible to determine the exact mechanism underlying this population-specific
14 association. The interpretation of these results should be analyzed cautiously.
15 When one looks at the frequency of the less common allele of rs17015215 in the
16 Turkish sample, there are two thirds of the individuals affected by MIH in
17 comparison to 1/7 of the individuals that served as comparison. The frequency of
18 the less common allele of rs930655 is also low: 9/39 in the affected individuals and
19 9/54 in the unaffected. When using these small numbers, one obtains very high
20 odds ratios between 25 and 40. The issue of overestimation of ratios is well
21 documented in the literature [42–52]. To avoid the overestimation of the strength
22 of the association, when one wishes odds ratios to be approximations of relative
23 risk, prevalence ratios were calculated, which are the ones presented in Table 3.

24
25 Our group has previously reported an interaction of *TGFBR1* and childhood
26 pneumonia as a possible gene-environment mechanism that increases the

1 chance of MIH occurrence. Additionally, it was reported statistical evidence of
2 potential interaction between genes related to tooth development and immune
3 response [29]. This present work reports evidence for both gene-gene (*IRF6*-
4 *TGFA*) and gene-environment (*IRF6*-medications taken and *TGFA*-medications
5 taken) interactions, which support the hypothesis that MIH is a complex genetic
6 condition [5]. In the gene expression analysis, it was observed expression of *Irf6*
7 in ameloblasts, but expression of *Tgfa* was not observed. These results can
8 possibly be explained by the timing of the analysis or simply meant that *TGFA* and
9 *IRF6* do not colocalize, and hence, have no direct joint effect of enamel
10 disturbances. The variable medication intake at 3 years of age was created to
11 capture children with history of medication intake from birth and past 3 years and
12 to serve as a surrogate for children more prone to infections and/or illnesses. The
13 52 children that were included in these analyses had a perfect correlation of
14 medication used before 1 year of age and medication used at 3 years of age.
15 Three years of age was the cutoff chosen with the assumption that mothers would
16 more likely remember that phase since their toddler was able to speak
17 approximately 200 words and being mostly understood. Knowing that enamel
18 development of first permanent molars is completed around 4 years of age [23],
19 a possible mechanism underlying MIH is an interference in enamel formation due
20 to an organic stress in response to illness or infection. This organic stress could
21 happen at any time between birth and past 4 years of age in children with a
22 particular genetic background that includes hypomorphic alleles of *IRF6*, *TGFA*,
23 and other genes such as *TGFBR1* [29], and *AQP5* [28]. It is likely that
24 disturbances of first permanent molar development may happen after the first year
25 of life, since mineralization of these teeth is not complete until later.

1 Previous work suggested that MIH is associated with medication intake although
2 this finding was not confirmed by others [26]. The use of medications, which is a
3 surrogate for illness, apparently can lead to MIH depending on genetic variation in
4 *IRF6* and *TGFA*. To properly confirm this hypothesis, the establishment of a cohort
5 of pregnant women that can be prospectively followed from birth to the timing
6 when the permanent dentition is developing is suggested. This approach would
7 allow to minimize issues of recall bias and to provide more definitive answers that
8 the currently published literature could not.

9
10 The *IRF6-TGFA*-medication association with MIH also supports the idea that MIH
11 and cleft lip and palate could possibly be linked. A pleiotropic gene effect could
12 explain this link. Our group has proposed that isolated cleft lip and palate actually
13 is a syndrome that involves disturbances of the dentition [34] and one line of
14 investigation would be to test if genetic variants associated with oral clefts also
15 associate with MIH. We have proposed this approach for isolated tooth agenesis
16 as well [53], and it provided a tool for gene discovery [54, 55]. *Tgfa* and *Irf6* did not
17 show the same pattern of expression in mouse teeth and the mechanism of how
18 they may interact to lead to MIH is yet to be determined.

19 Among the limitations that can be listed for this present study are the small sample
20 sizes of each independent cohort that may not have allowed the detection of
21 small effect sizes.

22 Depending on the study, clinical information was obtained from reviewing medical
23 records or by the use of questionnaires, and these differences can be source of
24 variation. The fact that detailed information about the type of medication the
25 patients were taking was not available due to self-reporting of this information
26 forced the inclusion of any type of medication intake in the analysis. However,

1 these were not vitamins or other supplements. This kind of observational study
2 that aims to recover information from many years prior suffers from potential
3 issues related to recall bias. For these reasons, the results presented here
4 should be taken cautiously. Another limitation that can be pointed out is that the
5 question on medications taken was asked years after the fact at the moment of
6 participation in the study. Depending on the cohort studied, assessments were
7 done at different age groups (6 to 12, 6 to 10, or at 8 years of age) and one can
8 think this may introduce some variation. In contrast, the strengths of this study
9 include the well characterized phenotype studied here, determined by
10 experienced dentists from different centers, and the diverse geographic
11 populations studied. The combination of these factors increases the confidence
12 in the results obtained.

13
14 In summary, the present study provided evidence that *IRF6* and *TGFA* might
15 interact and be involved with MIH in certain populations, although none of these
16 genes appear to have by themselves a major role in MIH. This effect may become
17 more likely apparent when children have to make use of medications around the
18 age of three years. Additional studies to test potential gene-gene interactions in
19 diverse populations are warranted in order to confirm results reported by previous
20 studies [29] and the results found here. Study designs aiming to obtain a more
21 detailed information about what specific medications are involved in the
22 development of MIH are also suggested. These studies should try minimize recall
23 bias by having precisely defined research questions, appropriate data collection
24 methods, well-trained interviewers, being prospective in nature, blinding for
25 researchers and patients, and including nested case-control designs. Despite the
26 limitations described for the present study, the results both reinforce the

detrimental effects that medication intake can cause to oral health, and the link between genes associated with orofacial clefts and the MIH phenotype.

Methods

Subjects

The total study population consisted of 1,065 individuals from four populations including three Brazilian cohorts and a Turkish cohort. Salivary sample collection and DNA extraction procedures were described previously [56]. Two groups were from Curitiba, Brazil; the first group consisted of 356 subjects (169 females and 187 males) and the study protocol was approved by the Municipal Department of Education and the Committee for Ethics in Research in Human Health Sciences of the Federal University of Paraná (UFPR; approval no. 1.613.829/2016). The second group from Curitiba consisted of 200 individuals (108 females and 92 males) and the project was approved by the Ethics and Research Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná, under the protocol number 1.971.986. The third cohort was from Rio de Janeiro, Brazil, consisted of 174 individuals (73 females and 101 males), and the study protocol was approved by the local Ethics Committee for Research (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho–HUCFF/UFRJ–approval protocol number 4598514.7.00005257). Finally, the Turkish population consisted of 335 subjects (164 females and 171 males) and the study was approved by the Istanbul University (approval protocol number 2006/2508) Institutional Review Board. Further oversight was obtained at the University of Pittsburgh Institutional Review Board (IRB approval protocol numbers PRO0710045 and PRO12080056). MIH was evaluated using the European Academy of Pediatric Dentistry (EAPD) criteria [57], and all subjects/guardians

1 read and signed a written informed consent before their participation in the study.

2
3 **Cohort from Curitiba, Brazil (Federal University of Paraná): Eligibility criteria,**
4 **calibration of the examiners and data collection**

5 The sample consisted of 356 school children, which were randomly selected from
6 a representative population [58] from the city of Curitiba public schools. To ensure
7 accurate population representation, two-stage cluster sampling was performed.
8 First, two schools from each administrative district were randomly selected. Next,
9 two to three classrooms from each selected school were randomly chosen using
10 the website www.randomizer.org. The children included were all eight years old
11 and presenting four erupted first molars in the oral cavity. Subjects who had
12 orthodontic braces, syndromes, or amelogenesis imperfecta were excluded from
13 the study. The affected group consisted of children with at least one tooth affected
14 by MIH and the comparison group consisted of children who had no teeth
15 presenting hypomineralization.

16 A structured socioeconomic data questionnaire was completed by the children's
17 caregivers. Four examiners, previously trained and calibrated to diagnose Molar-
18 incisor hypomineralization, selected thirty intraoral photographs of MIH affected
19 teeth in order to define the diagnosis. Sixty photographs of different clinical
20 scenarios that involved manifestations of MIH werethen analyzed by the
21 examiners. After one week, the examiners independently analyzed the same
22 photographs in a different order (duplicate examination, kappa > 0.75). The clinical
23 examination was performed in a school environment using artificial light, a dental
24 mirror, a dental probe with a blunt tip, and sterile gauze. Data collection was
25 performed from November 2016 to September 2017.

26

Cohort from Curitiba, Brazil (Pontifical Catholic University of Paraná):
Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

This sample consisted of a total of 200 individuals, enrolled in Curitiba municipal schools during 2018. Of these, 100 were affected by MIH and 100 non-affected, 108 were females and 92 were males. This cohort was recruited independently from the cohort recruited by investigators at the Federal University of Paraná, however considering the geographical proximity, there is a possibility that some individuals participated in both studies. Although this was a slight possibility, the data from each group were analyzed separately. The inclusion criteria were children between 6 and 10 years of age, affected by MIH in completely erupted teeth. As for exclusion criteria, individuals undergoing orthodontic treatment or scoring 2, 3, 4, 5 and 6 of ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) were excluded from the study population. Two interviewers were calibrated on MIH diagnosis using photographs according to a previously published criterion [59]. The intra-rater reliability was performed one month after the first assessment for the diagnosis of both case and comparison groups ($\kappa = 1$). The clinical examinations were performed by calibrated dentists in the schools, using natural light, an oral mirror and an exploratory probe when it was necessary.

Cohort from Rio de Janeiro, Brazil: Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

This sample consisted of 174 individuals, from 7 to 14 (10.13 ± 1.9) years of age, treated at the Pediatric Dentistry Clinic of the Federal University of Rio de Janeiro. Recruitment took place from July 2015 to April 2017, and divided into children with

1 MIH (n = 78) and without MIH (n = 96). The eligibility criteria for this study included
2 patients having all the first permanent molars erupted. The exclusion criteria
3 consisted of children affected by congenital syndromes, enamel defects
4 (hypoplastic lesions, fluorosis, amelogenesis imperfecta or tetracycline stain) and
5 patients undergoing orthodontic treatment.

6 To assess for inter and intra examiner-reliability, a theoretical exercise was
7 previously applied for two days. Twenty clinical images of dental enamel defects
8 including fluorosis, hypoplasia, amelogenesis imperfecta, dental caries and MIH
9 were shown to the examiners (F.M.F.S., M.C.M). Two weeks after the first
10 assessment, a new assessment was carried out with the examiners and the
11 kappas were 0.88 and 0.89, respectively.

12 The subjects' health data were collected through health records, including the
13 demographic data (child's age, sex, place of birth, residence, parent's education
14 and income), mother's health during pregnancy, and children's medical history
15 (medication intake, systemic diseases, high fever, malnutrition, asthma, bronchitis,
16 epilepsy, and severe infections). The clinical examination was performed by a
17 calibrated dentist (F.M.F.S). Examinations were carried out using a mirror and a
18 probe, at the dental chair and using artificial light.

19 20 **Cohort from Istanbul, Turkey: Eligibility criteria, calibration of the examiners** 21 **and data collection**

22 Eligible individuals were enrolled at the Pediatric Clinic of Istanbul University,
23 Turkey (n = 335, ages ranging from 6 to 12 years). Subjects affected by syndromes,
24 fluorosis, or the ones who had fixed appliances were excluded from the study.
25 Cases were defined as subjects affected by MIH, while controls were defined as
26 subjects with no evidence of MIH. Calibrated examiners carried out the clinical

examination, with F.S. having calibrated M.B. and M.K. Exam calibrations were performed according to the following protocol: First, the calibrator presented to the examiner the criteria for MIH detection, showing pictures of several situations to be observed in the exam and discussing each of these situations in a session that lasted one to two hours. Next, the calibrator and examiner analyzed ten to twenty subjects and discussed each case. The intraexaminer agreement was assessed by a second clinical examination in 10% of the sample after two weeks, with a kappa of 1.0. M.K. pre-screened subjects, and M.B. performed the full exam. This cohort and methodology have been reported before [2]. Clinical examinations were performed using a flashlight and intra-oral mirror and gauze was used to dry and clean the teeth prior to examination. Artificial light and dental operatory were used for all evaluations. An explorer was gently used for assessing the smoothness of tooth surfaces.

Single marker analysis

The amount of DNA and the purity of each sample was determined by spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, US). The DNA concentration was obtained by readings at 260 nm and the purity by 260/ 280 nm proportion. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IRF6* (rs2073487, rs2013162, rs17015215, rs861019, rs642961) and four in *TGFA* were genotyped (Table 2). PCR reactions were carried out using Taqman chemistry [60] in 3.0 µl reaction volumes in an ABI PRISM Sequence Detection System 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping calls were analyzed using SDS software version 1.7 (Applied Biosystems). PCR reactions were repeated twice when necessary and allele frequencies were calculated. Genotypes are available as (S1–S4 Files).

Gene-gene interactions

Gene-gene interaction analyses were performed using logistic regression as implemented in PLINK. In order to test the interaction between *IRF6* and *TGFA*, the presence of MIH was considered a dependent variable and the SNPs were considered independent variables. A file containing all *IRF6* genotypes was ran against a covariate file containing the *TGFA* genotypes organized by copies of alleles, and this analysis was repeated with a *TGFA* genotype file against the *IRF6* covariate file.

Immunofluorescence

Expression of *Tgfa* and *Irf6* proteins was performed on paraffin sections from heads of wild type mice at E16.5. Maintenance and handling of mice were approved by the Animal Care Unit at the University of Iowa. Tissues were deparaffinized and rehydrated in a series of ethanol dilutions. Slides were boiled for 20 min in antigen unmasking solution (Vector Laboratories, H-3300). Sections were blocked with 20% donkey serum (sigma, D9663A), then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: polyclonal goat anti-*Tgfa* (1:50, R&D, AF-239-SP) and polyclonal rabbit anti-*Irf6* (1:50, sigma SAB2102995). After rinsing in PBS, sections were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluorophore 488 or 555 (Molecular Probes, Invitrogen, CA). The nuclei were counterstained with DAPI in PBS (1:10000). The images were taken using a ZEISS 700 confocal microscopy.

Gene-environment interactions

Tests for potential associations between MIH and factors that affected the children

of 3 years of age or older in the cohorts from Curitiba (Federal University of Paraná) and Rio de Janeiro were carried out. The variables included the presence of respiratory issues, malnutrition, any type of food intolerance, infection of any sort and any type of medication intake between 3 years of age and the time the sample was collected. This information was part of the questionnaires obtained for both MIH affected and unaffected children. Mothers responded the questions and all participants were asked the same questions, which included medical history of the child (diseases and medications taken) and details of the child's diet. Vitamins and other supplements were not counted as medications.

The variable "medications taken at 3 years of age" was designed due to the evidence that cuspal enamel formation of first permanent molars is not completed until past 3 years of age [24]. These data suggest that the first molar susceptibility window for MIH goes beyond the first year of age. The suggestion that first permanent molar mineralization is completed by one year of age likely limits the ability of unveiling associations.

We have complied with the STROBE guidelines in this study.

Statistical analysis

All SNPs in all samples were tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium using chi-square. In the single-marker analysis, association tests were performed comparing genotypes to phenotype between affected individuals and their respective comparison groups as implemented in the PLINK software [61]. Both odds ratios and 95% confidence intervals were calculated. In order to account for multiple testing, Bonferroni correction was performed and p-values of 0.001 (0.05/36) or below were considered significant.

In the gene-gene interaction analysis, p-values below 0.0004 (0.05/108) were

considered statistically significant.

In the gene-environment interaction analysis the covariates were dichotomous and analyses were performed using logistic regression as also implemented in PLINK.

The power necessary to detect significant associations between a gene marker and the phenotype in each cohort was calculated using a Genetic Power Calculator tool [62]. The frequency of the high-risk allele in the population was defined as equal to 0.2, the prevalence of MIH as 0.12, D' as 1.0 (amount of linkage disequilibrium), the respective number of cases of each cohort and the case-comparison group ratio. When imputing the effect size in the heterozygote form as 1.3 and the effect size of homozygous form as 5.0, it was obtained 69%, 57%, 51%, and 79% power in the cohort from Curitiba (Federal University of Paraná), Curitiba (Pontifical Catholic University), Rio de Janeiro and Istanbul, respectively. Power will decrease with lower effect sizes for both forms, and will increase to 82%, 70%, 64%, and 89%, respectively if the effect size for the homozygous form is 6.0.

Acknowledgments

This paper is based in part on a thesis submitted to the graduate faculty, Federal University of Rio de Janeiro, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree (for F.M.F.S.) and on a thesis submitted to the graduate faculty, Pontifical Catholic University of Paraná, in partial fulfillment of the requirements for the MS degree (for E.G.C.).

Author Contributions

Conceptualization: Mariana Bezamat, Ariadne Letra, Figen Seymen, Brad

Amendt, Renata I. Werneck, Alexandre R. Vieira.

Formal analysis: Alexandre R. Vieira.

Funding acquisition: Alexandre R. Vieira.

Investigation: Mariana Bezamat, Juliana F. Souza, Fernanda M. F. Silva, Emily G. Corrêa, Aluhe L. Fatturi, João A. Brancher, Flávia M. Carvalho, Tayla Cavallari, Laís Bertolazo, Cleber Machado-Souza, Mine Koruyucu, Merve Bayram, Andrea Racic, Benjamin M. Harrison, Yan Y. Sweat, Deborah Studen-Pavlovich, Figen Seymen, Brad Amendt, Renata I. Werneck, Marcelo C. Costa, Adriana Modesto.

Methodology: Juliana F. Souza, Ariadne Letra, Figen Seymen, Brad Amendt, Renata I. Werneck, Marcelo C. Costa, Adriana Modesto, Alexandre R. Vieira.

Resources: Alexandre R. Vieira.

Software: Mariana Bezamat, Benjamin M. Harrison.

Supervision: Marcelo C. Costa, Adriana Modesto, Alexandre R. Vieira.

Writing – original draft: Mariana Bezamat, Alexandre R. Vieira.

Writing – review & editing: Juliana F. Souza, Fernanda M. F. Silva, Emily G. Corrêa, Aluhe L. Fatturi, João A. Brancher, Flávia M. Carvalho, Tayla Cavallari, Laís Bertolazo, Cleber Machado-Souza, Mine Koruyucu, Merve Bayram, Andrea Racic, Benjamin M. Harrison, Yan Y. Sweat, Ariadne Letra, Deborah Studen-Pavlovich, Figen Seymen, Brad Amendt, Renata I. Werneck, Marcelo C. Costa, Adriana Modesto.

References

1. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. Arch Oral Biol.

2002; 47(4):281–91. Epub 2002/04/02. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(02\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(02)00006-7) PMID: 11922871.

2. Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, et al. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol.* 2013; 58 (10):1434–42. Epub 2013/06/25. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.05.005> PMID: 23790503
3. Garg N, Jain AK, Saha S, Singh J. Essentiality of early diagnosis of molar incisor hypomineralization in children and review of its clinical presentation, etiology and management. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2012; 5(3):190–6. Epub 2012/09/01. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1164> PMID: 25206166
4. Raposo F, de Carvalho Rodrigues AC, Lia EN, Leal SC. Prevalence of Hypersensitivity in Teeth Affected by Molar-Incisor Hypomineralization (MIH). *Caries Res.* 2019:1–7. Epub 2019/01/25. <https://doi.org/10.1159/000495848> PMID: 30677762.
5. Vieira AR, Kup E. On the Etiology of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res.* 2016; 50(2):166–9. Epub 2016/04/26. <https://doi.org/10.1159/000445128> PMID: 27111773.
6. Zhao D, Dong B, Yu D, Ren Q, Sun Y. The prevalence of molar incisor hypomineralization: evidence from 70 studies. *Int J Paediatr Dent.* 2018; 28(2):170–9. Epub 2017/07/22. <https://doi.org/10.1111/ipd.12323> PMID: 28732120.
7. Koruyucu M, Ozel S, Tuna EB. Prevalence and etiology of molar-incisor hypomineralization (MIH) in the city of Istanbul. *J Dent Sci.* 2018; 13(4):318–28. Epub 2019/03/22. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2018.05.002> PMID:

30895140

8. Hussain G, Al-Halabi M, Kowash M, Hassan A. The Prevalence and Severity of Molar Incisor Hypomineralization and Molar Hypomineralization in Dubai, UAE. *J Dent Child (Chic)*. 2018; 85(3):102–7. Epub 2019/03/15. PMID: 30869585.
9. Saitoh M, Nakamura Y, Hanasaki M, Saitoh I, Murai Y, Kurashige Y, et al. Prevalence of molar incisor hypomineralization and regional differences throughout Japan. *Environ Health Prev Med*. 2018; 23 (1):55. Epub 2018/11/02. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0748-6> PMID: 30382812
10. Glodkowska N, Emerich K. Molar Incisor Hypomineralization: prevalence and severity among children from Northern Poland. *Eur J Paediatr Dent*. 2019; 20(1):59–66. Epub 2019/03/29. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2019.20.01.12> PMID: 30919647.
11. Mejia JD, Restrepo M, Gonzalez S, Alvarez LG, Santos-Pinto L, Escobar A. Molar Incisor Hypomineralization in Colombia: Prevalence, Severity and Associated Risk Factors. *J Clin Pediatr Dent*. 2019; 43 (3):185–9. Epub 2019/04/10. <https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.3.7> PMID: 30964726.
12. Rai PM, Jain J, Raju AS, Nair RA, Shashidhar K, Dsouza S. Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization among School Children Aged 9 to 12 Years in Virajpet, Karnataka, India. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019; 7(6):1042–6. Epub 2019/04/13. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.224> PMID: 30976358
13. GorbatoVA MA, Utkina EI, Zinchenko GA, Grijbovski AM, Popova DA, Popov VA, et al. [Molar-incisor hypomineralization among 12-years old children in Arkhangelsk region]. *Stomatologija (Mosk)*. 2019; 98(2):64–6. Epub 2019/05/16. <https://doi.org/10.17116/stomat20199802164> PMID:

31089123.

14. Kilinc G, Cetin M, Kose B, Ellidokuz H. Prevalence, aetiology, and treatment of molar incisor hypomineralization in children living in Izmir City (Turkey). *Int J Paediatr Dent*. 2019; 29(6):775–82. Epub 2019/05/ 18. <https://doi.org/10.1111/ipd.12508> PMID: 31099125.
15. Ahmad SH, Petrou MA, Alhumrani A, Hashim R, Splieth C. Prevalence of Molar-Incisor Hypomineralisation in an Emerging Community, and a Possible Correlation with Caries, Fluorosis and Socioeconomic Status. *Oral Health Prev Dent*. 2019; 17(4):323–7. Epub 2019/06/22. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a42725> PMID: 31225537.
16. Davenport M, Welles AD, Angelopoulou MV, Gonzalez C, Okunseri C, Barbeau L, et al. Prevalence of molar-incisor hypomineralization in Milwaukee, Wisconsin, USA: a pilot study. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2019; 11:109–17. Epub 2019/06/27. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S172736> PMID: 31239785
17. Villanueva-Gutierrez T, Irigoyen-Camacho ME, Castano-Seiquier A, Zepeda-Zepeda MA, Sanchez- Perez L, Frechero NM. Prevalence and Severity of Molar-Incisor Hypomineralization, Maternal Education, and Dental Caries: A Cross-Sectional Study of Mexican Schoolchildren with Low Socioeconomic Status. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2019; 9(5):513–21. Epub 2019/10/18. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_130_19 PMID: 31620386
18. Goswami M, Bhushan U, Pandiyan R, Sharma S. Molar Incisor Hypomineralization-An Emerging Burden: A Short Study on Prevalence and Clinical Characteristics in Central Delhi, India. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2019; 12(3):211–4. Epub 2019/11/12. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005->

1624 PMID: 31708617

19. Hartsock LA, Burnheimer J, Modesto A, Vieira AR. A Snapshot of the prevalence of molar incisor hypomineralization and fluorosis in Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *Pediatr Dent* 2020; 42(1):36–40. PMID: 32075709
20. Silva FMF, Zhou Y, Vieira FGF, Carvalho FM, Costa MC, Vieira AR. Defining the prevalence of molar incisor hypomineralization in Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr* 2020; 20:e5146. <https://doi.org/10.1590/pcobi.2020.021>
21. Ahmed AT, Soto-Rojas AE, Dean JA, Eckert GJ, Martinez-Mier EA. Prevalence of molar-incisor hypomineralization and other enamel defects and associated sociodemographic determinants in Indiana. *J Am Dent Assoc* 2020; 151(7):491–501. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2020.02.027> PMID: 32593351
22. Amend S, Nossol C, Bausback-Schomakers S, Wleklinski C, Scheibelhut C, Pons-Kühnemann J, et al. Prevalence of molar-incisor-hypomineralisation (MIH) among 6-12-year-old children in Central Hesse (Germany). *Clin Oral Investig*. 2020; <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03519-7> Online ahead of print. PMID: 32808178
23. Gleiser I, Hunt EE Jr., The permanent mandibular first molar: its calcification, eruption and decay. *Am J Phys Anthropol*. 1955; 13(2):253–83. Epub 1955/06/01. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330130206> PMID: 13258780.
24. Reid DJ, Dean MC. Variation in modern human enamel formation times. *J Hum Evol*. 2006; 50(3):329–46. Epub 2005/11/23. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2005.09.003> PMID: 16300817.
25. Robinson C. Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Front Physiol*. 2014; 5:388. Epub 2014/10/24.

- 1 <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00388> PMID: 25339913
- 2 26. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar
- 3 incisor hypomineralization— A systematic review. *Community Dent Oral*
- 4 *Epidemiol.* 2016; 44(4):342–53. Epub 2016/04/29. [https://](https://doi.org/10.1111/cdoe.12229)
- 5 doi.org/10.1111/cdoe.12229 PMID: 27121068.
- 6 27. Fatturi AL, Wambier LM, Chibinski AC, Assuncao L, Brancher JA, Reis A, et
- 7 al. A systematic review and meta-analysis of systemic exposure associated
- 8 with molar incisor hypomineralization. *Community Dent Oral Epidemiol.*
- 9 2019; 47(5):407–15. Epub 2019/05/22. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12467>
- 10 PMID: 31111554.
- 11 28. Pang L, Li X, Wang K, Tao Y, Cui T, Xu Q, et al. Interactions with the
- 12 aquaporin 5 gene increase the susceptibility to molar-incisor
- 13 hypomineralization. *Arch Oral Biol.* 2020; 111:104637. Epub 2019/12/31.
- 14 <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104637> PMID: 31884335.
- 15 29. Bussanelli DG, Restrepo M, Fragelli CMB, Santos-Pinto L, Jeremias F,
- 16 Cordeiro RCL, et al. Genes Regulating Immune Response and
- 17 Amelogenesis Interact in Increasing the Susceptibility to Molar-Incisor
- 18 Hypomineralization. *Caries Res.* 2019; 53(2):217–27. Epub 2018/08/22.
- 19 <https://doi.org/10.1159/000491644> PMID: 30130760.
- 20 30. Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, Letra A, Scariot R, Silva RM, et al. Are
- 21 mTOR and Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Genes Associated with
- 22 Oral and Bone Diseases? *Caries Res.* 2019; 53(3):235–41. Epub
- 23 2018/09/12. <https://doi.org/10.1159/000492675> PMID: 30205378
- 24 31. Walker SC, Mattick CR, Hobson RS, Steen IN. Abnormal tooth size and
- 25 morphology in subjects with cleft lip and/or palate in the north of England.
- 26 *Eur J Orthod.* 2009; 31(1):68–75. Epub 2008/12/17.

1 <https://doi.org/10.1093/ejo/cjn073> PMID: 19073959.

2 32. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for
3 oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007; 86(10):986–91.
4 Epub 2007/09/25. <https://doi.org/10.1177/154405910708601013> PMID:
5 17890676

6 33. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, et al.
7 Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of
8 nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45441. Epub
9 2012/10/03. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045441> PMID: 23029012

10 34. Koruyucu M, Kasimoglu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergoz N, et al.
11 Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med*
12 *Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 125(4):307–12. Epub 2018/03/04.
13 <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.01.007> PMID: 29500156.

14 35. Chu EY, Tamasas B, Fong H, Foster BL, LaCourse MR, Tran AB, et al. Full
15 Spectrum of Postnatal Tooth Phenotypes in a Novel Irf6 Cleft Lip Model. *J*
16 *Dent Res*. 2016; 95(11):1265–73. Epub 2016/07/03.
17 <https://doi.org/10.1177/0022034516656787> PMID: 27369589

18 36. Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene
19 and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006;
20 163(9):790–810. Epub 2006/02/24. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj103>
21 PMID: 16495466.

22 37. Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Wu T, Fallin MD, Ingersoll RG, et al.
23 Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate
24 through unconventional genetic mechanisms. *Hum Genet*. 2009;
25 126(3):385–94. Epub 2009/05/16. [https://doi.org/10.1007/s00439-009-](https://doi.org/10.1007/s00439-009-0680-3)
26 0680-3 PMID: 19444471

38. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent*. 2003; 4(3):114–20. PMID: 14529330.
39. Vieira AR. On the genetics contribution to molar-incisor hypomineralization. *Int J Paediatr Dent*. 2019; 29(1):2–3. <https://doi.org/10.1111/ipd.12439> PMID: 30367537.
40. Vieira AR. Genetic basis of enamel and dentin defects. In: Vieira AR. *Genetic basis of oral health conditions*. Springer: Cham, 2020: 9–21.
41. Vieira AR. Prevalence of molar incisor hypomineralisation has a North-South gradient between Europe and North Africa. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2019; 20(5):501–2. Epub 2019/02/07. <https://doi.org/10.1007/s40368-019-00417-9> PMID: 30726548.
42. Greenland S. Interpretation and choice of effect measures in epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol*. 1987; 125(5):761–8. Epub 1987/05/01. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114593> PMID: 3551588.
43. Lee J. Odds ratio or relative risk for cross-sectional data? *Int J Epidemiol*. 1994; 23(1):201–3. Epub 1994/02/01. <https://doi.org/10.1093/ije/23.1.201> PMID: 8194918.
44. Lee J, Chia KS. Estimation of prevalence rate ratios for cross sectional data: an example in occupational epidemiology. *Br J Ind Med*. 1993; 50(9):861–2. Epub 1993/09/01. <https://doi.org/10.1136/oem.50.9.861> PMID: 8398881
45. Lee J, Chia KS. Prevalence odds ratio v prevalence ratio—a response. *Occup Environ Med*. 1995; 52 (11):781–2. Epub 1995/11/01. <https://doi.org/10.1136/oem.52.11.781-a> PMID: 8535502
46. Nurminen M. To use or not to use the odds ratio in epidemiologic analyses? *Eur J Epidemiol*. 1995; 11 (4):365–71. Epub 1995/08/01. <https://doi.org/10.1007/BF01721219> PMID: 8549701.

- 1 47. Stromberg U. Prevalence odds ratio v prevalence ratio—some further
2 comments. *Occup Environ Med.* 1995; 52(2):143. Epub 1995/02/01.
3 <https://doi.org/10.1136/oem.52.2.143> PMID: 7757169
- 4 48. Walter SD. Choice of effect measure for epidemiological data. *J Clin*
5 *Epidemiol.* 2000; 53(9):931–9. Epub 2000/09/27.
6 [https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(00\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(00)00210-9) PMID: 11004419.
- 7 49. Bland JM, Altman DG. Statistics notes. The odds ratio. *BMJ.* 2000;
8 320(7247):1468. Epub 2000/05/29.
9 <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7247.1468> PMID: 10827061
- 10 50. Szklo M, Nieto FJ. *Epidemiology beyond the basics.* 2. USA: Jones and
11 Bartlett; 2007.
- 12 51. Gordis L. *Epidemiology.* 4. USA: Saunders Elsevier; 2004.
- 13 52. Tamhane AR, Westfall AO, Burkholder GA, Cutter GR. Prevalence odds
14 ratio versus prevalence ratio: choice comes with consequences. *Stat Med.*
15 2016; 35(30):5730–5. Epub 2016/07/28. <https://doi.org/10.1002/sim.7059>
16 PMID: 27460748
- 17 53. Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for
18 genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003; 82(3):162–5. Epub
19 2003/02/25. <https://doi.org/10.1177/154405910308200303> PMID:
20 12598542.
- 21 54. Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A
22 genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am*
23 *J Med Genet A.* 2008; 146A(11):1406–13. Epub 2008/04/30.
24 <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32295> PMID: 18442096
- 25 55. Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML.
26 Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds

novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med.* 2008; 10(9):668– 74. Epub 2008/11/04. <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3181833793> PMID: 18978678

56. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000; 18(1):6–9. Epub 2001/04/28. PMID: 11324090.

57. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *Eur J Paediatr Dent.* 2003; 4(3):110–3. Epub 2003/10/08. PMID: 14529329.

58. Portella PD, Menoncin BLV, Souza JF, Menezes JVNB, Fraiz FC, Assunção LRS. Impact of molar incisor hypomineralization on quality of life in children with early mixed dentition: A hierarchical approach. *Int J Paediatr Dent.* 2019; 29(4):496–506. <https://doi.org/10.1111/ipd.12482> PMID: 30758096.

59. Ghanim A, Silva MJ, Elfrink MEC, Lygidakis NA, Mariño RJ, Weerheijm KL, et al. Molar incisor hypomineralisation (MIH) training manual for clinical field surveys and practice. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2017; 18(4):225–42. <https://doi.org/10.1007/s40368-017-0293-9> Epub 2017 Jul 18. PMID: 28721667.

60. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2001; 11(7):1262–8. Epub 2001/07/04. <https://doi.org/10.1101/gr.157801> PMID: 11435409

61. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole- genome association and population-based

1 linkage analyses. Am J Hum Genet. 2007; 81(3):559–75. Epub 2007/08/19.
2 <https://doi.org/10.1086/519795> PMID: 17701901

3 62. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of
4 linkage and association genetic mapping studies of complex traits.
5 Bioinformatics. 2003; 19(1):149–50. Epub 2002/12/25. [https://doi.](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.1.149)
6 [org/10.1093/bioinformatics/19.1.149](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.1.149) PMID: 12499305.

8. REFERÊNCIAS

- ABDALLA, Hanna E.; ABUAFFAN, Amal H.; KEMOLI, Arthur Musakulu. Molar incisor hypomineralization, prevalence, pattern and distribution in Sudanese children. *BMC Oral Health*, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12903-020-01383-1>>.
- AGUIRRE, Patricia Estefania Ayala *et al.* Are the Internet users concerned about molar incisor hypomineralization? An infoveillance study. *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 30, n. 1, p. 27–34, 2020.
- ALALUUSUA, Satu. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *European archives of paediatric dentistry: official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, v. 11, n. 2, p. 53–58, 2010.
- BARRETT, Jeffrey C *et al.* Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BEATY, Terri H.; KHOURY, Muin J. Interface of genetics and epidemiology. *Epidemiologic Reviews*, v. 22, n. 1, p. 120–125, 2000.
- BEZAMAT, Mariana *et al.* Gene-environment interaction in molar-incisor hypomineralization. *PLoS ONE*, v. 16, n. 1 January, p. 1–16, 2021.
- BUSSANELI, Diego Girotto *et al.* Genes Regulating Immune Response and Amelogenesis Interact in Increasing the Susceptibility to Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Research*, v. 53, n. 2, p. 217–227, 2019.
- CAETANO, Alexandre Rodrigues. Conceitos básicos , aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia Marcadores SNP*, v. 38, p. 64–71, 2009.
- CALLAHAN, Nicholas *et al.* Transforming growth factor-alfa gene (TGFA), human tooth agenesis, and evidence of segmental uniparental isodisomy. *European Journal of Oral Sciences*, v. 117, n. 1, p. 20–26, 2009.
- CORNELL UNIVERSITY INSEAD AND WIPO. Index, Global Innovation. 2019.
- CORRADINI, Beatrice *et al.* The importance of forensic storage support: DNA quality from 11-year-old saliva on FTA cards. *International Journal of Legal Medicine*, v. 133, n. 6, p. 1743–1750, 2019.
- COSTA-SILVA, Cristiane Maria; *et al.* Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 20, n. 6, p. 426–434, 2010.

1 CROMBIE, Felicity; MANTON, David; KILPATRICK, Nicola. Aetiology
2 of molar-incisor hypomineralization: A critical review. *International Journal of*
3 *Paediatric Dentistry*, v. 19, n. 2, p. 73–83, 2009.

4 DENIS, Maud *et al.* White defects on enamel: Diagnosis and
5 anatomopathology: Two essential factors for proper treatment (part 1).
6 *International Orthodontics*, v. 11, n. 2, p. 139–165, 2013.

7 DOURADO, Daniele Gomes *et al.* Molar-incisor hypomineralization in
8 quilombola children and adolescents: A study of prevalence and associated
9 factors. *Journal of Public Health Dentistry*, p. 1–10, 2020.

10 ELFRINK, Marlies E C *et al.* Deciduous molar hypomineralization and
11 molar incisor hypomineralization. *Journal of Dental Research*, v. 91, n. 6, p.
12 551–555, 2012.

13 FAGRELL, Tobias G. *et al.* Bacterial invasion of dentinal tubules
14 beneath apparently intact but hypomineralized enamel in molar teeth with
15 molar incisor hypomineralization. *International Journal of Paediatric Dentistry*,
16 v. 18, n. 5, p. 333–340, 2008.

17 FAGRELL, Tobias G. *Molar incisor hypomineralization. Morphological*
18 *and chemical aspects, onset and possible etiological factors*. [S.l.: s.n.], 2011.

19 FATTURI, Aluhe Lopes; WAMBIER, Leticia Maira; *et al.* A systematic
20 review and meta - analysis of systemic exposure associated with molar incisor
21 hypomineralization. n. April, p. 1–9, 2019.

22 FATTURI, Aluhe Lopes; MENEZES, José Vitor Nogara Borges; *et al.*
23 Systemic Exposures Associated with Hypomineralized Primary Second
24 Molars. *Pediatric dentistry*, v. 41, n. 5, p. 364–370, 2019.

25 FATTURI, Aluhe Lopes *et al.* The relationship between molar incisor
26 hypomineralization, dental caries, socioeconomic factors, and polymorphisms
27 in the vitamin D receptor gene: a population-based study. *Clinical Oral*
28 *Investigations*, 2020.

29 GARCIA-MARGARIT, Miriam *et al.* Epidemiologic study of molar-
30 incisor hypomineralization in 8-year-old Spanish children. *International*
31 *Journal of Paediatric Dentistry*, v. 24, n. 1, p. 14–22, 2014.

32 GAROT, Elsa *et al.* Are hypomineralised lesions on second primary
33 molars (HSPM) a predictive sign of molar incisor hypomineralisation (MIH)? A
34 systematic review and a meta-analysis. *Journal of Dentistry*, v. 72, n. March,
35 p. 8–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.005>>.

GHANIM, Aghareed *et al.* Molar incisor hypomineralisation (MIH) training manual for clinical field surveys and practice. *European Archives of Paediatric Dentistry*, v. 18, n. 4, p. 225–242, 2017.

GHASSIBÉ, Michella *et al.* Interferon regulatory factor-6: A gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *European Journal of Human Genetics*, v. 13, n. 11, p. 1239–1242, 2005.

GIUCA, Maria Rita *et al.* Investigation of Clinical Characteristics and Etiological Factors in Children with Molar Incisor Hypomineralization. *International Journal of Dentistry*, v. 2018, 2018.

GIUCA, Maria Rita *et al.* State-of-the-art on MIH. Part. 1 Definition and aepidemiology. *European Journal of Paediatric Dentistry*, v. 21, n. 1, p. 80–82, 2020.

GŁÓDKOWSKA, Natalia; EMERICH, Katarzyna. The impact of environmental air pollution on the prevalence of molar incisor hypomineralization in schoolchildren: A cross-sectional study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 29, n. 12, p. 1469–1477, 2021.

GONÇALVES, Aguinaldo; GONÇALVES, Neusa Nunes da Silva e. Epidemiologia genética: epidemiologia, genética ou nenhuma das anteriores? *Cadernos de Saúde Pública*, v. 6, n. 4, p. 369–384, 1990.

GRIFFITHS, Anthony J F; *et al.* Introdução à genética. *Tradução Paulo A. Motta*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HANAN, Simone Assayag *et al.* Molar-Incisor hypomineralization in schoolchildren of Manaus, Brazil. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada*, v. 15, n. 1, p. 309–317, 2015.

HOČEVAR, Luka *et al.* The possible influence of genetic aetiological factors on molar–incisor hypomineralisation. *Archives of Oral Biology*, v. 118, n. July, p. 104848, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104848>>.

HOLLAND, Pamela M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991.

HUBBARD, Michael J. *et al.* Molar hypomineralisation: A call to arms for enamel researchers. *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. AUG, p. 1–6, 2017.

1 INGRAHAM, Christopher R. *et al.* Abnormal skin, limb and craniofacial
2 morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nature*
3 *Genetics*, v. 38, n. 11, p. 1335–1340, 2006.

4 IRIGOYEN-CAMACHO, Maria Esther *et al.* Evaluating the changes in
5 molar incisor hypomineralization prevalence: A comparison of two cross-
6 sectional studies in two elementary schools in Mexico City between 2008 and
7 2017. *Clinical and Experimental Dental Research*, v. 6, n. 1, p. 82–89, 2020.

8 JÄLEVIK, Birgitta. Prevalence and Diagnosis of Molar-Incisor-
9 Hypomineralisation (MIH): A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010,
10 v. 11, n. 2, p. 59– 64., 2010.

11 JÄLEVIK, Birgitta; KLINGBERG, Gunilla A. Dental treatment, dental
12 fear and behaviour management problems in children with severe enamel
13 hypomineralization of their permanent first molars. *International Journal of*
14 *Paediatric Dentistry*, v. 12, n. 1, p. 24–32, 2002.

15 JÄLEVIK, Birgitta; SZIGYARTO-MATEI, A.; ROBERTSON, A.
16 Difficulties in identifying developmental defects of the enamel: a BITA study.
17 *European Archives of Paediatric Dentistry*, v. 0, n. 0, p. 0, 2019. Disponível
18 em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40368-019-00431-x>>.

19 JAN, Janja; VRBIČ, V. Polychlorinated Biphenyls Cause
20 Developmental Enamel Defects in Children. *Caries Research*, v. 34, n. 6, p.
21 469–473, 2000.

22 JASULAITYTE, Lina; VEERKAMP, J. S.; WEERHEIJM, K. L. Molar
23 incisor hypomineralization: review and prevalence data from the study of
24 primary school children in Kaunas/Lithuania. *European archives of paediatric*
25 *dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, v.
26 8, n. 2, p. 87–94, 2007.

27 JEREMIAS, Fabiano *et al.* Dental caries experience and Molar-Incisor
28 Hypomineralization. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 71, n. 3–4, p. 870–
29 876, 2013.

30 JEREMIAS, Fabiano. Hipomineralização molar-incisivo: prevalência,
31 severidade e etiologia em escolares de Araraquara. Dissertação (Mestrado)
32 Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Odontologia de Araraquara. p.
33 96f, 2010.

34 JEREMIAS, Fabiano *et al.* Inheritance pattern of molar-incisor
35 hypomineralization. *Brazilian oral research*, v. 35, p. e035, 2021.

1 JÚNIOR, Ivam Freire da Silva *et al.* Prevalence and severity of molar
2 incisor hypomineralization in students of Belém, Brazil. *Pesquisa Brasileira*
3 *em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 15, n. 1, p. 377–385, 2015.

4 KATCHBURIAN, Eduardo; ARANA, Victor. *Histologia e Embriologia*
5 *Oral*. v. 4, p. 167–199, 2017.

6 KERR, A. The Impact of Molecular Genetics on Plant Pathology. *Annual*
7 *Review of Phytopathology*, v. 25, n. 1, p. 87–110, 2003.

8 KILINÇ, Gülser *et al.* Prevalence, aetiology, and treatment of molar
9 incisor hypomineralization in children living in Izmir City (Turkey). *International*
10 *Journal of Paediatric Dentistry*, v. 29, n. 6, p. 775–782, 2019.

11 KOCH, Gorän *et al.* Epidemiologic Study Of Idiopathic Enamel
12 Hypomineralization In Permanent Teeth Of Swedish Children. *Community*
13 *Dentistry and Oral Epidemiology*, v. 15, n. 5, p. 279–285, 1987.

14 KONDO, Shinji *et al.* Mutations in IRF6 cause Van der Woude and
15 popliteal pterygium syndromes. *Nature Genetics*, v. 32, n. 2, p. 285–289,
16 2002.

17 KONEMAN, Elmer W *et al.* Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas
18 Colorido. *Brasil - Guanabara Koogan*, v. 7, n. Cap 4, p. 144–182, 2018.

19 KORUYUCU, Mine *et al.* Rethinking isolated cleft lip and palate as a
20 syndrome. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*,
21 v. 125, n. 4, p. 307–312, 2018.

22 KÜCHLER, Erika C. *et al.* MMP1 and MMP20 contribute to tooth
23 agenesis in humans. *Archives of Oral Biology*, v. 56, n. 5, p. 506–511, 2011.

24 KÜHNISCH, Jan *et al.* Elevated serum 25(OH)-vitamin D levels are
25 negatively correlated with molar-incisor hypomineralization. *Journal of Dental*
26 *Research*, v. 94, n. 2, p. 381–387, 2015.

27 KÜHNISCH, Jan *et al.* Genome-wide association study (GWAS) for
28 molar-incisor hypomineralization (MIH). *Clinical Oral Investigations*, v. 18, n.
29 2, p. 677–682, 2014.

30 KÜHNISCH, Jan *et al.* Was molar incisor hypomineralisation (MIH)
31 present in archaeological case series? *Clinical Oral Investigations*, v. 20, n. 9,
32 p. 2387–2393, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-](http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1717-3)
33 [1717-3](http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1717-3)>.

34 LACRUZ, Rodrigo S. *et al.* Dental enamel formation and implications

1 for oral health and disease. *Physiological Reviews*, v. 97, n. 3, p. 939–993,
2 2017.

3 LAISI, Sakari *et al.* Amoxicillin may cause molar incisor
4 hypomineralization. *Journal of Dental Research*, v. 88, n. 2, p. 132–136, 2009.

5 LAUGEL-HAUSHALTER, Virginie *et al.* From the transcription of genes
6 involved in ectodermal dysplasias to the understanding of associated dental
7 anomalies. *Molecular Syndromology*, v. 3, n. 4, p. 158–168, 2012.

8 LETRA, Ariadne *et al.* Interaction between IRF6 and TGFA Genes
9 Contribute to the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *PLoS ONE*, v. 7, n.
10 9, 2012.

11 LINNER, Thomas *et al.* Comparison of four different treatment
12 strategies in teeth with molar-incisor hypomineralization-related enamel
13 breakdown—A retrospective cohort study. *International Journal of Paediatric*
14 *Dentistry*, 2020.

15 LUNT, Roger C; LAW, David B. A review of the chronology of eruption
16 of deciduous teeth. *Journal of the American Dental Association (1939)*, v. 89,
17 n. 4, p. 872–879, 1974. Disponível em:
18 <<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.1974.0484>>.

19 MALKKI, Mari; PETERSDORF, Effie W. Genotyping of single
20 nucleotide polymorphisms by 5' nuclease allelic discrimination. *Methods in*
21 *Molecular Biology*, v. 882, p. 173–182, 2012.

22 MALMBERG, Per; NORÉN, Jörgen G.; BERNIN, Diana. Molecular
23 insights into hypomineralized enamel. *European Journal of Oral Sciences*, p.
24 eos.12619, 2019. Disponível em:
25 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eos.12619>>.

26 MARIA, Camila *et al.* Family-Based Genetic Association for Molar-
27 Incisor Hypomineralization. v. 903, p. 310–318, 2016.

28 MARSH, Philip D *et al.* Influence of saliva on the oral microbiota.
29 *Periodontology 2000*, 2016.

30 MERCHÁN-HAMANN, Edgar; TAUIL, Pedro Luiz; COSTA, Marisa
31 Pacini. Terminologia das medidas e indicadores em epidemiologia: Subsídios
32 para uma possível padronização da nomenclatura. *Informe Epidemiológico*
33 *do Sus*, v. 9, n. 4, p. 273–284, 2000.

34 MORTON, Newton E. Genetic epidemiology, genetic maps and
35 positional cloning. p. 1701–1708, 2003.

1 MULLIS, Kary B. The unusual origin of the polymerase chain reaction.
2 *Scientific American*, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

3 MURRAY, Jeffrey C. Face facts: Genes, environment, and clefts.
4 *American Journal of Human Genetics*, v. 57, n. 2, p. 227–232, 1995.

5 OGDEN, Alan R; PINHASI, R.; WHITE, W. J. Nothing new under the
6 heavens: MIH in the past? *European archives of paediatric dentistry : official*
7 *journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, v. 9, n. 4, p. 166–
8 171, 2008.

9 ÖZÜKOÇ, Can; AKGÖL, Beyza Ballı; MÜNEVVEROĞLU, Aslı Patır.
10 Prevalance of Molar Incisor Hypomineralization: Meta Analysis Study.
11 *Medical Science and Discovery*, v. 7, n. 10, p. 652–658, 2020.

12 PANG, Liangyue *et al.* Interactions with the aquaporin 5 gene increase
13 the susceptibility to molar-incisor hypomineralization. *Archives of Oral Biology*,
14 v. 111, n. December 2019, p. 104637, 2020. Disponível em:
15 <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104637>>.

16 PATEL, Ayesha; AGHABABAIE, Sahar; PAREKH, Susan.
17 Hypomineralisation or hypoplasia? *British Dental Journal*, v. 227, n. 8, p. 683–
18 686, 2019.

19 PORTELLA, Paula Dresch *et al.* *Impact of molar incisor*
20 *hypomineralization on quality of life in children with early mixed dentition: A*
21 *hierarchical approach*. [S.l: s.n.], 2019.

22 RAI, Pooja Mali *et al.* Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization
23 among School Children Aged 9 to 12 Years in Virajpet, Karnataka, India. *Open*
24 *Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, v. 7, n. 6, p. 1042–1046,
25 2019.

26 RAPOSO, Fernanda *et al.* Prevalence of Hypersensitivity in Teeth
27 Affected by Molar-Incisor Hypomineralization (MIH). *Caries Research*, 2019.

28 RÊGO, Marco Antônio V. Estudos Caso-Controle: Uma breve revisão.
29 *Gazeta Médica da Bahia*, v. 80:1, p. 101–110, 2010.

30 REYES, Magdalena Raquel Torres *et al.* Demarcated opacity in primary
31 teeth increases the prevalence of molar incisor hypomineralization. *Brazilian*
32 *oral research*, v. 33, p. e048, 2019.

33 RODD, Helen D. *et al.* Molar incisor hypomineralisation: current
34 knowledge and practice. *International Dental Journal*, p. 1–7, 2020.

1 RODD, Helen D.; BOISSONADE, Fiona M.; DAY, Peter F. Pulpal Status
2 of Hypomineralized Permanent Molars. *Pediatric Dentistry*, v. 6, 2007.

3 SCHNEIDER, Paul M.; SILVA, Margarita. Endemic Molar Incisor
4 Hypomineralization: a Pandemic Problem That Requires Monitoring by the
5 Entire Health Care Community. *Current Osteoporosis Reports*, v. 16, n. 3, p.
6 283–288, 2018.

7 SCHWENDICKE, Falk *et al.* Corrigendum to “Global burden of molar
8 incisor hypomineralization” *Journal of Dentistry* - 2018. *Journal of Dentistry*, v.
9 80, p. 89–92, 2019. Disponível em:
10 <<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.11.006>>.

11 SCHWENDICKE, Falk *et al.* Global burden of molar incisor
12 hypomineralization. *Journal of Dentistry*, v. 68, n. December, p. 10–18, 2018.
13 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.002>>.

14 SÉ, Maria Jose da Silva Figueiredo *et al.* Are hypomineralized primary
15 molars and canines associated with molar-incisor hypomineralization?
16 *Pediatric Dentistry*, v. 39, n. 7, p. 445–449, 2017.

17 SILVA, Mihiri J *et al.* Etiology of Hypomineralized Second Primary
18 Molars: A Prospective Twin Study. *Journal of Dental Research*, v. 98, n. 1, p.
19 77–83, 2019.

20 SLAVKIN, Harold C. From Phenotype to Genotype: Enter Genomics
21 and Transformation of Primary Health Care around the World. *Journal of*
22 *Dental Research*, v. 93, n. 7, p. 3S-6S, 2014.

23 SMITH, Claire Elizabeth Leigh *et al.* A fourth KLK4 mutation is
24 associated with enamel hypomineralisation and structural abnormalities.
25 *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.

26 SOUZA, Tayla Cavallari De. Hipomineralização molar-incisivo e
27 doença cárie: Estudos de base genética e fatores associados (Tese). n. 47,
28 p. 10, 2019.

29 SOVIERO, Vera *et al.* Prevalence and distribution of demarcated
30 opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-
31 year-old Brazilian children. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 67, n. 3, p.
32 170–175, 2009.

33 SUCKLING, Grace W. Developmental defects of enamel--historical and
34 present-day perspectives of their pathogenesis. *Advances in dental research*,
35 v. 3, n. 2, p. 87–94, 1989.

1 SUNDFELD, Daniel *et al.* Molar incisor hypomineralization: Etiology,
2 clinical aspects, and a restorative treatment case report. *Operative Dentistry*,
3 v. 45, n. 4, p. 343–351, 2020.

4 TARGINO, Andrea Gadelha Ribeiro *et al.* The relationship of enamel
5 defects and caries: A cohort study. *Oral Diseases*, v. 17, n. 4, p. 420–426,
6 2011.

7 TEIXEIRA, Rafael José Pio Barbosa *et al.* Exploring the association
8 between genetic and environmental factors and molar incisor
9 hypomineralization: evidence from a twin study. *International Journal of*
10 *Paediatric Dentistry*, v. 28, n. 2, p. 198–206, 2017.

11 TOURINO, Luciana Fonseca Pádua Gonçalves *et al.* Association
12 between molar incisor hypomineralization in schoolchildren and both prenatal
13 and postnatal factors: A population-based study. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1–
14 12, 2016.

15 TREVILATTO, Paula Cristina; LINE, Sérgio R P. Use of buccal
16 epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Forensic*
17 *Odontostomatol*, p. 6–9, 200AD.

18 TUFEKCI, Ebru D *et al.* TGF α / HinfI Polymorphisms Contribute to
19 Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in Turkish Patients. *Genetic Testing and*
20 *Molecular Biomarkers*, v. 22, n. 9, p. 568–573, 2018.

21 VALARINI, Natália *et al.* Molecular biology in dentistry: methods
22 commonly used in cariology. v. 10, n. 1, p. 19–23, 2011.

23 VIEIRA, Alexandre Rezende *et al.* Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6)
24 and Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) Contribute to Human Tooth
25 Agenesis. *Am J Med Genet A.*, v. 221, n. 143A(6), p. 538–545, 2007.

26 VIEIRA, Alexandre Rezende *et al.* MSX1, PAX9, and TGFA Contribute
27 to Tooth Agenesis in Humans. p. 723–727, 2004.

28 VIEIRA, Alexandre Rezende; MANTON, David J. On the Variable
29 Clinical Presentation of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Research*,
30 2019.

31 WALSHAW, Emma Grace *et al.* Molar incisor hypomineralisation and
32 dental anomalies: A random or real association? *International Journal of*
33 *Paediatric Dentistry*, v. 30, n. 3, p. 342–348, 2020.

34 WEERHEIJM, Karin L. Molar Incisor Hypomineralisation (MIH).
35 *European Journal of Paediatric Dentistry*, 2003.

1 WEERHEIJM, Karin L; JALEVIK, B; ALALUUSUA, S. Molar-Incisor
2 Hypomineralisation. *Caries Research*, p. 390–391, 2001.

3 WHATLING, Rosemary; FEARNE, Janice M. Molar incisor
4 hypomineralization: A study of aetiological factors in a group of UK children.
5 *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 18, n. 3, p. 155–162, 2008.

6 WILCOX, Josiah N; DERYNCK, Rik. Developmental expression of
7 transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Molecular and*
8 *Cellular Biology*, v. 8, n. 8, p. 3415–3422, 1988.

9 WOGELIUS, Pia; HANSEN VIUFF, Jakob; HAUBEK, Dorte. Use of
10 Asthma Drugs and Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization.
11 *International Journal of Paediatric Dentistry*, n. November 2019, p. 1–7, 2020.

12 WU, Xiaoyan *et al.* Association of molar incisor hypomineralization with
13 premature birth or low birth weight: systematic review and meta-analysis.
14 *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 33, n. 10, p. 1700–1708,
15 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1527310>>.

16 WUOLLET, Emma *et al.* Molar-incisor hypomineralization and the
17 association with childhood illnesses and antibiotics in a group of Finnish
18 children. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 74, n. 5, p. 416–422, 2016.

19 ZHANG, Chen Zi *et al.* Saliva in the diagnosis of diseases. *International*
20 *Journal of Oral Science*, v. 8, n. 3, p. 133–137, 2016. Disponível em:
21 <<http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.38>>.

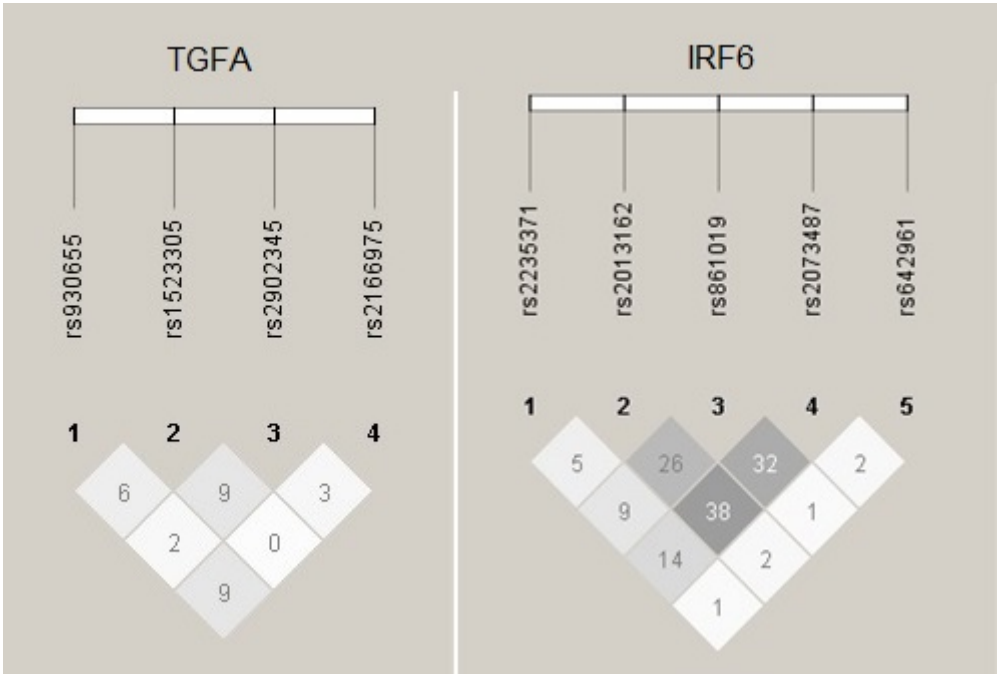
22 ZHAO, Dongdong *et al.* The prevalence of molar incisor
23 hypomineralization: evidence from 70 studies. *International Journal of*
24 *Paediatric Dentistry*, v. 28, n. 2, p. 170–179, 2018.

25

26

9. APÊNDICES

A. Desequilíbrio de ligação entre os tagSNPs selecionados para cobertura do gene *TGFA* e similar seleção para o gene *IRF6*.



Legenda: Os números posicionados interiormente nos quadrados indicam a proporção de desequilíbrio de ligação (DL), em porcentagem (%), calculado utilizando-se o parâmetro r^2 (coeficiente de determinação). As cores dos quadrados indicam a intensidade de DL entre dois *loci*. Quando mais escuro, maior o DL entre os SNP.

Fonte: Dados do trabalho.

B. Questionário da pesquisa:

Data: ____/____/____ **Nº Protocolo:** _____

Data de nascimento: ____/____/____

Idade: _____ **Sexo:** () F () M **Cor:** _____

() Parto cesário () Parto normal

Peso ao nascer: _____ kg **Comprimento:** _____ cm

Prematuro: () Sim () Não

Primeiro filho(a)? () Sim () Não, quantos irmão(s): _____

Condição socioeconômica familiar (renda mensal):

() Até 01 salário mínimo (até R\$ 914,00) () Até 02 salários mínimos (até R\$ 1829,64,00) () Até 03 salários mínimos (R\$ 2744,46) () Até 04 salários mínimos (R\$ 3659,28) () 05 ou mais salários mínimos (R\$ 4574,10)

Fatores de risco associados com o desenvolvimento de defeitos de esmalte dentário em dentes permanentes

1. Alterações durante a gestação: () febre alta () diabetes () pressão alta () uso de medicamentos () exposição a fumaça de cigarro () mãe fumante
outros: _____

2. Ingestão de álcool durante a gestação: () Nunca 1) Mensalmente ou menos () De 2 a 4 vezes por mês () De 2 a 3 vezes por semana

3. Infecção respiratória 0-3 anos de idade: () Sim () Não

4. Doença celíaca: () Sim () Não

6. Exposição à fumaça de cigarro (de outros fumantes) 0-3 anos de idade: () Sim () Não

7. Exposição à fumaça de cigarro (da mãe) 0-3 anos de idade: () Sim () Não

- 1 8. Otite 0-3 anos de idade: () Sim () Não
- 2 9. Infecção do trato urinário 0-3 anos de idade: () Sim () Não
- 3 10. Asma 0-3 anos de idade: () Sim () Não
- 4 11. Febre alta 0-3 anos de idade: () Sim () Não
- 5

1 C. Odontograma:

2

3

4

Código	Definição	5
0	Nenhum defeito de esmalte visível	6
1	Defeito de esmalte visível não HMI	7
2	Opacidades demarcadas: branca, amarela ou marrom	8
3	Fratura pós eruptiva do esmalte	9
4	Restauração atípica	10
5	Lesão Cariosa Atípica	
6	Ausente devido HMI	
7	Não pode ser codificado	

11

12

55	54	53	52	51	61	62	63	64	65		
16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26
46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75		

1 D. Fotografia de paciente com HMI:

2

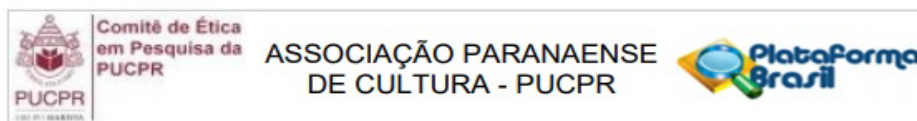
3

4



110. ANEXOS

2 Parecer do Comitê de Ética



Continuação do Parecer: 1.971.986

Objetivo da Pesquisa:

São identificados no projeto os seguintes objetivos: "Objetivo Primário: O objetivo geral desta pesquisa será aplicar uma estratégia de análise de associação caso-controle para investigar, em uma população sul-brasileira, a participação de polimorfismos na suscetibilidade à MIH. Objetivo Secundário: Analisar as variáveis distais e proximais que predispõem a MIH e testar polimorfismos em genes candidato."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora apresenta os seguintes Riscos e Benefícios para a pesquisa: "Riscos:

Os riscos pertinentes a esta pesquisa referem-se basicamente a um constrangimento por parte das crianças no momento do exame clínico e aos pais/responsáveis ao responder o questionário. No entanto, para que este desconforto seja evitado, tanto o exame quanto a aplicação do questionário será feito isoladamente e de maneira reservada. Benefícios:

O benefício desta pesquisa será a identificação/diagnóstico da doença e o encaminhamento para tratamento com um profissional competente na PUCPR - Curitiba."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de relevância acadêmico-científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos de apresentação obrigatória, em conformidade com as Resoluções nºs 466/12 e 510/16, ambas do CNS.

Recomendações:

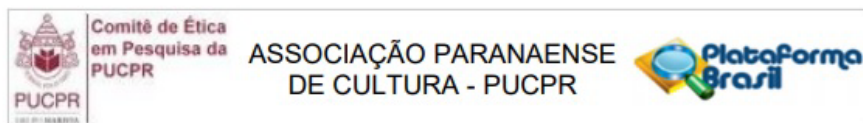
Projeto de pesquisa aprovado, porém a pesquisadora deverá providenciar o cumprimento das seguintes recomendações:

a) No TCLE dos pais para a participação dos filhos (documento "autorizacao_pais.docx"), o item Ressarcimento e Indenização, deverá ser alterado, nos mesmos moldes que foi feito no "tcle_pais_pesquisa.docx"; com a previsão do pagamento de eventuais despesas com a pesquisa, em conformidade com a exigência da Resolução 466/12. Sugestão de texto: "Caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, bem como a meu acompanhante, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma de dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei."

b) Por entendimento firmado por este comitê, solicita-se que no documento "Declaração_Instituição", seja retirado a logo da PUCPR.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

1
2
3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de associação genética da Hipomineralização Molar- Incisivo

Pesquisador: Tayla Cavallari

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 58563616.8.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.971.986

Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora: "A hipomineralização molar-incisivo (HMI) consiste em uma patologia de origem sistêmica, caracterizada por um defeito qualitativo na mineralização do esmalte dentário, podendo atingir de um até os quatro primeiros molares permanentes, frequentemente associada aos incisivos permanentes. Embora vários fatores causais

DADOS DO PARECER

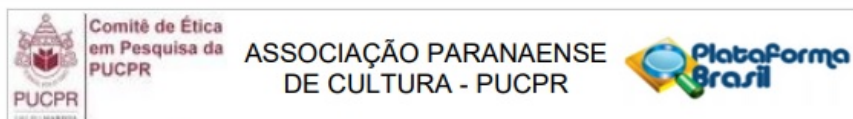
Número do Parecer: 1.971.986

Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora: "A hipomineralização molar-incisivo (HMI) consiste em uma patologia de origem sistêmica, caracterizada por um defeito qualitativo na mineralização do esmalte dentário, podendo atingir de um até os quatro primeiros molares permanentes, frequentemente associada aos incisivos permanentes. Embora vários fatores causais

já tenham sido pesquisados, a etiologia genética ainda é pouco conhecida. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa será aplicar uma estratégia de análise de associação caso-controle para investigar, em uma população sul-brasileira, a participação de polimorfismos na suscetibilidade à MIH. Serão recrutadas 324 crianças das escolas Municipais de Curitiba, sendo 162 com MIH (grupo caso) e 162 sem MIH(grupocontrole). O diagnóstico da doença será realizado de acordo com os critérios estabelecido por Ghanin. As células serão obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose 3%. Um questionário abordando os possíveis fatores causais será encaminhado aos pais/responsáveis das crianças. A extração do DNA será realizada com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM. Os genes candidatos serão selecionados com base no International HapMap Project. Análises estatística, uni, bi e multivariada serão conduzidas."

1
2



Continuação do Parecer: 1.971.986

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado, pois em consonância com os ditames legais e éticos das Resoluções nºs 466/12 e 510/16 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

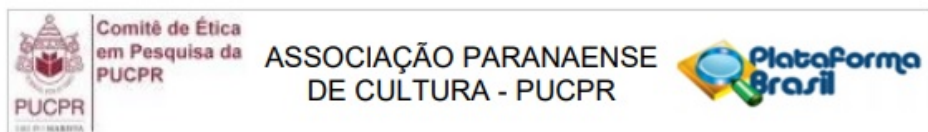
Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê.

Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_738079.pdf	22/02/2017 15:26:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	autorizacao_pais.docx	22/02/2017 15:26:15	Tayla Cavallari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_pais_pesquisa.docx	22/02/2017 15:26:05	Tayla Cavallari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento.docx	22/02/2017 15:25:53	Tayla Cavallari	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	22/02/2017 15:25:16	Tayla Cavallari	Aceito
Outros	respostas_ao_comite.docx	22/02/2017 15:24:29	Tayla Cavallari	Aceito
Outros	questionario.docx	13/10/2016 13:13:13	Tayla Cavallari	Aceito
Declaração de	declaracao_instituicao.docx	13/10/2016	Tayla Cavallari	Aceito

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 1.971.986

Instituição e Infraestrutura	declaracao_instituicao.docx	13:06:24	Tayla Cavallari	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.docx	13/10/2016 13:04:06	Tayla Cavallari	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 20 de Março de 2017

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br