



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



FABIANO JEREMIAS

AVALIAÇÃO GENÉTICA DA HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto

Araraquara

2013

Jeremias, Fabiano

Avaliação genética da hipomineralização molar-incisivo /
Fabiano Jeremias.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

101 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos
Santos-Pinto

1. Esmalte dentário 2. Amelogênese 3. Cárie dentária
4. Polimorfismo genético Título

FABIANO JEREMIAS

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DA
HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Raquel Mantuanéli Scarel-Caminaga

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves

4º Examinador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Hérica Adad Ricci Donato

Araraquara, 18 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES

FABIANO JEREMIAS

Nascimento: 27/01/1982 – São Sebastião do Paraíso / MG

Filiação: João Batista Jeremias e Irene Cândida Honório Jeremias

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2001-2007: Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

2008-2010: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontopediatria, nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2010-2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontopediatria, nível Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

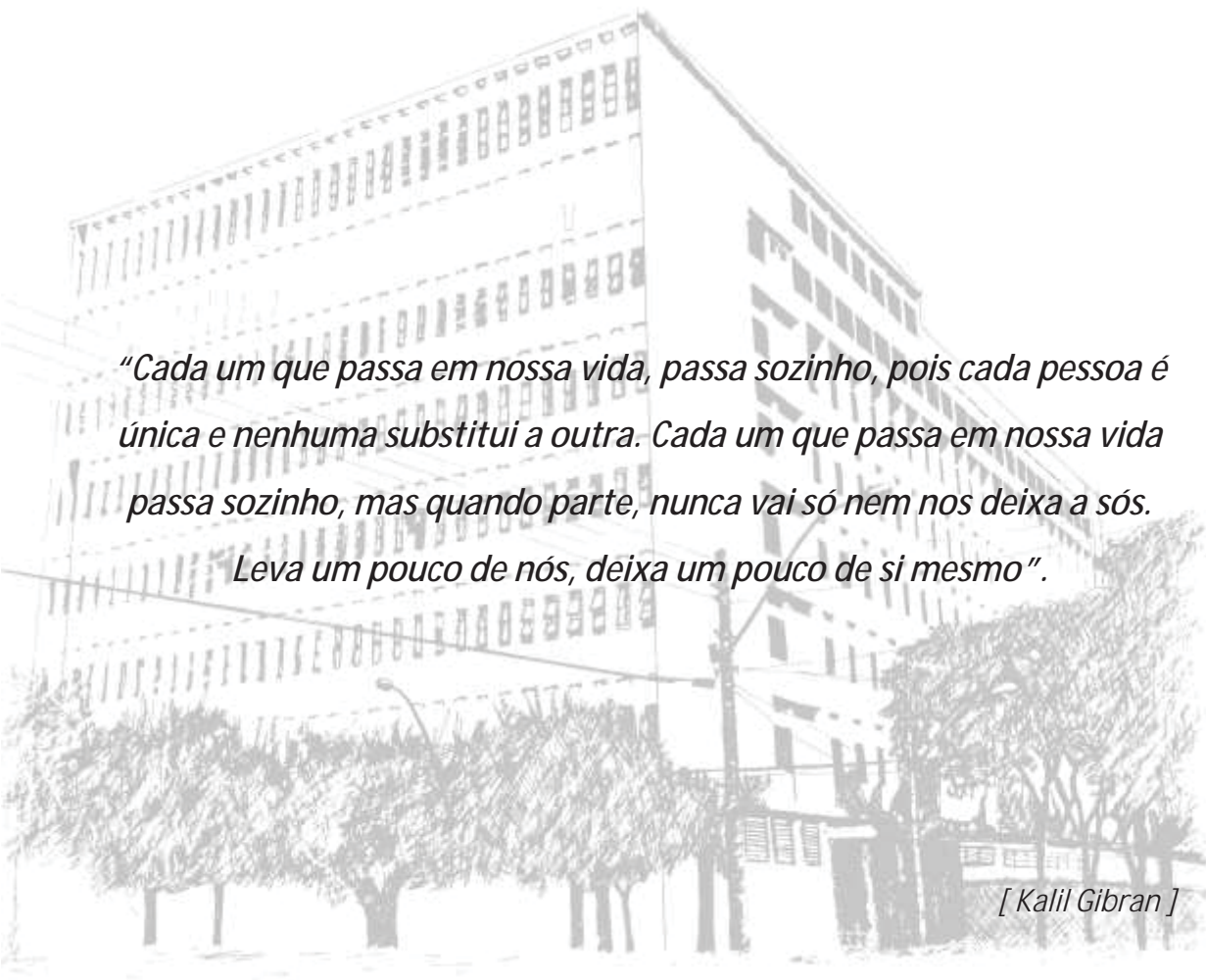
ASSOCIAÇÕES

Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas - APCD

Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia - SBPqO

International Association for Dental Research - IADR

DEDICATÓRIAS



“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo”.

[Kalil Gibran]

Dedico este trabalho ...

Primeiramente a **Deus**, pela vida, pelos meus familiares e amigos. Pela Luz que se faz presente em meu caminho e por toda Sabedoria que me permitiu tomar decisões acertadas. Agradeço pela presença incondicional em minha vida, que tanto me sustentou nos momentos de incertezas. Agradeço por colocar tantas pessoas boas em meu caminho. Agradeço pela família linda que tenho e por todas as oportunidades que tem me dado. Agradeço, sobretudo, pela oportunidade de estar nesse mundo aprendendo e ajudando ao próximo.

A minha querida esposa **Flavia Volpato**,

Pelo incentivo constante para seguir a carreira acadêmica. Por todo suporte que me possibilitou superar diversas dificuldades, sendo sempre minha eterna incentivadora. Agradeço pelas palavras positivas que sempre me faz crer que eu posso ir além. Agradeço por cuidar tão bem do nosso pequeno Lucas, especialmente durante o meu estágio de doutorado sanduíche no exterior. MUITO OBRIGADO !!! AMO VOCÊ !!!

Agradeço pelo amor, dedicação e por se fazer sempre presente.

Ao meu querido filho **Lucas**, um verdadeiro presente de Deus, que enche a casa de alegria e que me faz seguir em frente de cabeça erguida, buscando um futuro melhor para todos nós. Meu filho querido... Agradeço pelo seu

sorriso contagiante, pelo seu olhar expressivo, pelo seu abraço apertado, pelos seus gestos de carinho, pelas horas de brincadeira. Você tornou a minha vida mais leve e cheia de luz..... Muito obrigado por ser meu filho !!!

Aos meus queridos pais **João Batista e Irene Cândida,**

Dedico esta Tese de Doutorado a vocês, que são tudo em minha vida. Agradeço pelo exemplo de caráter, dignidade, honestidade e humildade. Minha felicidade não se realizaria sem a participação de vocês. Obrigado por acreditarem em mim, sempre me apoiando para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Aos meus irmãos **Tatiane e Alexandre,**

Agradeço pelo amor fraterno, pela torcida, pela amizade e união, mesmo que à distância.

Ao sobrinho-afilhado **Fábio,**

Pelo olhar terno, pelos gestos carinhosos, pela sinceridade peculiar e pelo orgulho que sempre demonstrou em ter um “tio dentista”.

Aos meus queridos avós **Vita e Amadeu,**

Por todos ensinamentos, pelo amor incondicional, pelos abraços fortes, pelas palavras doces que tanto me alimentaram, e pelas orações, que sempre me dão forças para superar qualquer obstáculo.

A todos os meus familiares (**Tios, Tias, Primos e Primas**) que sempre estiveram ao meu lado, vibrando com todas as minhas conquistas e me aconselhando nos momentos difíceis.

Aos queridos amigos (de fora da Universidade), em especial **Carlos, Hérica, Laine, Daniela Spirandeli, Régis, Margareth, Felipe, Juliana Derceli, D. Ju, Simone Mastrantonio, Simone Gallão, Elenir, D. Ivone**, obrigado pelo apoio fraterno, compreensões nos momentos difíceis e pelos ensinamentos oferecidos.

Agradecimento especial aos amigos **Juliana Feltrin, Diego Giroto Bussaneli e Manuel Restrepo** por me apoiarem durante a formatação desta tese de doutorado.

Aos amigos da família, em especial **Iolanda, Leila, Magda, Marilisa e Vilma**, meus sinceros agradecimentos pelo apoio durante toda minha vida.

Ao Grupo de Estudos da **Hipomineralização Molar-Incisivo** (**Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto, Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Cilense Zuanon, Camila Maria Bullio Fragelli, Juliana Feltrin de Souza, Marco Aurélio Benini Paschoal, Manuel Restrepo**). Agradeço pelo incentivo mútuo, e pela partilha de experiências pessoais e profissionais, em busca de um objetivo comum.

A vocês **Jú, Camila, Manuel e Marco** muito obrigado pelo companheirismo e trabalho em equipe. Agradeço imensamente pela amizade.

Ao **Ricardo (aluno de graduação),**

Agradeço imensamente por você se dispor a trabalhar comigo neste estudo, dentro outros. Você sempre me surpreende com sua responsabilidade e interesse.... e isto fez com que se estabelecesse uma relação de confiança e amizade entre nós. Agradeço imensamente pela colaboração em todas as etapas desta pesquisa. Desejo um futuro próspero a você e acredite... você o terá. Muito obrigado !!!

A **Prof^a. Dr^a. Fernanda Lopez Rosell,**

Pelo incentivo para seguir a carreira acadêmica. Agradeço pela amizade, pelos aconselhamentos, por acreditar em meu potencial, pelo exemplo de simplicidade e valorização da vida.

Ao **Prof. Dr. Hélio Ferraz Porciúncula (meu primeiro orientador),**

exemplo de Ser Humano, agradeço pelas palavras sábias, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à arte de ensinar. Tais elementos foram essenciais para que eu me apaixonasse pela carreira acadêmica. Muito obrigado pelo apoio, respeito e incentivo.

A **Profª. Drª. Raquel Mantuanéli Scarel-Caminaga,**

Agradeço imensamente por todo apoio que me dispensa, pelos aconselhamentos, pela torcida e pela paciência em ensinar novas técnicas. Me sinto feliz e seguro trabalhando com a senhora. Parablenizo-lhe pelo caráter e humildade. Que sua vida seja ainda mais abençoada com a vinda do Miguel. Muito obrigado por acreditar em meu potencial e me apoiar, incondicionalmente, em todas as etapas deste estudo.

A minha orientadora **Profª. Drª. Lourdes dos Santos-Pinto,**

Sou muito feliz em tê-la como orientadora !!!

Exemplo de dignidade, humanismo e generosidade. Agradeço pela amizade, pelo convívio sincero e harmônico, por incentivar o meu aprimoramento, pela paciência e humildade. Agradeço pela partilha de experiências pessoais e profissionais. Agradeço pelas palavras de incentivo e por sempre me propiciar meios para que eu cresça cada vez mais. São estes os fatores que tornam o meu trabalho muito mais prazeroso. Agradeço pela atenção, pela valiosa orientação e confiança em meu trabalho.

A você Profª. **Tuka,** meu profundo respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

"A gratidão tem três formas: um sentimento no coração, uma expressão em palavras e uma dádiva em retorno".

[George Herbert]



A **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP**, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan e Vice-Reitora, Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr**, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Andreia Affonso Barreto Montandon e sua vice-Diretora, Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao **Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, representado pelo chefe, Prof. Dr. Fábio Cesar Braga de Abreu e Lima e pela Vice-Chefe, Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** coordenado pelo Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior (coordenador) e pela Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins (vice-coordenadora).

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto, Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling Costa, Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima, Prof^a. Dr^a.**

Fernanda Lourenção Brighenti, pelos ensinamentos, atenção e companheirismo.

Aos professores da Disciplina de Ortodontia, **Prof. Dr. Ary dos Santos-Pinto, Prof. Dr. Dirceu Barnabé Ravelli, Prof. Dr. João Roberto Gonçalves, Profª. Drª. Lídia Parsekian Martins, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior e Prof. Dr. Maurício Tatsuei Sakima.**

Aos meus ex-orientadores e sempre amigos **Prof. Dr. Hélio Ferraz Porciúncula, Prof. Dr. Marcelo Gonçalves, Profª. Drª. Elaine Maria Sgavioli Massucato, Profª. Drª. Mirian Aparecida Onofre, Prof. Dr. Aylton Valsecki Junior, Profª. Drª. Fernanda Lopez Rosell, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva, Prof. Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho**, que fizeram de uma simples orientação acadêmica, uma grande e importante amizade.

Ao meu ex-co-orientador e sempre amigo **Prof. Dr. José Silvio Govone** (UNESP-Campus Rio Claro), agradeço pela paciência, ensinamento, humildade e respeito que sempre dispensou a mim durante toda nossa trajetória de trabalho no mestrado.

Aos demais professores da FOAr-UNESP, em especial, **Profª. Drª. Andrea Gonçalves, Profª. Drª. Fernanda Lopez Rosell, Prof. Dr. Aylton**

Valsecki Junior, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva, Prof^a. Dr^a. Elaine Tagliaferro, Prof. Dr. Ary dos Santos-Pinto, Prof^a. Dr^a Elaine Maria Sagavioli Massucato, por acreditarem em meu potencial, suporte fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, **Antonio Parciaseppe Cabrini, Dulce Helena de Oliveira, Sônia Maria Tircailo, Odete Amaral, Marcia Elena Carvalho Held, Cristina Ferreira Affonso, Pedro César Alves, Diego Cardoso Pendenza, Regina Aparecida Favarin e Tânia Ap. Moreira dos Santos**, por oferecerem suporte para a adequada realização das atividades clínicas e científicas.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas e Marley Cristina Chiusoli Montagnoli**, pelo respeito e apoio na formatação da tese.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Mara Candida Munhoz do Amaral e José Alexandre Garcia**, por toda presteza, atenção, paciência e amizade.

Aos demais funcionários da FOAr-UNESP, em especial, **Edneide, Arlete (aposentada), Nilce (aposentada), Mara, Eleine, Vera, Fernanda, Silvia, Keila, Marinho, Marcos, Maria José, Maria do Rosário**

(aposentada), **Regina Lúcia, Cristina, Malú, Elizete, Gláucia, Marcelo, Ronaldo, Pedro, Luís, Nice, Guiomar (aposentada), Noêmia, Nunes, Marcos, Aurelúcia, Ângela, Fátima e Olga**, pela atenção e carinho a mim dedicados desde o período da graduação.

Aos queridos amigos do curso de Doutorado, **Débora, Juliana, Marco, Letícia, Marcia e Marília**, pela amizade, e pelo convívio agradável ao longo de todo esse período.

Aos colegas do curso de **pós-graduação em Ciências Odontológicas - Área Odontopediatria**, pelas experiências compartilhadas e pelo incentivo.

Aos colegas do curso de **pós-graduação em Ciências Odontológicas - Área Ortodontia**, em especial **Sandra, Kélei e Dani** pela amizade, respeito e apoio recíprocos.

Aos amigos do laboratório de Genética Humana (FOAr-UNESP), em especial, **Sâmia, Livia, Suzane, Rafael, Giovana, Sâmara, Guilherme e Profa^a. Dr^a. Ticiane**, agradeço pela generosidade em me esclarecerem algumas questões relacionadas ao laboratório e até mesmo às técnicas. Agradeço pelo convívio harmônico, palavras de amizade e incentivo, e respeito mútuo. Muito obrigado por me acolherem no laboratório.

Aos queridos avós araraquarenses, **D. Lica e Sr. Anízio**, que me acolheram em sua casa quando cheguei à Araraquara para cursar a Odontologia. Transmitiram-me carinho e segurança, num momento de transição que vivia, num misto de incertezas e inseguranças de uma vida nova. Agradeço por nos mantermos ainda tão próximos.

A família **Volpato** que sempre vibrou com minhas conquistas, incentivando sempre o meu crescimento profissional.

Aos **voluntários da pesquisa**, que permitiram a realização do estudo..., meus sinceros agradecimentos por possibilitarem a concretização desta investigação.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro (FAPESP 2011/13636-5) fundamental para a realização e divulgação de todo este estudo.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida para realização de estudos no Brasil e pela bolsa concedida para realização de doutorado sanduíche na Universidade de Pittsburgh-EUA (PDSE-6936/11-3).

A **Prof^a. Dr^a. Claudia V. Maurer-Morelli e ao Dr. Rodrigo Secolin** (Pós-Doc), da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP), que colaboram com os estudos genéticos do grupo HMI. Agradeço imensamente pela generosidade na partilha de conhecimento e por todo suporte que tem me dispensado.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira**, meu orientador estrangeiro (Universidade de Pittsburgh-EUA) durante o meu estágio de doutorado Sanduíche (PDSE), que me recebeu em seu laboratório com muita generosidade. Agradeço imensamente por esta oportunidade.

A **Prof^a. Dr^a. Erika Calvano Kucler** (Universidade de Pittsburgh-EUA), que contribuiu diretamente para a concretização da análise realizada no exterior. Muito obrigado pela paciência e generosidade.

Aos funcionários da Universidade de Pittsburgh-EUA, **Sarah, Kathelen e Meghe**, pela atenção e respeito com que sempre me dirigiram.

Aos **amigos que fiz em Pittsburgh-EUA**, pelo convívio harmônico, e pela troca de experiências culturais, pessoais e profissionais, mesmo que em curto período de tempo.

Aos **professores e alunos da FOAR-UNESP** que me avisavam quando era diagnosticado algum paciente com Hipomineralização de Molar-Incisivo nas clínicas de graduação e pós-graduação.

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

“... Não perca a fé. Estou convencido de que a única coisa que me fez continuar foi que eu amava o que eu fazia. Você precisa encontrar o que você ama. E isso vale para o seu trabalho e para seus amores. Seu trabalho irá tomar uma grande parte da sua vida e o único meio de ficar satisfeito é fazer o que você acredita ser um grande trabalho. E o único meio de se fazer um grande trabalho é amando o que você faz. Caso você ainda não tenha encontrado [o que gosta de fazer], continue procurando. Não pare. Do mesmo modo como todos os problemas do coração, você saberá quando encontrar. E, como em qualquer relacionamento longo, só fica melhor e melhor ao longo dos anos. Por isso, continue procurando até encontrar, não pare!”

“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir !!!”

Steve Jobs

A vertical, microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing cellular structures. The image is overlaid with a blue gradient that is most prominent in the center. The word "RESUMO" is written in white, bold, uppercase letters across the middle of the image.

RESUMO

Jeremias F. Avaliação genética da hipomineralização molar-incisivo [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

Distúrbios genéticos durante o desenvolvimento dentário influenciam na variação do número e formada dentição. Este é o primeiro estudo a avaliar se a variação genética nos genes da formação do esmalte dentário está associada com a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI), levando também em consideração, a experiência de cárie. Amostras de DNA de 71 casos (com HMI) e 89 controles (não afetados) de Araraquara/SP (Brasil) foram analisadas. Onze marcadores em cinco genes [ameloblastina (*AMBN*), amelogenina (*AMELX*), enamelina (*ENAM*), tuftelina (*TUFT1*), e proteína 11 interagindo com tuftelina (*TFIP11*)] foram genotipados pelo método TaqMan. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle. A experiência de cárie no grupo HMI também foi avaliada para a associação com a variação genética nos genes da formação do esmalte. Os marcadores rs3796704 (*ENAM*), rs4694075 (*AMBN*); rs5997096/rs134136 (*TFIP11*), foram associados com a HMI ($p < 0.05$). Associações dos marcadores rs5997096/rs134136(*TFIP11*), rs12640848/rs3796704 (*ENAM*) e rs17878486 (*AMELX*) ($p < 0.05$) com a cárie dentária foram observadas. O presente estudo sugere possibilidade de associação entre o esmalte hipomineralizado e variação genética nos genes da formação do esmalte dentário.

Palavras-chave: esmalte dentário; amelogênese; cárie dentária; polimorfismo genético

A vertical, blue-tinted microscopic image of a plant stem cross-section. The image shows various layers of cells, including a distinct vascular bundle with xylem and phloem. The word "ABSTRACT" is overlaid in white, bold, uppercase letters in the center of the image.

ABSTRACT

Jeremias F. Genetic evaluation of the molar-Incisor hypomineralization. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

Genetic disturbances during dental development influence variation of number and shape of the dentition. This is the first study that tested if genetic variation in enamel formation genes is associated with molar-incisor hypomineralization (MIH), also taking into consideration caries experience. DNA samples from 71 cases with MIH and 89 unaffected controls from Araraquara/SP (Brazil) were studied. Eleven markers in five genes [ameloblastin (*AMBN*), amelogenin (*AMELX*), enamelin (*ENAM*), tuftelin (*TUFT1*), and tuftelin-interacting protein 11 (*TFIP11*)] were genotyped by the TaqMan method. Chi-square was used to compare allele and genotype frequencies between cases with MIH and controls. Distinct caries experience within the MIH group was also tested for association with genetic variation in enamel formation genes. The markers, rs3796704 (*ENAM*), rs4694075 (*AMBN*); rs5997096/rs134136 (*TFIP11*), were associated with MIH ($p < 0.05$). Associations between rs5997096/rs134136 (*TFIP11*), rs12640848/rs3796704 (*ENAM*) e rs17878486 (*AMELX*) ($p < 0.05$) markers could be seen with caries. This study suggests a possible association between hypomineralized enamel and genetic variation in the genes of the enamel formation.

Key Words: dental enamel; amelogenesis; dental caries; genetic polymorphism

A vertical, blue-tinted microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing various cellular structures and layers. The image is slightly blurred, focusing on the central area where the text is located. The word "SUMÁRIO" is overlaid in white, bold, uppercase letters.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	PROPOSIÇÃO	30
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	32
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	46
5	RESULTADO.....	61
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
8	REFERÊNCIAS	79
9	APÊNDICE.....	95
10	ANEXOS	98

A vertical, blue-tinted microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing various cellular structures and layers. The image is used as a background for the title.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado do corpo humano, sendo caracterizado por um processo de desenvolvimento altamente complexo²⁶. Estudos têm demonstrado que as células responsáveis pela formação do esmalte, os ameloblastos, são extremamente sensíveis^{60,74}. Caso ocorra sensibilização durante a fase secretória da amelogênese, uma redução na espessura do esmalte pode ser originada, resultando no defeito de esmalte conhecido como hipoplasia. Contudo, se estas células forem afetadas na fase tardia da mineralização ou maturação do esmalte, um defeito na translucidez deste tecido pode ser induzido, caracterizando uma hipomineralização^{70,80}. Um exemplo desta alteração é a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI), defeito qualitativo, que tem despertado interesse de clínicos e pesquisadores de todo o mundo.

O primeiro relato desta condição foi na Suécia no final dos anos 70⁴⁴. Em 2001 foi referenciada como HMI, com a definição de “uma hipomineralização de origem sistêmica que afeta um ou mais primeiros molares permanentes com ou sem envolvimento dos incisivos permanentes”⁹⁰. A HMI pode ser diferenciada da fluorose dental, que é caracterizada por opacidades difusas que afetam os dentes simetricamente⁸⁸. O diagnóstico diferencial com a amelogênese imperfeita (AI) é fundamentado na distribuição das opacidades; enquanto na HMI raramente os molares são afetados na mesma intensidade; na AI, toda a

dentição ou grupo dentário é afetado, com envolvimento genético comprovado⁹³.

O esmalte poroso da HMI pode fraturar-se com facilidade, principalmente sob influência de forças mastigatórias, deixando a dentina desprotegida e favorecendo o desenvolvimento de lesão cariosa, evidenciando a associação deste defeito com a cárie dentária^{1,4,13,37,40,48,54,63,89}.

As crianças com HMI podem apresentar sensibilidade dentária intensa mediante variações de temperatura⁹⁰ em decorrência da inflamação crônica da polpa, diretamente relacionada à maior inervação da região subodontoblástica sob a área hipomineralizada⁶⁵, fatores estes que dificultam a ação anestésica e subseqüentemente, o manejo da criança^{9,39}.

Além disso, estas crianças apresentam uma probabilidade 10,5 vezes maior de retornar ao consultório para retratamento odontológico comparado às sem a alteração, devido a deficiência mineral da estrutura dentária que desfavorece a adesão de materiais restauradores⁴⁵.

Não há dados conclusivos com relação à etiologia da HMI⁵². Considerando que todo o processo de formação do esmalte dentário está sob controle genético⁷³, é razoável a hipótese de que variações genéticas podem estar associadas a alterações na amelogênese. Neste contexto, é válido ressaltar que mutações genéticas têm sido associadas a diferentes

tipos de amelogênese imperfeita³⁴. Além disso, a susceptibilidade à cárie também tem sido associada com variação genética^{18,58,61,71,72,75,82,85,86}. Portanto, o presente estudo hipotetiza que a variação em genes envolvidos na formação do esmalte contribui para o aumento da experiência de HMI em humanos.

A vertical microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing various cellular structures. The image is stained with blue and red dyes. The blue staining highlights the cell walls and nuclei, while the red staining highlights specific cellular components, possibly chloroplasts or other organelles. The tissue shows a clear arrangement of cells, with some larger, more rounded cells and some smaller, more elongated cells. The overall appearance is that of a cross-section of a plant organ.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

1 Objetivo Geral:

Investigar possíveis polimorfismos nos genes [ameloblastina (*AMBN*), amelogenina (*AMELX*), enamelina (*ENAM*), tuftelina (*TUFT1*), e proteína 11 interagindo com tuftelina (*TFIP11*)] relacionados à fase de maturação da amelogênese na população de Araraquara/SP; além de analisar a possível associação genética com a cárie dentária em indivíduos portadores da Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI).

2 Hipóteses testadas:

1. Não existem alterações nos genes candidatos relacionadas ao processo de maturação do esmalte dentário em indivíduos com a HMI;
2. Variações nos genes envolvidos na formação do esmalte dentário não contribuem para o aumento da susceptibilidade à cárie.



3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Primeiros molares permanentes e incisivos permanentes com hipomineralização de esmalte idiopática foram reconhecidos pela primeira vez na Suécia na década de 1970 (Koch et al.⁴⁴, 1987). Essa condição já foi referida como “primeiros molares permanentes hipomineralizados”, “hipomineralização idiopática do esmalte”, “hipomineralização não fluorótica” e “*cheese molars*”, por diversos autores (Koch et al.⁴⁴, 1987; Leppäniemi et al.⁴⁸, 2001; Weerheijm et al.⁹⁰, 2001; Weerheijm⁸⁸, 2004) devido à ausência de dados conclusivos relativos aos seus fatores etiológicos.

Em 2001, Weerheijm et al.⁹⁰ (2001) sugeriram o termo “Molar Incisor Hypomineralization” (MIH), definindo como uma hipomineralização de origem sistêmica, envolvendo 1 a 4 primeiros molares permanentes, normalmente associados com incisivos permanentes afetados. Essa descrição enfatiza o fato de que os primeiros molares permanentes estão sempre envolvidos quando ocorre a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI), sendo que geralmente esses dentes são acompanhados de manchas demarcadas nos incisivos. Por outro lado, manchas somente nos incisivos permanentes podem indicar defeitos de outras origens,

como injúria traumática ou infecção periapical nos incisivos decíduos, que não são relacionados com a referida condição (Cho et al.¹³, 2008).

Existem estudos que apontam a existência de hipomineralização em outros dentes (Elfrink et al.²², 2008; Elfrink et al.²³, 2012), fato este que sugere uma ampliação na definição de HMI. Elfrink et al.²², (2012), concluíram que a hipomineralização em segundos molares decíduos está relacionada a um risco aumentado de HMI na dentição permanente. A mineralização destes dentes decíduos acontece praticamente ao mesmo tempo em que os primeiros molares permanentes, entretanto é mais acelerada (Elfrink et al.²³, 2012). Independentemente do dente afetado, o fato é que durante anos é possível que estas hipomineralizações estivessem mascaradas pela cárie dentária, e com o declínio desta doença nas últimas décadas (Narvai et al.⁵⁶, 2000; Celeste et al.¹¹, 2007), este defeito de esmalte ficou muito mais evidente, se tornando um dos grandes desafios para clínicos e pesquisadores.

A prevalência da HMI varia no mundo entre 2,4 a 40,2% (Jälevik³⁸, 2010). Dados brasileiros apontam variação entre 12,3% a 40,2% (Soviero et al.⁷⁸, 2009; da Costa-Silva et al.¹⁶, 2010; Jeremias et al.³⁷, 2013). Estudos recentes em países da América Latina apontam registros de 15,9% (Biondi et al.⁷, 2011) e 6,5% (Biondi et al.⁸, 2012). Clinicamente, os defeitos de esmalte desta condição podem variar desde opacidades leves com coloração branca, amarela ou marrom até comprometimento severo do esmalte com perda estrutural súbita quando da irrupção dentária

(Weerheijm⁸⁷, 2003). A severidade do defeito é muito variável, sendo o grau de porosidade do esmalte dentário um dos fatores determinantes do nível de desintegração tecidual (Weerheijm et al.⁹⁰, 2001).

Na tentativa de reduzir a falta de padronização observada nos estudos epidemiológicos, em 2003 foram estabelecidos os critérios para diagnóstico desta alteração de esmalte, sendo a HMI dividida em três escores de severidade: leve, moderado e severo (Weerheijm et al.⁸⁹, 2003). Em 2010, entretanto, esta classificação foi limitada a apenas dois escores: leve e severo. Em outras palavras, se o dente apresenta apenas manchas é considerado leve, mas se apresentar perdas estruturais ou restaurações atípicas é codificado como severo (Lygidakis et al.⁴⁹, 2010).

O esmalte poroso da HMI pode romper-se com facilidade, principalmente sob influência de forças mastigatórias. Na presença de fratura do esmalte, o quadro clínico pode se assemelhar a uma hipoplasia do esmalte (defeito quantitativo durante a fase de secreção de esmalte). Entretanto, na HMI, as margens da área afetada são irregulares, enquanto que na hipoplasia são regulares e arredondadas. As lesões demarcadas na HMI podem ser distinguidas das manchas difusas, típicas de fluorose (Weerheijm⁸⁸, 2004). Defeitos de esmalte (hipomineralização/hipoplasia) que acometem grupos de dentes ou a dentição completa e que tem origem genética associada caracterizam a amelogenese imperfeita, diferenciando da HMI (Weerheijm et al.⁸⁹, 2003; William et al.⁹³, 2006).

Apesar de ser um defeito assimétrico, quando uma lesão severa existe em um elemento dentário, é comum que o contralateral também esteja afetado (Alaluusua et al.², 1996; Weerheijm⁸⁷, 2003). O risco de os incisivos estarem alterados parece ser proporcional ao número de molares acometidos, sendo que raramente apresentam perda de estrutura (Koch et al.⁴⁴, 1987; Jälevik et al.⁴⁰, 2001; Jeremias et al.³⁷, 2013).

A alta porosidade da superfície afetada favorece a adesão do biofilme e também o influxo de bactérias da saliva e placa em direção à polpa, resultando em sinais de inflamação (Rodd et al.⁶⁵, 2007). A hipersensibilidade dentária intensa é um dos maiores problemas, sendo frequente mediante variações de temperatura (Weerheijm et al.⁹⁰, 2001). O mais provável é que seja decorrente da inflamação crônica da polpa, diretamente relacionada à maior inervação da região subodontoblástica sob a área hipomineralizada (Rodd et al.⁶⁶, 2007), fatores estes que dificultam a ação anestésica e subseqüentemente, o manejo da criança (Jälevik, Klingberg⁴¹, 2002; Preusser et al.⁶³, 2007). A dentina quando desprotegida favorece o desenvolvimento de lesão cariosa (Jälevik et al.⁴⁰, 2001; Weerheijm⁸⁷, 2003), evidenciando a associação da presença destes defeitos com a cárie dentária (Leppäniemi et al.⁴⁸, 2001; Balmer et al.⁴, 2005; Preusser et al.⁶³, 2007; Cho et al.¹³, 2008).

A idade dos pacientes apresentarem estes problemas é mais frequente entre 6 e 9 anos de idade. Muitos deles se submetem a extensivos tratamentos dentários, especialmente nos casos severos de

HMI. Desta maneira, crianças com o referido diagnóstico apresentam uma probabilidade 10,5 vezes maior de retornar ao consultório para atendimento odontológico comparado às sem a alteração (Jälevik, Klingberg⁴¹, 2002; Kotsanos et al.⁴⁵, 2005; Jälevik, Klingberg³⁹, 2012). Em um estudo mais recente, observou-se que crianças acometidas retornaram ao consultório três vezes mais devido a dor e seis vezes mais devido a queixas de sensibilidade (Ghanim et al.³⁰, 2012).

Histologicamente, apenas parte do esmalte afetado é hipomineralizado, mas nunca o esmalte como um todo. Existem áreas normais, especialmente na região cervical do dente; embora as razões ainda permaneçam desconhecidas. Um dos grandes desafios é que materiais restauradores não se aderem (adesivamente) ao tecido hipomineralizado, sendo comum perdas precoces de restaurações e/ou fraturas das bordas das restaurações (Kotsanos et al.⁴⁵, 2005).

Reconhecer clinicamente essa condição, identificar as suas causas e estabelecer o seu diagnóstico diferencial é fundamental para a condução clínica do paciente afetado. Desta maneira, o conhecimento epidemiológico e etiopatogênico da doença é um importante indicador para definição de ações de promoção de saúde bucal. Diante do exposto, as crianças em risco devem ser monitoradas cuidadosamente durante o período de irrupção dos seus primeiros molares permanentes. Ao se planejar o tratamento, deve-se considerar o prognóstico em longo prazo destes dentes, sendo este decidido junto aos familiares, pois o mesmo

pode variar desde uma terapia remineralizadora até exodontia acompanhada de tracionamento ortodôntico (Lygidakis⁴⁹, 2010; Gandhi et al.²⁸, 2012; Jälevik, Klingberg³⁹, 2012; Mastroberardino et al.⁵³, 2012).

A HMI deve ser considerada não como uma entidade completamente nova de uma doença, mas sim uma condição melhor diagnosticada como uma doença cada vez menos prevalente, a cárie dentária.

ASPECTOS ETIOLÓGICOS

A formação do esmalte é dividida em três fases principais. Na fase secretora, os ameloblastos secretam grandes quantidades de proteínas da matriz do esmalte no qual longas fitas finas de mineral do esmalte, principalmente hidroxiapatita, formam-se rapidamente. Os cristais de esmalte crescem principalmente em comprimento e a camada de esmalte cresce em espessura. O estágio de maturação se inicia quando a espessura do esmalte é completada, e os ameloblastos secretórios transformam-se, por meio de uma fase de transição curta, em ameloblastos maduros responsáveis pela degradação da matriz do esmalte, seguido de mineralização. Na mineralização final, a camada de esmalte endurece devido ao aumento dos cristais em largura e

espessura, o que resulta em um tecido mineralizado, que contém mais de 95%, em peso, de minerais (Alaluusua¹, 2010).

Os primeiros molares permanentes começam a se desenvolver durante o quarto mês de gestação. As quatro cúspides se unem próximo dos seis meses de vida, e durante o primeiro ano é completada a deposição de matriz de esmalte no terço oclusal da coroa, e assim, a maturação é iniciada (Suga⁸¹, 1989; Alaluusua¹, 2010). O período mais crítico para defeitos no esmalte de primeiros molares e incisivos permanentes é o primeiro ano de vida, que coincide com o início da maturação do esmalte (Alaluusua¹, 2010). Entretanto, como a maturação do esmalte dos primeiros molares permanentes se estende por anos, a hipomineralização pode se desenvolver até os 3 anos de idade.

Alguns achados sugerem que a presença de defeitos de desenvolvimento de esmalte é maior em áreas onde o esmalte é espesso (Needleman et al.⁵⁷, 1991; Jälevik et al.⁴³, 2001), sugerindo que essas áreas demandam maior atividade metabólica dos ameloblastos produzindo esmalte rápido, se tornando ao mesmo tempo, vulneráveis a qualquer insulto. Segundo Needleman et al.⁵⁷ (1991), um distúrbio metabólico severo pode afetar todos os dentes e superfícies, enquanto que se moderado pode afetar a atividade dos ameloblastos mais ativos ou acelerar a maturação do esmalte. Alguns ameloblastos podem se recuperar frente ao insulto, mas acabam atuando de maneira deficiente. Geneticamente, um insulto isolado geralmente não é suficiente para o

desenvolvimento de um determinado fenótipo, entretanto dois ou mais insultos podem levar a uma mutação em um alelo funcional anterior e, conseqüentemente, a um fenótipo bem conhecido (Dimaras et al.²⁰, 2012).

O fato é que apenas dados limitados estão disponíveis para descrever a magnitude do fenômeno (HMI), caracterizando a necessidade crescente de evidências para identificação dos diferentes fatores que sensibilizam os ameloblastos desde o período pré-natal até os três primeiros anos de vida da criança (Alaluusua et al.², 1996; Weerheijm et al.⁹⁰, 2001; Beentjes et al.⁶, 2002; Preusser et al.⁶³, 2007; Whatling, Fearne⁹², 2008; Laisi et al.⁴⁷, 2009).

Os fatores associados com a HMI incluem condições sistêmicas e ambientais. Crianças com problemas respiratórios, complicações pré-natais, baixo peso ao nascimento, desordens metabólicas de cálcio e fosfato e doenças de infância acompanhadas de febre alta (Alaluusua¹, 2010) nos três primeiros anos de vida têm risco aumentado de apresentar a condição. Certos poluentes ambientais, como a dioxina e o furano, também podem aumentar o risco de se desenvolver a HMI via leite materno, o uso de mordedores, chupetas e mamadeiras de plástico também são fatores associados. A ingestão de antibióticos também foi apontada como possível fator etiológico, entretanto, não é fácil definir se a alteração foi causada pela doença ou pelo tratamento, havendo diversas controversas na literatura (Jälevik et al.⁴³, 2001; Tapias-Ledesma et al.⁸³,

2003; Hong et al.³⁵, 2005; Whatling, Fearne⁹², 2008; Crombie et al.¹⁴, 2009; Laisi et al.⁴⁷, 2009; Phipps⁶², 2012). A combinação de antibióticos com fluoreto de sódio ainda pode potencializar o efeito nocivo na formação do esmalte (Sahlberg et al.⁶⁷, 2013). Há algumas evidências para vincular a desnutrição infantil a um aumento da prevalência de defeitos do esmalte, mas ainda é necessária investigação para confirmar qualquer relação direta. Mais recentemente, fatores como estresse psicológico materno, exposição freqüente a exames de ultra-som durante o último trimestre de gestação foram reportados (Ghanim et al.²⁹, 2013). Em um estudo recente do Brasil (Souza et al.⁷⁷, 2012), os autores observaram uma associação mais frequente de HMI com distúrbios durante a gravidez e/ou infância (3 anos de vida), em crianças de áreas rurais comparado as de áreas urbanas. Em contrapartida, outro estudo observou que residir próximo de áreas industriais aumenta o risco de se apresentar defeitos de esmalte, especialmente os difusos (Arrow³, 2009).

Os resultados muito contraditórios em relação aos fatores ambientais, assim chamados, não oferecem segurança absoluta quanto à etiologia. Nenhuma das patologias associadas até então, é nova ou ainda desconhecida. Por exemplo, quase todas as crianças passam pela experiência de patologias sistêmicas, acompanhadas de um ou mais episódios de febre, infecções do trato respiratório, otite média, asma, ou distúrbio metabólico. Além disso, muitas são tratadas com antibióticos. Muito provavelmente, são amamentadas, no mínimo, até seis meses de

vida. Parece provável que a susceptibilidade genética possa desempenhar um papel importante na etiologia desta HMI (Alaluusua¹, 2010; Jeremias et al.³⁷, 2013). Neste contexto, como explicar dentes (molares e incisivos permanentes) que se desenvolvem tão próximos, cronologicamente e ao mesmo tempo são afetados de maneira tão distinta. Do ponto de vista puramente biológico, estão mais relacionados a regulação temporoespacial (alteração genes envolvidos na amelogênese) do que a qualquer outra associação etiológica. Sem considerar possível modulação epigenética (controle sobre a genética), continua inexplicável como uma causa sistêmica isolada possa atuar de maneira tão seletiva (Frazier-Bowers et al.²⁷, 2010).

Na prática clínica, é muito comum observar familiares que apresentam a HMI e correlação desta com experiência de cárie dentária. Whatling, Fearne⁹² (2008) relataram que históricos de defeitos de esmalte na família estiveram mais relacionados a crianças com HMI. Contudo, ainda não existem dados conclusivos quanto à etiologia da HMI (Alaluusua¹, 2010). Ao mesmo tempo, a literatura ainda não apresenta resposta a uma das grandes questões relacionadas a esta condição: seria a HMI uma doença autossômica recessiva ou uma forma desconhecida de amelogênese imperfeita? Considerando que todo o processo de amelogênese está sob controle genético (Simmer, Hu⁷³, 2001), entende-se que a identificação de genes envolvidos em doenças humanas tem importante papel na compreensão da fisiopatologia da doença, além de

propiciar novos conhecimentos sobre mecanismos biológicos normais. A susceptibilidade a cárie dentária também está relacionada à variação genética, segundo evidências que buscam fornecer novas estratégias para resolução desta doença (Slayton et al.⁷⁵, 2005; Deeley et al.¹⁸, 2008; Patir et al.⁶¹, 2008; Vieira et al.⁸⁵, 2008; Vieira et al.⁸⁴, 2011).

Apesar de algumas publicações discutirem uma possível predisposição genética para HMI (Jälevik, Norén⁴², 2000; Lygidakis et al.⁵¹, 2008; Whatling, Fearné⁹², 2008; Alaluusua¹, 2010; Elfrink et al.²³, 2012; Jeremias et al.³⁷, 2013), até o momento não há relato na literatura de estudos desta associação. Nas pesquisas que tratam de etiologia, não há registro de nenhuma distinção entre gêmeos monos ou dizigóticos, os pais não costumam ser examinados para detectar quaisquer sinais de hipomineralização em seus dentes, e o comprometimento dos dentes afetados usualmente não é pontuado. Desta maneira, nenhuma relação familiar pode ser afirmada. Em 2010, um documento de orientação sobre HMI foi publicado (Lygidakis et al.⁵², 2010), sendo fortemente recomendada a investigação de gêmeos de maneira detalhada.

No estudo de Jälevik, Norén⁴² (2000) há relatos de irmãos com molares afetados e mancha branca nos incisivos permanentes, mas nenhum registro foi realizado em outro membro da família. Outro estudo apenas questionou as mães sobre seus dentes, mas não verificou se apresentava dentes afetados (Lygidakis et al.⁵⁰, 2008). Enquanto nenhum registro dentário de vários membros da família da criança afetada é

tomado, a fim de se caracterizar a linhagem, a hipótese de que alguns genes possam estar envolvidos na HMI permanece apenas especulativa.

O principal problema quando se examina pais das crianças afetadas pela HMI é avaliar se os dentes índice (molares e incisivos permanentes) apresentam sinais do defeito. O fato é que pertencem a uma geração que apresenta muitas restaurações, embora, não se compare a geração antecessora. Qualquer diagnóstico retrospectivo com relação a sinais de HMI nos pais pode ser sobreposto por suas restaurações e, na maioria das vezes não podem ser claramente distinguidos se estes são devido à cárie ou ao defeito de esmalte. Quando não há clinicamente nenhuma opacidade associada ao dente restaurado, o que se pode presumir é que qualquer restauração com formas atípicas pode estar associada a hipomineralização. Desta maneira, apenas o dente anterior (incisivo permanente) permanece como um preditor mais confiável, quando o clínico se depara com uma situação duvidosa. Entretanto, é válido enfatizar que apenas em alguns casos, os incisivos também são afetados.

Desta maneira, são necessários estudos epidemiológicos prospectivos em longo prazo que utilizem protocolos clínicos claramente definidos, além de índices, que incluam de maneira abrangente, a coleta de informações ambientais e genéticas (Crombie et al.¹⁴, 2009).

Neste contexto, o teste de genes candidatos é uma estratégia bastante eficiente e rápida para avaliação da relação genótipo-fenótipo.

Um método bastante usado para testar genes candidatos é o estudo de associação, visando determinar se uma variação em um gene está associada a doença. Para se avaliar genes candidatos, os Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polimorphisms*) são bastante úteis. SNPs são variações na seqüência de DNA freqüentes entre indivíduos e por isso mesmo, com grande potencial de uso como marcador genético para a localização de genes causadores de doenças (Goldstein, Cavalleri³³, 2005).

É preciso investigar se existe susceptibilidade genética na HMI. Neste contexto, o presente estudo procurou avaliar o processo de maturação de esmalte dentário, por meio da investigação genética de alguns genes envolvidos nessa fase complexa da amelogênese. Além disso, avaliou a associação genotípica de alguns genes responsáveis pela formação do esmalte com a cárie dentária. Acredita-se que esclarecimentos com relação a biologia molecular sejam fundamentais para o melhor entendimento dessa condição que tanto tem desafiado os clínicos de todo o mundo.

A vertical, blue-tinted microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing various cellular structures and layers. The image is used as a background for the text.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Amostragem

A amostra deste estudo foi composta por 71 indivíduos diagnosticados com a HMI (caso) e 89 indivíduos não afetados (controle), segundo os critérios da Academia Européia de Odontopediatria (Weerheijm et al.⁸⁹, 2003) (Anexo 1). A amostra foi composta por crianças e adultos. O estudo teve início após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices 1A e 1B), mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (protocolo #45/10) (Anexo 2). Foram excluídos indivíduos que apresentavam qualquer outro tipo de defeito de esmalte associado, além de evidência de síndromes e uso de aparelho ortodôntico fixo.

No cálculo amostral, realizado para avaliar o poder estatístico do estudo, foram considerados: 1. Parâmetros da população a ser investigada; 2. estrutura familiar e 3. parâmetros relacionados ao poder estatístico. A fim de se avaliar o poder ($1 - \beta$) de detectar associação genética com a presente amostra, foi utilizado o programa TDT POWER CALCULATOR (Chen e Deng¹², 2001), utilizando um grau de significância $\alpha_{\text{corrigido}} = 0,002$ ajustado para múltiplos testes, por meio de correção de Bonferroni (Drăghici²¹, 2003) e uma prevalência da doença de 12,3% na população (Jeremias et al.³⁷, 2013). Foi constatado que a utilização do

número amostral previsto produziria resultados com poder estatístico para detectar associação entre os genes investigados e a doença ($1 - \beta > 80\%$).

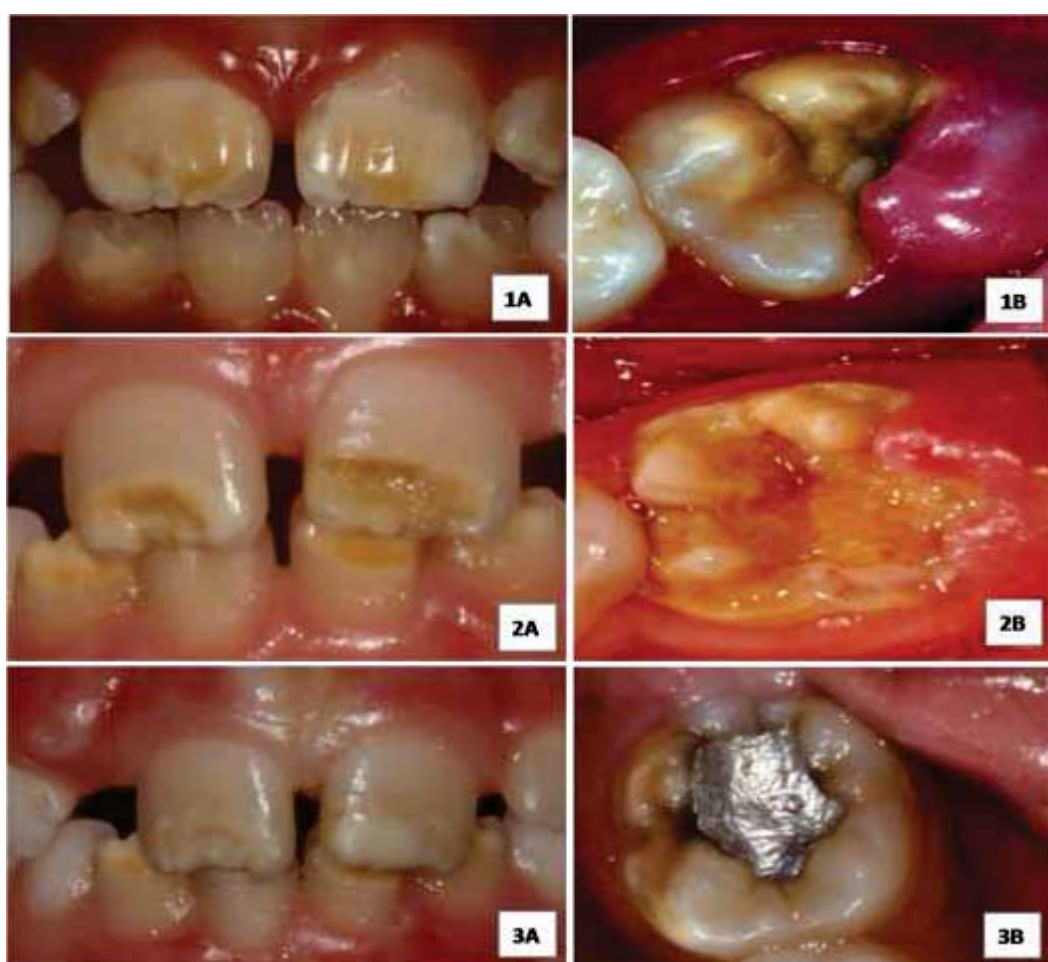
Exame clínico

A calibração dos examinadores (2) foi realizada de acordo com a metodologia do levantamento de Saúde Bucal-Brasil, realizado pelo Ministério da Saúde Bucal (Brasil¹⁰, 2001). Em primeiro lugar, o calibrador apresentou aos examinadores os critérios para a detecção de HMI, mostrando imagens de várias situações para serem observadas no exame clínico, discutindo cada uma destas situações. Esta sessão durou entre uma a duas horas. Em seguida, o calibrador e examinadores examinaram 10 a 20 sujeitos e discutiram cada caso. A concordância inter e intra-examinador foi avaliada em um segundo exame clínico em 10% da amostra, após duas semanas, com um kappa de 1,0. O diagnóstico da HMI foi realizado segundo os critérios da EAPD (Associação Européia de Odontopediatria) (Weerheijm et al.⁸⁹, 2003) (Anexo 1) (Figuras 1-3). Foram consideradas apenas opacidades demarcadas maiores que 2.0 mm de diâmetro (FDI²⁵, 1992). Os casos foram definidos como sujeitos com o fenótipo de HMI, enquanto que os controles foram definidos como os indivíduos sem evidência da HMI (incluindo nenhuma evidência de fluorose).

Figura 1 - Opacidades demarcadas em incisivos permanentes (A) e primeiros molares permanentes (B).

Figura 2 - Perda estrutural associada a opacidades demarcadas em incisivos permanentes (A) e primeiros molares permanentes (B).

Figura 3 - Restaurações atípicas em incisivos permanentes (A) e primeiros molares permanentes (B).



FONTE: (Jeremias *et al.*, 2013).

Os exames clínicos foram realizados com a utilização de luz artificial e espelho bucal. Além disso, dados de experiência de cárie (CPOD) foram registrados seguindo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Em resumo, as lesões visíveis na dentina, bem como lesões ativas visíveis no esmalte (manchas brancas) e restaurações insatisfatórias com tecido cariado foram pontuadas como cariado. Uma sonda exploradora foi usada cuidadosamente para avaliar a lisura das superfícies dos dentes. Gaze foi usada para secar e limpar os dentes previamente ao exame. Lesões de manchas brancas foram distinguidas de defeitos de desenvolvimento do esmalte simplesmente por razões clínicas baseadas na associação das lesões com áreas de placa madura e localização sobre o dente (supra-gengival, associada a ligeira inflamação na gengiva ou até a tecido gengival saudável), além do aspecto da lesão semelhante a giz branco, quando seca (Seow⁷⁰, 1997). Nenhuma radiografia foi avaliada.

As características demográficas (idade e gênero) dos indivíduos incluídos neste estudo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características demográficas da população estudada (adultos e crianças), representadas pela média da idade e gênero.

	(n=160)		
	HMI (caso) n=71	sem HMI (controle) n=89	p
Média da idade em anos	13	38	0.00001
Gênero			
<i>Masculino</i>	37	38	0.24
<i>Feminino</i>	34	51	

Coleta de material biológico e extração de DNA

Após assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, (Apêndice 1A e 1B) foi solicitado a cada indivíduo que realizasse dois bochechos com solução de glicose a 3%, autoclavada, por 2 min, com intervalo de 5 minutos cada. Familiares de crianças afetadas também foram convidados a participar do estudo. Tal procedimento foi realizado na Clínica de Pós-Graduação em Odontopediatria da FOAr-UNESP (Figura 4). Os tubos contendo o bochecho foram mantidos resfriados (em caixa de isopor com gelo) do local da coleta até a chegada ao Laboratório de Genética Molecular da Instituição. Cada tubo foi centrifugado a 2000rpm por 10 min para separar o *pellet* de células que se despregam da mucosa oral do sobrenadante (saliva+glicose 3%)(Scarel et al.⁶⁹, 2000)

(Figura 5). A este *pellet* de células foi adicionado uma solução Tampão (TrisHCl 10mM, EDTA 0,1 M, SDS 0,5% - pH 8.0), sendo armazenado em freezer (-80°C) até a finalização das coletas de todos os indivíduos.

Figura 4 - Coleta de fluxo salivar, após bochecho com solução glicosilada a 3%, por 2 minutos.



Figura 5 - Concentração do *pellet* de células na parte inferior do tubo, após centrifugação, e previamente a adição de solução tampão.



A etapa seguinte foi a de extração do DNA com o kit Purelink Genomic DNA (K182002) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) (Figura 6) a partir do *pellet* de células, seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente procedeu-se a lise das células com 2 μ l de proteinase K e 520 μ l de solução tampão (Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer) (após descongelamento da amostra), seguida pela agitação dos microtubos no vórtex e banho-maria a 55°C. Após esta etapa era realizada uma centrifugação rápida para coletar possível amostra contida na tampa do microtubo. O próximo passo consistia na divisão do conteúdo lisado em 2 microtubos e adição de 260 μ l de etanol puro 96-100% a cada um deles. O DNA então se precipitava (Figura 7), o conteúdo era agitado no vórtex (10 segundos) até se obter uma solução homogênea. E a partir de então, o conteúdo era filtrado em alíquotas de 390 μ l de solução (em um tubo que contém filtro afinidade por DNA) após centrifugado a 10.000 g (*rcf) por 1 minuto a 25°C. Terminada a filtragem, o DNA era purificado com 500 μ l de solução tampão (Wash Buffer 1), centrifugado a temperatura ambiente a 10.000 g (*rcf) por 1 minuto, sendo descartado o volume filtrado e adicionado 500 μ l da solução tampão Wash Buffer 2, sendo o microtubo agora centrifugado a 20.817 g (*rcf), por 3 minutos, a 25°C. O volume filtrado era novamente descartado. A etapa seguinte foi a eluição do DNA dos tubos de filtragem com adição de

50 μ l de solução tampão (Elution Buffer) e posterior centrifugação a 20.817 g (*rcf) por 1 minuto, a temperatura ambiente. O microtubo com DNA purificado era então mantido em microtubo de 1,5 ml. Após todo este processo, o DNA genômico foi avaliado com relação a concentração (ng/ μ l) e pureza (260/280nm; 260/230nm) no aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, EUA) (Figura 8).

Figura 6 - Kit de Extração/ Purificação de DNA utilizado neste estudo.



Figura 7 - Aspecto de “nuvem” do DNA extraído, previamente a etapas finais de purificação.



Figura 8 - Posicionamento da alíquota de DNA (2 μ l) no espectrofotômetro para avaliar a qualidade do ácido nucléico (A); leitura do DNA mostrada no visor (B).



Após leitura no referido dispositivo, o microtubo contendo DNA genômico purificado foi armazenado a -80°C até o momento da genotipagem.

Seleção e Genotipagem dos SNPs

Para a seleção dos SNPs foi consultada a página do International HapMap Project (www.hapmap.org), que consiste em um consórcio de vários países para o desenvolvimento de um mapa com os padrões de variações na seqüência de DNA. Nesse banco de dados estão disponíveis informações sobre os SNPs nos genes de interesse, sendo 11 os SNPs que foram selecionados como marcadores investigados neste estudo (Tabela 2). Eles foram selecionados utilizando o software SNPbrowserTM, versão 4.0, que ilustra um painel de cromossomos humanos representando a localização de mais de 150.000 SNPs validados nos blocos haplotípicos e respectivos SNP *tags* para cada população avaliada no Projeto HapMap (The International HapMap Consortium). Foram priorizados SNPs baseados nos modelos de desequilíbrio de ligação (De La Vega et al.¹⁷, 2005).

Tabela 2 - Marcadores dos genes candidatos estudados.

Gene	Locus	SNP
Ameloblastina (<i>AMBN</i>)	4q21	rs496502 rs4694075
Amelogenina (<i>AMELX</i>)	Xp22.31-p22.1	rs17878486 rs946252
Enamelina (<i>ENAM</i>)	4q13.3	rs3796704 rs12640848
Tuftelina (<i>TUFT1</i>)	1q21	rs3790506 rs2337360 rs4970957
Interação proteína 11 com Tuftelina (<i>TFIP11</i>)	22q12.1	rs134136 rs5997096

Os polimorfismos foram investigados por meio de reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em Tempo Real (Figura 9), utilizando o sistema de genotipagem TaqMan® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)(Ranade et al.⁶⁴, 2001), que emprega uma sonda específica para cada alelo, marcada com fluoróforos diferentes. Desta forma, um indivíduo homocigoto para um alelo tem a emissão de somente um comprimento de onda (referente à sonda que se anelou no gene alvo), enquanto para um indivíduo heterocigoto há a emissão de ambos os fluoróforos das duas sondas empregadas para detecção do polimorfismo.

Para todos os testes TaqMan, a amplificação do DNA foi realizada em volume de 3,0µl contendo 1.0 µl de 2,0 ng/µl de DNA e 2,0 µl de primers e Master Mix TaqMan. As amplificações foram realizadas no equipamento de PCR GeneAmp® System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo os sinais fluorescentes detectados no sistema HT 7900 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Presença do DNA genômico de Streptococcus mutans

Para gerar dados sobre colonização de *Streptococcus mutans* nos indivíduos que apresentaram cárie, foi extraído amostras de DNA da saliva humana para verificar cópias de DNA genômico de bactérias. PCR em tempo real foi realizado por meio da utilização do ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Cada tubo de reação continha 10 µl de mistura de reação, incluindo tampão X SYBR Green, 0,025 U/µl de polimerase de DNA AmpliTaqGold, 0,01 U/µl de AmpErase UNG (uracil N-glicosilase), 1,2 mM de cada uma das dNTPs, 3 mM MgCl₂ (SYBR Green PCR Core Reagents, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 2 µl de DNA humano extraído de amostras de saliva e 0,8 mM de cada primer específico para *S. mutans* (5'AGCCATGCGCAATCAACAGGTT3' e 5'CGCAACGCGAACATCTTGATCAG3'). A especificidade destes primers já havia sido testada anteriormente (Yano et al.⁹⁵, 2002) e o DNA genômico do *S. mutans* (*Streptococcus mutans*

ATCC[®]25175) foi incluído em todas as reações como controle positivo e curvas padrão de DNA foram geradas. As condições cíclicas foram de 2 minutos a 50° C para uracil *N-glicosilase* (este tratamento previne contaminação cruzada por digestão de fragmentos contendo uracila gerados antes do ensaio de PCR), 10 minutos a 95°C para a ativação de AmpliTaqGold, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação e 1 minuto a 68°C para o aquecimento e extensão. Valores do ciclo limiar (Ct) acima de zero foram considerados positivos para a infecção por *S. mutans* com base no sucesso da amplificação da sequência alvo. Esses valores foram correlacionados com os escores de CPOD, considerando alfa de 0,05 como estatisticamente significante.

Figura 9 - Aparelho de PCR em tempo real, utilizado na genotipagem.



Análise Estatística

Os testes qui-quadrado e *t* de Student foram aplicados para comparar frequências de gênero e idade e para testar os desvios nas distribuições alélicas e genóticas entre os grupos. Desvios de Hardy-Weinberg também foram examinados usando o teste qui-quadrado (em ambos os grupos). Comparações das frequências de alelo e genótipo entre os casos e controles foram realizadas levando-se em consideração a detecção da HMI, assim como a sua severidade (leve e grave). Nos casos leves há opacidades demarcadas de esmalte sem quebra do esmalte. Em casos graves, existem opacidades de esmalte demarcadas com perdas estruturais, cárie, hipersensibilidade espontânea e forte preocupação estética (Lygidakis et al.⁵², 2010). O risco associado com alelos ou genótipos individuais foi calculado como a razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC). O nível de probabilidade de $p < 0.05$ foi considerado como indicativo de significância estatística para a análise do marcador e para a análise de cada um dos marcadores com base na severidade da HMI. Finalmente, foi realizada regressão logística para testar a associação entre variação genética e experiência de cárie, ajustando a análise por colonização de *Streptococcus mutans* e HMI. O ajuste da análise do grau de HMI é importante uma vez que dados anteriores sugerem que a HMI está associada com maior experiência de cárie nesta população (Jeremias et al.³⁷, 2013)

A vertical microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing cellular structures. The image is stained with a blue dye, possibly toluidine blue, which highlights the cell walls and nuclei. There are several distinct layers of cells visible, including what appears to be the epidermis, cortex, and vascular bundles. The vascular bundles are arranged in a ring-like pattern. The text "5 RESULTADO" is overlaid in the center of the image.

5 RESULTADO

5 RESULTADO

Todos os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As Tabelas 3 e 4 resumem os resultados das comparações de frequência de alelo e de genótipo entre os grupos (caso e controle). Considerando-se a comparação entre o número total de casos (HMI) e controles (não MIH), foram encontrados resultados limítrofes para rs3796704 *ENAM* ($p = 0.02$ para a frequência alélica, e $p = 0.06$ para a frequência genotípica). Assim, sugere-se que os indivíduos portadores do alelo A estejam protegidos contra o desenvolvimento da HMI (OR = 0.42, 95% IC = 0.20-0.47) (Tabela 3).

Ao se considerara severidade da condição na análise (Tabela 4), observou-se diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo para o marcador rs4694075 *AMBN* ($p = 0.003$; OR = 0.46, 95% IC = 0.26-0.80), com o alelo T, sugerindo um papel protetor. O marcador rs3796704 *ENAM* também esteve associado com a severidade da condição (OR = 0.28, 95% IC = 0.06-1.0); uma vez que o alelo G foi mais frequente no subgrupo severo ($p = 0.03$) em comparação com o subgrupo controle. Houve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos referente ao polimorfismo rs5997096 do gene *TFIP11* entre os casos severos de HMI ($p = 0.01$). Por outro lado, os genótipos do marcador rs134136 também do gene *TFIP11* foram significantes nos casos com diagnóstico leve ($p = 0.02$).

Tabela 3 - Comparações das frequências de alelos e genótipos entre os grupos caso e controle.

Marcadores	Alelos (%)		<i>p</i>	OR (95% I.C.)	Genótipos (%)			<i>p</i>
TUFT1								
rs2337360	A	G			AA	AG	GG	
HMI	52(36.6)	90(63.4)	0.11	1.48 (0.89-2.47)	9(12.7)	34(47.9)	28(39.4)	0.23
Sem HMI	46(28.5)	118(71.5)			5(6.1)	36(43.9)	41(50.0)	
rs4970957	A	G			AA	AG	GG	
HMI	108(76.1)	34(23.9)	0.87	0.95 (0.60-1.80)	44(62.0)	20(28.2)	7(9.9)	0.50
Sem HMI	134(75.3)	44(24.7)			51(57.3)	32(36.0)	6(6.7)	
rs3790506	A	G			AA	AG	GG	
HMI	41(28.8)	101(71.2)	0.86	0.95 (0.57-1.60)	5(7.0)	31(43.7)	35(49.3)	0.54
Sem HMI	53(29.7)	125(70.3)			10(11.2)	33(37.1)	46(51.7)	
AMBN								
rs4694075	C	T			CC	CT	TT	
HMI	71(42.2)	73(57.8)	0.06	0.65 (0.60-1.51)	16(22.5)	39(54.9)	17(22.5)	0.78
Sem HMI	90(52.8)	88(47.2)			23(25.8)	44(49.4)	22(24.7)	
rs496502	T	G			GG	GT	TT	
HMI	31(23.1)	99(76.9)	0.65	1.13 (0.65-2.09)	38(58.5)	23(35.4)	4(6.2)	0.80
Sem HMI	37(21.0)	139(79.0)			56(63.6)	27(30.7)	5(5.7)	
ENAM								
rs12640848	A	G			AA	AG	GG	
HMI	60(42.3)	82(57.7)	0.92	1.02 (0.41-1.04)	9(12.7)	42(59.2)	20(28.2)	0.05
Sem HMI	93(50.6)	83(49.4)			25(28.4)	43(48.9)	20(22.7)	
rs3796704	A	G			AA	AG	GG	
HMI	11(8.0)	121(92.0)	0.02	0.42 (0.20-0.47)	0(0)	11(16.7)	55(83.3)	0.06
Sem HMI	29(17.0)	141(83.0)			5(5.9)	19(22.4)	61(71.8)	
TFIP11								
rs5997096	C	T			CC	CT	TT	
HMI	54(40.3)	80(59.7)	0.60	0.88 (0.55-1.43)	9(13.4)	36(53.7)	22(32.8)	0.34
Sem HMI	77(43.2)	101(56.8)			19(21.3)	39(43.8)	31(34.8)	
rs134136	T	C			CC	CT	TT	
HMI	60(42.2)	82(57.8)	0.14	1.40 (0.87-2.27)	26(36.6)	30(42.3)	15(21.1)	0.38
Sem HMI	61(34.2)	117(65.8)			42(47.2)	33(37.1)	14(15.7)	
AMELX								
rs946252	T	C			CC	CT	TT	
HMI	23(12.6)	117(87.4)	0.46	1.38 (0.71-2.74)	52(74.3)	13(18.6)	5(7.1)	0.60
Sem HMI	22(9.4)	156(90.6)			72(80.9)	12(13.5)	5(5.6)	
rs17878486	C	T			CC	CT	TT	
HMI	29(19.2)	113(80.8)	0.11	1.86 (0.57-1.83)	10(14.1)	9(12.7)	52(73.2)	0.44
Sem HMI	35(11.3)	139(83.7)			9(10.3)	17(19.5)	61(70.1)	

Nota: OR (95% I.C.)= Odds ratio (95% intervalo de confiança)

Tabela 4 - Comparações das frequências de alelos e genótipos com relação a severidade da HMI na população estudada.

	Alelos (%)		<i>p</i>	OR (95% IC)	Genótipos (%)			<i>p</i>
TUFT1								
rs2337360	A	G			AA	AG	GG	
Sem HMI	46(28.1)	118(71.9)	Referência		5(6.1)	36(43.9)	41(50.0)	Referência
Leve	30(35.7)	54(64.3)	0.21	1.43(0.78-2.59)	6(14.3)	18(42.9)	18(42.9)	0.30
Severo	22(37.9)	36(62.1)	0.16	1.57(0.8-3.08)	3(10.3)	16(55.2)	10(34.5)	0.33
rs4970957	A	G			AA	AG	GG	
Sem HMI	134(75.3)	44(24.7)	Referência		51(57.3)	32(36.0)	6(6.7)	Referência
Leve	66(78.6)	18(21.4)	0.56	1.2(0.62-2.35)	28(66.7)	10(23.8)	4(9.5)	0.36
Severo	42(72.4)	16(27.6)	0.66	0.86(0.42-1.78)	16(55.2)	10(34.5)	3(10.3)	0.82
rs3790506	A	G			AA	AG	GG	
Sem HMI	53(29.8)	125(70.2)	Referência		10(11.2)	33(37.1)	46(51.7)	Referência
Leve	25(29.8)	59(70.2)	0.99	1.0(0.54-1.83)	2(4.8)	21(50.0)	19(45.2)	0.25
Severo	16(27.6)	42(72.4)	0.75	0.9(0.44-1.82)	3(10.3)	10(34.5)	16(55.2)	0.95
AMB1								
rs4694075	C	T			CC	CT	TT	
Sem HMI	90(50.6)	88(49.4)	Referência		23(25.8)	44(49.4)	22(24.7)	Referência
Leve	30(31.9)	64(68.1)	0.003	0.46(0.26-0.80)	10(23.8)	20(47.6)	12(28.6)	0.89
Severo	31(53.4)	27(46.6)	0.70	1.12(0.59-2.12)	6(20.7)	19(65.5)	4(13.8)	0.29
rs496502	G	T			GG	GT	TT	
Sem HMI	139(78.9)	37(21.1)	Referência		56(63.6)	27(30.7)	5(5.7)	Referência
Leve	52(68.4)	24(31.6)	0.07	0.58(0.3-1.1)	18(47.4)	16(42.1)	4(10.5)	0.21
Severo	51(87.9)	7(12.1)	0.13	1.94(0.77-5.11)	22(75.9)	7(24.1)	0(0)	0.29
ENAM								
rs12640848	A	G			AA	AG	GG	
Sem HMI	93(52.8)	83(47.2)	Referência		25(28.4)	43(48.9)	20(22.7)	Referência
Leve	34(40.5)	50(59.5)	0.06	0.61(0.35-1.06)	5(11.9)	24(57.1)	13(31.0)	0.10
Severo	26(44.8)	32(55.2)	0.29	0.73(0.38-1.37)	4(13.8)	18(62.1)	7(24.1)	0.27
rs3796704	A	G			AA	AG	GG	
Sem HMI	29(17.1)	141(82.9)	Referência		5(5.9)	19(22.4)	61(71.8)	Referência
Leve	8(10.0)	72(90.0)	0.14	0.54(0.21-1.32)	0(0)	8(20.0)	32(80.0)	0.26
Severo	3(5.4)	53(94.6)	0.03	0.28(0.06-1.0)	0(0)	3(10.7)	25(89.3)	0.14
TFIP11								
rs5997096	C	T			CC	CT	TT	
Sem HMI	77(43.3)	101(56.7)	Referência		19(21.3)	39(43.8)	31(34.8)	Referência
Leve	35(44.9)	43(55.1)	0.81	1.07(0.6-1.89)	9(23.1)	17(43.6)	13(33.3)	0.97
Severo	19(33.9)	37(66.1)	0.21	0.67(0.34-1.32)	0(0)	19(67.9)	9(32.1)	0.01
rs134136	C	T			CC	CT	TT	
Sem HMI	117(65.7)	61(34.3)	Referência		42(47.2)	33(37.1)	14(15.7)	Referência
Leve	50(59.5)	34(40.5)	0.33	0.77(0.43-1.36)	17(40.5)	16(38.1)	9(21.4)	0.02
Severo	32(55.2)	26(44.8)	0.15	0.64(0.34-1.22)	9(31.0)	14(48.3)	6(20.7)	0.31
AMELX								
rs946252	C	T			CC	CT	TT	
Sem HMI	156(87.6)	22(12.4)	Referência		72(80.9)	12(13.5)	5(5.6)	Referência
Leve	65(79.3)	17(20.7)	0.08	0.54(0.25-1.14)	27(65.9)	11(26.8)	3(7.3)	0.15
Severo	52(89.7)	6(10.3)	0.68	1.22(0.44-3.57)	25(86.2)	2(6.9)	2(6.9)	0.63
rs17878486	C	T			CC	CT	TT	
Sem HMI	35(20.1)	139(79.9)	Referência		9(10.3)	17(19.5)	61(70.1)	Referência
Leve	20(23.8)	64(76.2)	0.50	1.24(0.63-2.42)	7(16.7)	6(14.3)	29(69.0)	0.51
Severo	9(15.5)	49(84.5)	0.44	0.73(0.3-1.72)	3(10.3)	3(10.3)	23(79.3)	0.52

Nota: OR (95% I.C.)= Odds ratio (95% intervalo de confiança)

Com relação a experiência de cárie dentária, a média do índice CPOD foi de $5,04 \pm 3,12$. No entanto, não foi observada qualquer diferença no nível de colonização do *Streptococcus mutans*, pois também se observou cópias detectáveis de DNA genômico de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie.

A Tabela 5 mostra as frequências de alelos e genótipos dos polimorfismos investigados nos pacientes com HMI relacionando com a experiência de cárie (baixa: CPOD ≤ 3 ; alta: CPOD ≥ 4). Associações sugestivas foram encontradas para três marcadores: rs134136 *TFIP11* ($p=0.01$; OR = 1.78, 95% IC = 1.08-2.94 para frequência alélica) e rs17878486 para o gene *AMELX* ($p=0.03$, OR = 0.53, 95% IC = 0.29-0.98 para a frequência alélica e $p = 0.03$ para a frequência genotípica).

A Tabela 6 resume os resultados da análise de regressão ajustada (para idade, *S. mutans* e condição da HMI) e teste de modelos. Nas análises de regressão, observou-se associação dos fatores ajustados com a cárie para o polimorfismo rs5997096 do gene *TFIP11* (para o genótipo CT: OR = 0.34; 95% IC = 0.13-0.88) e para o polimorfismo rs17878486 do gene *AMELX* (para CT: OR = 5.38, 95% IC = 1.38-20.98; para TT: OR = 3.91, 95% IC = 1.21-12.55), independente da condição de HMI ou cópias de DNA genômico de *S. mutans* (detectados por PCR em tempo real). Ao se considerar os testes de modelos específicos nas análises, também se observou associação do gene *ENAM* com a cárie dentária.

Tabela 5 - Comparações das frequências de alelos e genótipos com relação a experiência de cárie no grupo com HMI.

	Alelos (%)		<i>p</i>	OR (95% IC)	Genótipos (%)			<i>p</i>
TUFT1								
rs2337360	A	G			AA	AG	GG	
Baixa	49(31.4)	107(65.6)	0.81	1.06(0.64-1.76)	6(7.7)	37(47.4)	35(44.9)	0.79
Alta	49(32.7)	101(67.3)			8(10.7)	33(44.0)	34(45.3)	
rs4970957	A	G			AA	AG	GG	
Baixa	124(75.6)	40(24.4)	0.99	1.00(0.58-1.72)	50(61.0)	24(29.3)	8(9.8)	0.56
Alta	118(75.6)	38(24.4)			45(57.7)	28(35.9)	5(6.4)	
rs3790506	A	G			AA	AG	GG	
Baixa	51(31.1)	113(68.9)	0.49	0.84(0.51-1.4)	8(9.8)	35(42.7)	39(47.6)	0.72
Alta	43(27.6)	113(72.4)			7(9.0)	29(37.2)	42(53.8)	
AMBN								
rs4694075	C	T			CC	CT	TT	
Baixa	79(48.2)	85(51.8)	0.43	1.19(0.75-1.89)	16(19.5)	47(57.3)	19(23.2)	0.27
Alta	82(52.6)	74(47.4)			23(29.5)	36(46.2)	19(24.4)	
rs496502	T	G			GG	GT	TT	
Baixa	121(76.6)	37(23.4)	0.52	1.19(0.67-2.12)	48(60.8)	25(31.6)	6(7.6)	0.62
Alta	121(79.6)	31(20.4)			48(63.2)	25(32.9)	3(3.9)	
ENAM								
rs12640848	A	G			AA	AG	GG	
Baixa	83(50.7)	81(49.3)	0.78	1.07(0.66-1.73)	21(25.6)	41(50.0)	20(24.4)	0.40
Alta	70(52.2)	64(47.3)			13(16.9)	44(57.1)	20(26.0)	
rs3796704	A	G			AA	AG	GG	
Baixa	21(13.6)	133(86.4)	0.76	0.9(0.44-1.85)	1(1.3)	19(24.7)	57(74.0)	0.13
Alta	19(12.5)	133(87.5)			4(5.3)	11(14.5)	61(80.3)	
TFIP11								
rs5997096	C	T			CC	CT	TT	
Baixa	61(38.1)	99(61.9)	0.16	1.39(0.86-2.23)	9(11.3)	43(53.8)	28(35.0)	0.07
Alta	70(46.1)	82(53.9)			19(25.0)	32(42.1)	25(32.9)	
rs134136	T	C			CC	CT	TT	
Baixa	68(50.7)	66(49.3)	0.01	1.78(1.08-2.94)	30(36.6)	38(46.3)	14(17.1)	0.17
Alta	101(64.8)	55(36.2)			38(48.7)	25(32.1)	15(19.2)	
AMELX								
rs946252	T	C			CC	CT	TT	
Baixa	139(85.8)	23(14.2)	0.89	1.00 (0.53-1.89)	63(77.8)	13(16.0)	5(6.2)	0.99
Alta	134(85.9)	22(14.1)			61(78.2)	12(15.4)	5(6.4)	
rs17878486	C	T			CC	CT	TT	
Baixa	41(25.0)	123(75.0)	0.03	0.53(0.29-0.98)	15(18.3)	11(13.4)	56(68.3)	0.03
Alta	23(15.1)	129(84.9)			4(5.3)	15(19.7)	57(75.0)	

Nota: OR (95% I.C.)= Odds ratio; 95% intervalo de confiança

Tabela 6 - Análise de regressão da associação entre cárie e variação genética ajustada para HMI e presença de *Streptococcus mutans* e teste de modelos.

Gene/Marcador	Genótipos	Análise Multivariada*		Teste/modelo	Genótipos	P
		P	OR (95% I.C.)			
AMELX						
rs946252	CC	Referência	Referência	Genótipo	CC/CT/TT	0.72
	CT	0.88	0.93 (0.39-2.22)	Modelo Dominante	CC+CTvsTT	0.51
	TT	0.97	1.02 (0.28-3.73)	Modelo Recessivo	CCvsCT+TT	0.70
rs17878486	CC	Referência	Referência	Genótipo	CC/CT/TT	0.04
	CT	0.01	5.38(1.38-20.98)	Modelo Dominante	CC+CTvsTT	0.35
	TT	0.02	3.91(1.21-12.55)	Modelo Recessivo	CCvsCT+TT	0.01
TFIP11						
rs5997096	CC	Referência	Referência	Genótipo	CC/CT/TT	0.07
	CT	0.03	0.34(0.13-0.88)	Modelo Dominante	CC+CTvsTT	0.78
	TT	0.07	0.41(0.41-1.09)	Modelo Recessivo	CCvsCT+TT	0.02
rs134136	CC	Referência	Referência	Genótipo	CC/CT/TT	0.38
	CT	0.07	0.52(0.26-1.05)	Modelo Dominante	CC+CTvsTT	0.37
	TT	0.69	0.84(0.35-2.01)	Modelo Recessivo	CCvsCT+TT	0.17
AMBN						
rs4694075	CC	Referência	Referência	Genótipo	CC/CT/TT	0.78
	CT	0.11	0.53(0.25-1.16)	Modelo Dominante	CC+CTvsTT	0.63
	TT	0.42	0.69(0.28-1.70)	Modelo Recessivo	CCvsCT+TT	0.75
rs496502	GG	Referência	Referência	Genótipo	GG/GT/TT	0.80
	GT	0.17	0.60(0.29-1.20)	Modelo Dominante	GG+GTvsTT	0.51
	TT	0.85	0.86(0.19-3.88)	Modelo Recessivo	GGvsGT+TT	0.82
ENAM						
rs12640848	AA	Referência	Referência	Genótipo	AA/AG/GG	0.05
	AG	0.19	1.73(0.76-3.96)	Modelo Dominante	AA+AGvsGG	0.01
	GG	0.32	1.6(0.62-4.11)	Modelo Recessivo	AAvsAG+GG	0.43
rs3796704	AA	Referência	Referência	Genótipo	AA/AG/GG	0.01
	AG	0.10	1.15(0.01-1.50)	Modelo Dominante	AA+AGvsGG	0.02
	GG	0.25	0.27(0.02-2.58)	Modelo Recessivo	AAvsAG+GG	<0.00001
TUFT1						
rs3790506	AA	Referência	Referência	Genótipo	AA/AG/GG	0.54
	AG	0.87	0.91(0.29-2.84)	Modelo Dominante	AA+AGvsGG	0.76
	GG	0.78	1.17(0.38-3.59)	Modelo Recessivo	AAvsAG+GG	0.36
rs233736	AA	Referência	Referência	Genótipo	AA/AG/GG	0.23
	AG	0.49	0.66(0.2-2.12)	Modelo Dominante	AA+AGvsGG	0.19
	GG	0.57	0.71(0.22-2.32)	Modelo Recessivo	AAvsAG+GG	0.15
rs4970957	AA	Referência	Referência	Genótipo	AA/AG/GG	0.50
	AG	0.45	1.02(0.53-1.95)	Modelo Dominante	AA+AGvsGG	0.54
	GG	0.50	0.27(0.66-2.57)	Modelo Recessivo	AAvsAG+GG	0.47

A microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing cellular structures. The image is split vertically by a dark blue line. The left side is white, and the right side is a lighter blue. The text '6 DISCUSSÃO' is centered over the blue area.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar a possível associação entre HMI e variações em genes relacionados à formação do esmalte. Um importante ponto de discussão é que ainda existe debate no contexto da HMI ser verdadeiramente reconhecível como uma condição distinta. Defeitos de esmalte restritos a incisivos e molares podem ser considerados puramente ambientais em sua origem (isto é, infecção) ou confundidos com casos de amelogenese imperfeita, particularmente no caso de crianças jovens em que os únicos dentes permanentes irrompidos são os incisivos e molares. Mutações em *AMELX* e *ENAM*, dois genes marcadores que foram incluídos neste estudo, podem originar a amelogenese imperfeita.

A maioria dos casos de amelogenese imperfeita decorre de mutações em *ENAM*, que pode ser herdada como autossômica dominante ou recessiva. Cerca de 5% dos casos são formas recessivas ligadas ao cromossomo X, associadas a mutações em *AMELX* (Stephanopoulos et al.⁷⁹, 2005). Enquanto a inativação desses genes acarreta a amelogenese imperfeita, as suas variantes hipomórficas (isto é, SNPs comuns na população) podem desempenhar um papel na formação do esmalte e levar a formas moderadas de defeitos que afetam apenas partes das dentições e são menos severas. Além disso, a limitação relacionada a idade dos sujeitos pode afetar o diagnóstico de indivíduos mais velhos. Em indivíduos adultos, defeitos de desenvolvimento de

esmalte podem ter sido mascarados por restaurações e agentes remineralizantes. Desta maneira, a precisão do diagnóstico da presença/ausência de defeitos de esmalte pode ser questionada. A consequência desse viés é incluir controles com defeitos de esmalte não detectados, o que implicaria em ausência de associações verdadeiras. Se, por um lado, tal fato é uma preocupação, por outro lado, pode sugerir que as associações encontradas neste estudo são, de fato, decorrentes de relações biológicas verdadeiras, uma vez que as diferenças entre os casos e controles foram suficientemente significativas para superar a chance de alguns controles terem sido erroneamente classificados como tal.

A aparência morfológica do ameloblastos difere em cada fase sucessiva do desenvolvimento do esmalte (pré-secretora, secretora, de transição e maturação), com alterações correspondentes na expressão de vários genes (Nanci et al.⁵⁵, 1998; Hu et al.³⁶, 2001; Paine et al.⁵⁹, 2001; Stephanopoulos et al.⁷⁹, 2005). Durante a progressão dos estágios iniciais até o estágio mais tardio da maturação do esmalte, um processo dinâmico ocorre no tecido em desenvolvimento, envolvendo alterações celulares, bioquímicas, genéticas e epigenéticas. São observadas altas taxas de aquisição mineral, associado a flutuações no pH extracelular, além de reabsorção de proteínas do esmalte extracelulares. Durante a fase de maturação, os ameloblastos deixam de ser alongados, finos, e com organização altamente polarizada (característica da fase de

secreção), para assumirem uma morfologia colunar baixa e larga. Estes resultados indicam que os ameloblastos são submetidos a alterações moleculares durante a fase de maturação da amelogênese (Bartlett et al.⁵, 2006). A literatura especula que o defeito observado no esmalte da HMI ocorra devido a sensibilização dos ameloblastos durante a fase de maturação do esmalte dentário (Weerheijm⁸⁷, 2003).

O presente estudo sugere possibilidade de associação entre o esmalte hipomineralizado e variação genética nos genes da formação do esmalte. Foi possível notar que algumas variações indicaram uma tendência de associação com a susceptibilidade à HMI, enquanto outras mostraram uma tendência na direção oposta, o que sugere um efeito protetor contra o seu desenvolvimento. Curiosamente, nenhuma associação relacionada ao desenvolvimento da HMI foi encontrada no que diz respeito ao *AMELX*, um gene essencial que segrega a proteína principal do esmalte, a amelogenina, durante a fase de secreção da amelogênese. Isto pode sugerir que o defeito do esmalte na HMI parece não estar diretamente relacionado com a função da amelogenina durante a fase de secreção.

Os genes *Amelx*, *Enam*, e *Ambn* apresentam níveis reduzidos de expressão no estágio de maturação da amelogênese, segundo relatado em estudo com modelo animal (Bartlett et al.⁵, 2006). No entanto, essas mudanças são mais sutis para *Ambn*. Este achado está de acordo com relatos de que *Ambn* é expresso durante a fase de

maturação (Winter, Brook⁹⁴, 1975). Apesar de nenhuma alteração morfológica grave ter sido descrita entre o início e o final da maturação do órgão do esmalte, uma série de alterações ultraestruturais (padrão de vacuolização e conteúdo lisossômico) ocorrem. Além disso, atividades fisiológicas, tais como as que podem decorrer de variações de pH e as diferenças nas taxas de aquisição mineral entre estas duas fases (Smith⁷⁶, 1998; Lacruz et al.⁴⁶, 2011), estão provavelmente relacionadas com alterações na regulação gênica (Smith⁷⁶, 1998). Foi possível observar, nesta investigação, uma tendência de associação de variação em *ENAM* (Tabelas 3 e 4) e *AMBN* (Tabela 4) com HMI, o que pode sugerir que a variação na regulação deste gene é um mecanismo que conduz ao defeito.

A tuftelina desempenha um papel importante durante o desenvolvimento e mineralização do esmalte, mas sua função exata ainda é incerta. É também expressa em vários tecidos moles não mineralizados, sugerindo que tenha uma função universal e/ou um papel multifuncional (Salama et al.⁶⁸, 1990). A proteína 11 que interage com a tuftelina (*TFIP11*) foi a primeira identificada em uma varredura específica, como sendo uma proteína capaz de tal interação. A expressão ubíqua de *TFIP11* sugere que possa ter outras funções em tecidos não dentários (Deutsch et al.¹⁹, 2002). Foram observadas evidências de uma possível associação entre variação genética da *TFIP11* e HMI (Tabela 4),

sugerindo que este gene esteja potencialmente envolvido na sua predisposição.

Neste estudo também foi avaliada a associação de marcadores genéticos de genes da formação do esmalte com cárie dentária e presença de HMI. Uma vez que não havia radiografias para revisão, há a possibilidade de que algumas lesões de cárie não tenham sido devidamente detectadas clinicamente. No entanto, esta é uma limitação para a amostra inteira e não há motivos para acreditar que casos e controles tenham sido diferentemente afetados. Casos de HMI tiveram a experiência de cárie dentária sugestivamente associada a variações em *AMELX*, *ENAM*, e *TFIP11* (Tabelas 5 e 6).

A associação entre *AMELX*, *ENAM* e cárie também tem sido relatada em esmalte livre de hipomineralização (Deeley et al.¹⁸, 2008; Patir et al.⁶¹, 2008; Shimizu et al.⁷², 2012). É fato que as alterações genéticas conduzem a uma função anormal da proteína e reduzem a quantidade de proteína que gera certo grau de desorganização dos prismas de esmalte, aumentando a susceptibilidade individual a cárie (Shimizu et al.⁷², 2012). A associação com *TFIP11* é intrigante, uma vez que as tentativas anteriores para detectar esta associação falharam (Slayton et al.⁷⁵, 2005; Deeley et al.¹⁸, 2008; Patir et al.⁶¹, 2008). *ATFIP11* já foi associada a estágios iniciais da desmineralização do esmalte e remineralização mediada por fluoreto (Shimizu et al.⁷², 2012), o que

sugere que as análises genéticas de cárie devem considerar a descrição mais pormenorizada do estado da doença.

O presente estudo tem algumas limitações óbvias. Casos e controles não eram perfeitamente pareados. Havia um pouco mais mulheres que homens entre os casos (embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa). A experiência de cárie (CPOD) tendenciou a aumentar com a idade, no entanto, não se acredita que a diferença de idade entre os casos e controles afetaram os resultados, uma vez que os controles eram mais velhos do que os casos. Algumas características populacionais também podem ter passado despercebidas, considerando que a população de Araraquara/SP é totalmente miscigenada; uma vez que brasileiros são uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultantes de cruzamentos interétnicos entre europeus (principalmente portugueses e italianos), africanos (trazidos como escravos) e índios nativos (Wen et al.⁹¹, 2005).

Em linhas gerais, foi apresentada uma nova visão sobre o desenvolvimento de defeitos de esmalte hipomineralizados. Considerando que o período de maturação do esmalte dentário, comumente afetado na condição estudada (primeiros molares permanentes e incisivos permanentes), corresponda ao último trimestre gestacional até o terceiro ano de vida da criança, é possível que a variação genética possa de alguma forma interagir com fatores ambientais. Mais estudos de associação envolvendo núcleos familiares são necessários para avaliar

essa interação potencial, bem como identificar padrões de penetrância da HMI, considerando ainda os fatores epigenéticos (moduladores de gene).

A vertical, blue-tinted microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing various cellular structures and layers. The image is used as a background for the text.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos outros fatores, além dos ambientais devem ser considerados na busca da etiopatogenia da HMI. É fato que o ambiente é capaz de modular o estado epigenético e por sua vez modificar a expressão do gene, sem alterar as sequências de DNA (Godfrey et al.³², 2007; Czyz et al.¹⁵, 2012). Entretanto, a questão sem resposta aqui é, será que as mudanças ambientais ao longo das últimas décadas têm sido tão poderosas para produzir um novo fenótipo dentário com uma prevalência relativamente alta. O fator ambiental na HMI parece ser perturbador, mas um dado fenótipo também pode se adaptar a esse tipo de insulto. Uma adaptação assim é denominada plasticidade. As evidências de distúrbios sistêmicos é fato comum, entretanto não se pode desconsiderar este raciocínio por completo, pois é provado que alguns genes podem ser sensíveis a fatores ambientais, uma vez que sua atividade é dependente da sua programação epigenética (Gluckman et al.³¹, 2008).

Os sinais que se acumulam numa célula diferenciada diferem das células pluripotentes, sendo também distintas daquelas de outras linhagens de células diferenciadas. Esta é a primeira explicação porque apenas os ameloblastos ou alguns dos ameloblastos parecem ser afetados. Fearne et al.²⁴ (2004) descreveram que a maioria dos defeitos de desenvolvimento afeta a espessura total do esmalte, mas poucos defeitos se restringem ao esmalte mais internamente. Isto conduz à

existência de algumas células em dentes com HMI possuem o potencial de recuperação após qualquer insulto, eventualmente, apenas na parte interna do esmalte. Estas marcas são dinâmicas: um gene pode ser metilado em um tecido, mas não metilado em outro.

Este é o primeiro estudo a apresentar evidências de que variações genéticas (em *ENAM*, *AMBN* e *TFIP11*) podem contribuir para o desenvolvimento da hipomineralização dentária, além de favorecerem a susceptibilidade a cárie na presença da HMI (em *AMELX*, *TFIP11* e *ENAM*). Entretanto, as associações apresentadas são inerentes a população investigada, particularmente. Extrapolações para outras populações ou etnias só podem ser feitas mediante novas pesquisas. Faz-se necessário analisar possível interação com o ambiente, envolvendo mais genes nos procedimentos de análise, além de maiores populações de estudo. A condição, aqui analisada, tem um grande impacto sobre as crianças afetadas, seus familiares e sociedade, devendo ainda considerar as peculiaridades nas necessidades de tratamento odontológico. É fundamental sensibilizar outras profissões frente a este problema mundial, pois apenas a soma de conhecimentos, de nível básico e clínico, trará respostas para este defeito de esmalte que tanto desafia a prática clínica em Odontologia.

A microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing cellular structures. The image is overlaid with a vertical blue gradient bar on the right side. The text '8 REFERÊNCIAS' is centered over the image.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS*

1. Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation. A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(2):53-8.
2. Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Hölttä P, Kallio M, et al. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(5-6):493-7.
3. Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among schoolchildren in western Australia. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009;37(5):405-15.
4. Balmer RC, Laskey D, Mahoney E, Tumba KJ. Prevalence of enamel defects and mih in non-fluoridated and fluoridated communities. *Eur J Paediatr Dent*. 2005;6(4):209-12.
5. Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, et al. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol*. 2006;74:57-115.
6. Beentjes VE, Weerheijm KL, Groen HJ. Factors involved in the aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent*. 2002;3(1):9-13.
7. Biondi AM, Cortese SG, Martínez K, Ortolani AM, Sebelli PM, Ienco M, et al. Prevalence of molar incisor hypomineralization in the city of Buenos Aires. *Acta Odontol Latinoam*. 2011;24(1):81-5.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>.

8. Biondi AM, López Jordi MeC, Cortese SG, Alvarez L, Salveraglio I, Ortolani AM. Prevalence of molar-incisor hypomineralization (MIH) in children seeking dental care at the schools of dentistry of the university of Buenos Aires (Argentina) and University of la Republica (Uruguay). *Acta Odontol Latinoam*. 2012;25(2):224-30.
9. Brogårdh-Roth S, Stjernqvist K, Matsson L, Klingberg G. Dental fear and anxiety and oral health behaviour in 12- to 14-year-olds born preterm. *Int J Paediatr Dent*. 2010;20(6):391-9.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. Projeto SB2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual do examinador/Secretaria Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Área Técnica de Saúde Bucal. – Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
11. Celeste RK, Nadanovsky P, De Leon AP. Association between preventive care provided in public dental services and caries prevalence. *Rev Saude Publica*. 2007;41(5):830-8.
12. Chen WM, Deng HW. A general and accurate approach for computing the statistical power of the transmission disequilibrium test for complex disease genes. *Genet Epidemiol*. 2001;21(1):53-67.

13. Cho SY, Ki Y, Chu V. Molar incisor hypomineralization in Hong Kong Chinese children. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18(5):348-52.
14. Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization. A critical review. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19(2):73-83.
15. Czyz W, Morahan JM, Ebers GC, Ramagopalan SV. Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences. *BMC Med.* 2012;10:93. doi: 10.1186/1741-7015-10-93.
16. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro RCL, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *Int J Paediatr Dent.* 2010;20(6):426-34.
17. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms. TaqMan SNP genotyping assays and the SNPLex genotyping system. *Mutat Res.* 2005;573(1-2):111-35.
18. Deeley K, Letra A, Rose EK, Brandon CA, Resick JM, Marazita ML, et al. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res.* 2008;42(1):8-13.

19. Deutsch D, Leiser Y, Shay B, Fermon E, Taylor A, Rosenfeld E, et al. The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):425-34.
20. Dimaras H, Kimani K, Dimba EA, Gronsdahl P, White A, Chan HS, et al. Retinoblastoma. *Lancet.* 2012;379(9824):1436-46.
21. Drăghici S. Data analysis tools for DNA microarrays. London: Chapman and Hall; 2003.
22. Elfrink ME, Schuller AA, Weerheijm KL, Veerkamp JS. Hypomineralized second primary molars: prevalence data in Dutch 5-year-olds. *Caries Res.* 2008;42(4):282-5.
23. Elfrink ME, ten Cate JM, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Veerkamp JS. Deciduous molar hypomineralization and molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2012;91(6):551-5.
24. Fearne J, Anderson P, Davis GR. 3D X-ray microscopic study of the extent of variations in enamel density in first permanent molars with idiopathic enamel hypomineralisation. *Br Dent J.* 2004;196(10):634-8.
25. Fédération Dentaire Internationale. A review of the developmental defects of enamel index (DDE index). Commission on oral health, research & epidemiology. Report of an FDI working group. *Int Dent J.* 1992;42(6):411-26.

26. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126(3):270-99.
27. Frazier-Bowers SA, Puranik CP, Mahaney MC. The etiology of eruption disorders - further evidence of a 'genetic paradigm'. *Semin Orthod.* 2010;16(3):180-5.
28. Gandhi S, Crawford P, Shellis P. The use of a 'bleach-etch-seal' deproteinization technique on mih affected enamel. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(6):427-34.
29. Ghanim A, Manton D, Bailey D, Mariño R, Morgan M. Risk factors in the occurrence of molar-incisor hypomineralization amongst a group of Iraqi children. *Int J Paediatr Dent.* 2013;23(3):197-206.
30. Ghanim AM, Manton DJ, Morgan MV, Mariño RJ, Bailey DL. Trends of oral health care and dental treatment needs in relation to molar incisor hypomineralisation defects. A study amongst a group of Iraqi schoolchildren. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2012;13(4):171-8.
31. Gluckman PD, Beedle AS, Hanson MA, Yap EP. Developmental perspectives on individual variation. Implications for understanding nutritional needs. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008;62:1-9; discussion 9-12. doi: 10.1159/000146243.

32. Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr Res*. 2007;61(5):5-10.
33. Goldstein DB, Cavalleri GL. Genomics: understanding human diversity. *Nature*. 2005;437(7063):1241-2.
34. Gutiérrez S, Torres D, Briceño I, Gómez AM, Baquero E. Clinical and molecular analysis of the enamel gene *enam* in colombian families with autosomal dominant amelogenesis imperfecta. *Genet Mol Biol*. 2012;35(3):557-66.
35. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005;159(10):943-8.
36. Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of enamel and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(2):125-32.
37. Jeremias F, Souza JF, Costa Silva CM, Cordeiro RC, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and molar-incisor hypomineralization. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4):870-6.
38. Jälevik B. Prevalence and diagnosis of molar-incisor-hypomineralisation (MIH): a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(2):59-64.

39. Jälevik B, Klingberg G. Treatment outcomes and dental anxiety in 18-year-olds with MIH, comparisons with healthy controls-a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2012;22(2):85-91.
40. Jälevik B, Klingberg G, Barregård L, Norén JG. The prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(5):255-60.
41. Jälevik B, Klingberg GA. Dental treatment, dental fear and behaviour management problems in children with severe enamel hypomineralization of their permanent first molars. *Int J Paediatr Dent*. 2002;12(1):24-32.
42. Jälevik B, Norén JG. Enamel hypomineralization of permanent first molars. A morphological study and survey of possible aetiological factors. *Int J Paediatr Dent*. 2000;10(4):278-89.
43. Jälevik B, Norén JG, Klingberg G, Barregård L. Etiologic factors influencing the prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(4):230-4.
44. Koch G, Hallonsten AL, Ludvigsson N, Hansson BO, Holst A, Ullbro C. Epidemiologic study of idiopathic enamel hypomineralization in permanent teeth of Swedish children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987;15(5):279-85.

45. Kotsanos N, Kaklamanos EG, Arapostathis K. Treatment management of first permanent molars in children with molar-incisor hypomineralisation. *Eur J Paediatr Dent.* 2005;6(4):179-84.
46. Lacruz RS, Smith CE, Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine ML. Gene-expression analysis of early- and late-maturation-stage rat enamel organ. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(1):149-57.
47. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2009;88(2):132-6.
48. Leppäniemi A, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Nonfluoride hypomineralizations in the permanent first molars and their impact on the treatment need. *Caries Res.* 2001;35(1):36-40.
49. Lygidakis NA. Treatment modalities in children with teeth affected by molar-incisor enamel hypomineralisation (MIH). A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010;11(2):65-74.
50. Lygidakis NA, Dimou G, Briseniou E. Molar-incisor-hypomineralisation (MIH). Retrospective clinical study in greek children. I. Prevalence and defect characteristics. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2008;9(4):200-6.
51. Lygidakis NA, Dimou G, Marinou D. Molar-incisor-hypomineralisation (MIH). A retrospective clinical study in greek children. II. Possible medical aetiological factors. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2008;9(4):207-17.

52. Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou AM, Alaluusua S, Espelid I. Best clinical practice guidance for clinicians dealing with children presenting with molar-incisor-hypomineralisation (MIH): an EAPD Policy Document. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(2):75-81.
53. Mastroberardino S, Campus G, Strohmenger L, Villa A, Cagetti MG. An innovative approach to treat incisors hypomineralization (MIH): a combined use of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and hydrogen peroxide-a case report. *Case Rep Dent*. 2012;2012:379593. doi: 10.1155/2012/379593. Epub 2012 Nov 26.
54. Muratbegovic A, Markovic N, Ganibegovic Selimovic M. Molar Incisor Hypomineralisation in Bosnia and Herzegovina: aetiology and clinical consequences in medium caries activity population. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2007;8(4):189-94.
55. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach PH, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(8):911-34.
56. Narvai PC, Castellanos RA, Frazão P. Dental caries prevalence in permanent teeth of schoolchildren in the municipality of São Paulo, Brazil, 1970-1996. *Rev Saude Publica*. 2000;34(2):196-200.
57. Needleman HL, Leviton A, Allred E. Macroscopic enamel defects of primary anterior teeth-types, prevalence, and distribution. *Pediatr Dent*. 1991;13(4):208-16.

58. Ozturk A, Famili P, Vieira AR. The antimicrobial peptide DEFB1 is associated with caries. *J Dent Res*. 2010;89(6):631-6.
59. Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol*. 2001;20(5-6):273-92.
60. Paine ML, Zhu DH, Luo W, Bringas P, Goldberg M, White SN, et al. Enamel biomineralization defects result from alterations to amelogenin self-assembly. *J Struct Biol*. 2000;132(3):191-200.
61. Patir A, Seymen F, Yildirim M, Deeley K, Cooper ME, Marazita ML, et al. Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. *Caries Res*. 2008;42(5):394-400.
62. Phipps KR. No evidence to support the claim that amoxicillin causes molar-incisor hypomineralization. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(3):73-5.
63. Preusser SE, Ferring V, Wleklinski C, Wetzel WE. Prevalence and severity of Molar Incisor Hypomineralization in a region of Germany-a brief communication. *J Public Health Dent*. 2007;67(3):148-50.
64. 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.

65. Rodd HD, Boissonade FM, Day PF. Pulpal status of hypomineralized permanent molars. *Pediatr Dent*. 2007;29(6):514-20.
66. Rodd HD, Morgan CR, Day PF, Boissonade FM. Pulpal expression of TRPV1 in molar incisor hypomineralisation. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2007;8(4):184-8.
67. Sahlberg C, Pavlic A, Ess A, Lukinmaa PL, Salmela E, Alaluusua S. Combined effect of amoxicillin and sodium fluoride on the structure of developing mouse enamel in vitro. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1155-64.
68. Salama AH, Bailey RL, Eisenmann DR, Zaki AE. Quantitative cytochemistry of lysosomal structures in rat incisor maturation enamel organ. *Arch Oral Biol*. 1990;35(7):535-9.
69. Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipólito O, Camargo LE, Line SR. Absence of mutations in the homeodomain of the MSX1 gene in patients with hypodontia. *Am J Med Genet*. 2000;92(5):346-9.
70. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J*. 1997;47(3):173-82.
71. Shaffer JR, Wang X, Feingold E, Lee M, Begum F, Weeks DE, et al. Genome-wide association scan for childhood caries implicates novel genes. *J Dent Res*. 2011;90(12):1457-62.

72. Shimizu T, Ho B, Deeley K, Briseño-Ruiz J, Faraco IM, Schupack BI, et al. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *PLoS One*. 2012;7(9):e45022. doi: 10.1371/journal.pone.0045022. Epub 2012 Sep 24.
73. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ*. 2001;65(9):896-905.
74. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):441-9.
75. Slayton RL, Cooper ME, Marazita ML. Tuftelin, mutans streptococci, and dental caries susceptibility. *J Dent Res*. 2005;84(8):711-4.
76. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):128-61
77. Souza JF, Costa-Silva CM, Jeremias F, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Molar Incisor Hypomineralisation: Possible aetiological factors in children from urban and rural areas. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2012;13(4):164-70.
78. Soviero V, Haubek D, Trindade C, Da Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old brazilian children. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(3):170-5.

79. Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 2005;84(12):1117-26.
80. Suckling GW. Developmental defects of enamel-historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):87-94.
81. Suga S. Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):188-98.
82. Tannure PN, K uchler EC, Falagan-Lotsch P, Amorim LM, Raggio Luiz R, Costa MC, et al. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res.* 2012;46(4):401-7.
83. Tapias-Ledesma MA, Jiménez R, Lamas F, González A, Carrasco P, G il de Miguel A. Factors associated with first molar dental enamel defects: A multivariate epidemiological approach. *J Dent Child.* 2003;70(3):215-20.
84. Vieira AR, Deeley KB, Callahan NF, Noel JB, Anjomshoaa I, Carricato WM, et al. Detection of streptococcus mutans genomic DNA in human DNA samples extracted from saliva and blood. *ISRN Dent.* 2011;2011:543561. doi: 10.5402/2011/543561. Epub 2011 Apr 10.

85. Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res*. 2008;87(5):435-9.
86. Wang X, Shaffer JR, Zeng Z, Begum F, Vieira AR, Noel J, et al. Genome-wide association scan of dental caries in the permanent dentition. *BMC Oral Health*. 2012;12:57. doi: 10.1186/1472-6831-12-57.
87. Weerheijm KL. Molar Incisor Hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent*. 2003;4(3):114-20.
88. Weerheijm KL. Molar Incisor Hypomineralization (MIH): Clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update*. 2004;31(1):9-12.
89. Weerheijm KL, Duggal M, Mejàre 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.
90. Weerheijm KL, Jälevik B, Alaluusua S. Molar-Incisor Hypomineralisation. *Caries Res*. 2001;35(5):390-1.
91. Wen X, Lei YP, Zhou YL, Okamoto CT, Snead ML, Paine ML. Structural organization and cellular localization of tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11). *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(9):1038-46.

92. Whatling R, Fearne JM. Molar incisor hypomineralization: A study of aetiological factors in a group of UK children. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18(3):155-62.
93. William V, Messer LB, Burrow MF. Molar Incisor Hypomineralization: Review and recommendations for clinical management. *Pediatr Dent.* 2006;28(3):224-32.
94. Winter GB, Brook AH. Enamel hypoplasia and anomalies of the enamel. *Dent Clin North Am.* 1975;19(1):3-24.
95. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;217(1):23-30.

A microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing cellular structures. The image is overlaid with a vertical blue gradient that is darkest in the center and fades towards the left and right edges. The text '9 APÊNDICES' is centered over the image.

9 APÊNDICES

9 APÊNDICES

APÊNDICE1A

Para menores de 18 anos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu: _____ data de
nascimento _____ RG _____ profissão _____
morador(a) _____

cidade _____ sou responsável legal
de _____, data de nascimento

_____ e concordo na participação do mesmo na pesquisa intitulada “Avaliação genética da Hipomineralização Molar-Incisivo”, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto. Para isso autorizo a coleta de sua saliva. Fui informado(a) que este material será utilizado para estudar se esse problema nos dentes é passado dos pais para os filhos ou não. Também me foi explicado pelo pesquisador que essa pesquisa não tem nada a ver com teste de paternidade, só vai estudar se os filhos ganharam dos pais o problema nos dentes.

Estou ciente de que tenho a liberdade de me recusar a participar da pesquisa ou de retirar meu consentimento em qualquer fase desta, sem penalização. Autorizo que os dados sejam utilizados para pesquisa e sejam publicados em revistas científicas especializadas e/ou apresentados em congressos científicos, já que me foi garantido pelo pesquisador que minha identidade e a do menor citado acima serão mantidas em sigilo.

Declaro ainda, que a doação da saliva do menor não trará nenhum risco a sua saúde, mas que mesmo assim ele terá assistência integral garantida se ele sentir algum desconforto durante o exame ou durante o tratamento. Declaro que todas as minhas dúvidas sobre o assunto da pesquisa foram esclarecidas e que posso entrar em contato com o pesquisador sempre que desejar.

Ciente, _____, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do menor

Assinatura do responsável

Comitê de Ética em Pesquisa
(16)3301-6432/6434.

Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto
Pesquisadora responsável
Fone:(16) _____

APÊNDICE1B**Para maiores de 18 anos****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu: _____ data de
nascimento _____ RG _____ profissão _____ morador(a)
_____ cidade

_____, concordo em participar da pesquisa intitulada
“Avaliação genética da Hipomineralização Molar-Incisivo”, sob responsabilidade da Prof^a.
Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto. Para isso autorizo a coleta da minha saliva. Fui
informado(a) que este material será utilizado para estudar se esse problema nos dentes
é passado dos pais para os filhos ou não. Também me foi explicado pelo pesquisador
que essa pesquisa não tem nada a ver com teste de paternidade, só vai estudar se os
filhos ganharam dos pais o problema nos dentes.

Estou ciente de que tenho a liberdade de me recusar a participar da pesquisa ou
de retirar meu consentimento em qualquer fase desta, sem penalização. Autorizo que os
dados sejam utilizados para pesquisa e sejam publicados em revistas científicas
especializadas e/ou apresentados em congressos científicos, já que me foi garantido
pelo pesquisador que minha identidade e a do menor citado acima serão mantidas em
sigilo.

Declaro ainda, que a doação da minha saliva não trará nenhum risco a minha
saúde, mas que mesmo assim terei assistência integral garantida se eu sentir algum
desconforto durante o exame. Declaro que todas as minhas dúvidas sobre o assunto da
pesquisa foram esclarecidas e que posso entrar em contato com o pesquisador sempre
que desejar.

Ciente, _____, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do responsável

Comitê de Ética em Pesquisa
(16)3301-6432/6434.

Prof^a. Dr^a. Lourdes dos Santos-Pinto
Pesquisadora responsável
Fone:(16) _____

A microscopic image of a plant stem cross-section, showing various tissue layers. A vertical blue line runs through the center of the stem. The text "10 ANEXOS" is overlaid on the image.

10 ANEXOS

10 ANEXOS

ANEXO 1

CRITÉRIO DE JULGAMENTO USADO NO DIAGNÓSTICO HMI

Crianças serão consideradas como portadoras de HMI quando houver um ou mais primeiros molares permanentes com lesões demarcadas em esmalte, podendo estar ou não associados a alterações em incisivos permanentes.

Critério de julgamento usado no diagnóstico HMI (adaptado de Weerheijm *et al.*, 2003)

1	Opacidade Demarcada	Defeito demarcado envolvendo uma alteração na translucidez do esmalte, de graus variados. O esmalte alterado tem uma espessura normal, com superfície lisa e pode ser branca, amarela ou marrom.	1 Branca 2 Amarela 3 Marrom
2	Fraturas	Defeito que indica deficiência na face após a erupção do dente. Perda do esmalte formado após a irrupção dentária. A perda é sempre associada a uma opacidade demarcada prévia.	1 Leve 2 Moderada (peq. perda de esmalte/envolve + 1 face, sem envolver cúspide) Severa (degradação da coroa com envolvimento de cúspide) 3
3	Restauração atípica	O tamanho e a forma da restauração não são correspondentes a um preparo para cárie. Em muitos casos molares têm suas restaurações estendidas para a face vestibular ou palatina (lingual). Frequentemente as bordas das restaurações apresentam opacidade. Nos incisivos uma restauração na face palatina pode estar presente, não sendo associada à cárie.	1 Aceitável 2 Não aceitável (com infiltração e/ou recidiva de cárie)
4	Extraído	Suspeita-se de exodontia por HMI quando: opacidades ou restaurações atípicas em outros primeiros molares permanentes, combinado com a ausência de um primeiro molar. Ausência de primeiros molares em uma dentição saudável em combinação com opacidades demarcadas em incisivos. Não é comum incisivo ser extraído pela MIH.	
5	Não Irrompido	Primeiro molar permanente ou incisivo a ser examinado não irrompido.	

ANEXO 2

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FOAR-UNESP

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 18 de julho de 2013.

FABIANO JEREMIAS