



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



DIEGO GIROTTTO BUSSANELI

**POLIMORFISMOS EM GENES DA RESPOSTA IMUNE EM INDIVÍDUOS COM
HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO (HMI)**

Araraquara
2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



DIEGO GIROTTTO BUSSANELI

**POLIMORFISMOS EM GENES DA RESPOSTA IMUNE EM INDIVÍDUOS COM
HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO (HMI)**

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

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Loio
Cordeiro**

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Jeremias

**Araraquara
2017**

Bussaneli, Diego Giroto

Polimorfismos em genes da resposta imune em indivíduos com Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) / Diego Giroto Bussaneli.-- Araraquara: [s.n.], 2017

97 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Jeremias

1. Esmalte dentário 2. Polimorfismo genético 3. Desmineralização do dente I. Título

DIEGO GIROTTTO BUSSANELI

POLIMORFISMOS EM GENES DA RESPOSTA IMUNE EM
INDIVÍDUOS COM HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO (HMI)

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e orientador: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Loiola Cordeiro

2º Examinador: Prof^a Dr^a Lourdes Santos-Pinto

3º Examinador: Prof^a Dr^a Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga

4º Examinador: Prof Dr Manuel Restrepo Restrepo

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

Araraquara, 01 de agosto de 2017.

DADOS CURRICULARES

DIEGO GIROTTI BUSSANELI

NASCIMENTO: 19/09/1988 – Penápolis – São Paulo - Brasil

FILIAÇÃO: José Odemir Bussaneli e Iolanda Ap. Girotto Bussaneli

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2006 – 2010: Curso de Graduação em Odontologia,
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp

2011 – 2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área
de concentração em Odontopediatria, nível Mestrado,
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp

2013 – 2017: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área
de concentração em Odontopediatria, nível Doutorado,
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai José, minha mãe Iolanda, a minha irmã Daiana e aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas boas que tem cruzado o meu caminho. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

Ao meu pai, **José** e minha mãe, **Iolanda**, pela educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para que fosse a melhor, agradeço também pela formação humana, o que de mais importante vocês fizeram por mim.

A minha irmã, **Daiana**, que mesmo estando longe sempre me ajudou e amparou nos momentos difíceis. Ao meu afilhado **Ignacio** e minha sobrinha **Cecília**, que com seu amor me inspiraram.

Aos meus avós, **Olga** e **Arquimedes**, que nunca deixaram de zelar e orar por mim, todos os dias.

Aos meus tios, primos e familiares, que sem vocês meus sonhos não se realizariam.

Aos meus grandes amigos, **Manuel Restrepo**, **Fabiano Jeremias**, **Taisa Pansani**, **Cyneu Pansani** e **Maria Isabel**, que fizeram todos os momentos que compartilhamos especiais e únicos, me ajudando a superar as dificuldades de maneira suave (e muitas vezes divertida). Saber que vocês estão sempre ao meu lado me dá força para continuar em qualquer situação, e por isso agradeço de coração!

Aos meus queridos amigos **Leonardo Bonan**, **Rodrigo Bracco**, **Gustavo** e **Chris Batel**, que mesmo distantes me apoiaram com sua amizade verdadeira.

Aos meus novos amigos **Mariana Bezamat**, **Kyle Chapel**, **Rasha Alotabi**, **Arthur Cunha**, **Jennifer (Yuqiao Zhou)**, **Yelda Kasimoğlu** e **Indiara Welter Henn**.

Fazer novas amizades nos recorda que a vida é uma constante surpresa e do nada pode surgir algo maravilhoso.

Aos meus amigos do Departamento de Clínica Infantil: **Márcia Carvalho, Cristina Affonso Christiano, Dulce Helena Oliveira, Flávia De Annunzio, Jéssica Cavalheiro, e Odete** pelos momentos de convívio agradável, companheirismo e amizade.

A **Elaine Nadine Dizak**, por toda sua ajuda e dedicação durante meu estágio no exterior.

A Profa. **Raquel**, que com sabedoria e carinho dedicou seu tempo para minha formação e aprendizado. O convívio com você me fez ter certeza do caminho que escolhi.

Ao **Prof. Alexandre Rezende Vieira**, meu orientador no exterior, que me recebeu em seu laboratório e sempre se mostrou disposto a me ensinar, e à **Universidade de Pittsburgh**.

Ao **Laboratório de Genética Molecular** e **Livia, Rafael, Thamiris, Suzane, Sâmia e Sâmara**, por terem me acolhido de braços abertos e tornado todos os dias de trabalho em momentos agradáveis.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, e **todos seus funcionários**.

A **Profa. Tuka**, por todo incentivo, apoio e ensinamentos. Sem sua ajuda certamente não estaria aqui hoje.

Finalmente agradeço à **Profa. Rita** por todos estes anos de orientação e amizade. A senhora foi muito além de uma orientada, e me ensinou lições valiosas que levarei por toda a vida.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim,
fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-Reitor Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - Unesp, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e de seu Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da FOAr - Unesp, representado pela Coordenadora Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti e Vice-Coordenadora Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli.

Ao Departamento de Clínica Infantil da FOAr - Unesp, representada pelo Chefe de Departamento Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins e Vice-Chefe, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro.

Aos docentes da disciplina de Odontopediatria da FOAr - Unesp, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fabiano Jeremias, Prof. Dr. Fábio Cesar Braga de Abreu-e-Lima, Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti, Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa, Profa. Dra. Lourdes dos Santos-Pinto (Tuka) e Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Secretaria da Pós-Graduação, funcionários da Biblioteca e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da FOAr - Unesp.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do programa Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio e financiamento, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho (454300/2014-0).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Bussaneli DG. Polimorfismos em genes da resposta imune em indivíduos com Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI). [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível associação entre a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) e polimorfismos em genes da resposta imune, e sua interação com polimorfismos em genes relacionados a amelogênese. Amostras de DNA foram coletadas de 101 núcleos familiares que apresentavam pelo menos uma criança diagnosticada com HMI. Onze polimorfismos de base única (SNP) relacionados a resposta imune foram genotipados por meio de PCR em tempo real com ensaio TaqMan. A análise da associação foi realizada com o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), levando-se em consideração a severidade da HMI. A interação gene-gene entre os polimorfismos da resposta imune e da amelogênese foi realizada por meio da observação da transmissão dos alelos referentes aos marcadores pelos pais heterozigotos para ambos os marcadores, e o teste Qui quadrado foi utilizado a fim de determinar se ambos os alelos são transmitidos mais frequentemente em associação, do que individualmente. O nível de significância adotado foi de 5%. Resultados significantes foram obtidos para o SNP rs10733708 (gene *TGFB1*, OR = 3.5, 95% IC = 1.1 – 10.6) para os casos severos de HMI. As interações gene-gene foram significativas entre o SNP rs6654939 (*AMELX*) com os SNPs rs2070874 (*IL4*), rs2275913 (*IL17A*), rs1800872 (*IL10*), rs1800587 (*IL1A*) e rs3771300 (*STAT1*). O SNP rs2070874 (*IL4*), quando associado com os marcadores rs7526319 (*TUFT1*) e rs2355767 (*BMP4*) também demonstrou resultados significativos, sugerindo um efeito sinérgico da transmissão destes alelos com a susceptibilidade à HMI. Este estudo baseado em família demonstrou uma associação entre a variação no gene do *TGFB1* e a HMI, sendo que os polimorfismos em genes da resposta imune e da amelogênese podem apresentar um efeito aditivo no risco de desenvolver HMI.

Palavras-chave: Esmalte dentário. Polimorfismo genético. Desmineralização do dente.

Bussaneli DG. Immune-related genes polymorphisms are associated with Molar-Incisor Hypomineralization (MIH). [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the possible association between immune-related genes polymorphisms and Molar-Incisor Hypomineralization (MIH), and its interaction with amelogenesis-related genes polymorphisms. DNA samples were obtained from 101 nuclear families that had at least one MIH affected children. Eleven single nucleotide polymorphisms (SNP) were investigated in immune response candidate genes using the TaqMan method. Association analysis was performed by the transmission/disequilibrium test (TDT) considering the MIH severity. The gene-gene interaction between the immune-related and amelogenesis-related polymorphisms was performed by observing the transmission of markers alleles from parents heterozygous for both of the markers. The Qui squared test was used to determine whether both alleles are transmitted more often in association than individually. Significant result was observed for the SNP rs10733708 (TGFB1 gene, OR = 3.5, 95% CI = 1.1 - 10.6) for severe cases of HMI. Gene-gene interactions were significant between SNPs rs6654939 (AMELX) and SNPs rs2070874 (IL4), rs2275913 (IL17A), rs1800872 (IL10), rs1800587 (IL1A) and rs3771300 (STAT1). The SNP rs2070874 (IL4) was significant when associated with SNPs rs7526319 (TUFT1) and rs2355767 (BMP4), suggesting a synergistic effect of the transmission of these alleles with susceptibility to HMI. This family-based study demonstrated an association between variation in the TGFB1 gene and HMI. The polymorphisms in immune response and amelogenesis genes may have an additive effect on the risk of developing HMI.

Keywords: Dental enamel. Genetic polymorphisms. Tooth hypomineralization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Classificação e diagnóstico	18
2.2 Etiologia	20
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	52
APÊNDICES	53

1 INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é a estrutura mais mineralizada do corpo humano, correspondendo a mais de 97% de minerais em peso. Sua formação se inicia a partir de uma matriz extracelular de proteínas sintetizadas e secretadas pelos ameloblastos durante a amelogênese. Diferente de outros tecidos mineralizados, como os tecidos ósseo, cartilaginoso e dentinário, o esmalte se origina do epitélio e não possui capacidade de sofrer reabsorção e remodelação ²⁹.

Do ponto de vista ultra estrutural, o esmalte é formado por um conjunto bem organizado de prismas. Cada prisma é constituído por longos e compactos cristais de carbonato-apatita alinhados que se estendem quase pela espessura total da camada de esmalte ⁵⁷. Durante o seu desenvolvimento, no estágio de secreção, as proteínas da matriz secretadas pelos ameloblastos controlam o crescimento aposicional dos cristais de apatita, funcionando como uma espécie de arcabouço para o alongamento dos minerais destes cristais ⁸⁸. Caso algum distúrbio aconteça nesta fase inicial de secreção da matriz, o resultado será defeitos morfológicos quantitativos clinicamente conhecidos como hipoplasia de esmalte ¹⁶.

Após o estágio de secreção, as proteínas da matriz do esmalte são subsequentemente removidas, permitindo o crescimento volumétrico durante a fase de maturação da amelogênese, sendo a quantidade e natureza das proteínas presentes no ambiente local capazes de influenciar o processo de maturação ⁸⁹. Dessa forma, interrupções nos processos de mineralização e maturação podem resultar em um esmalte morfolologicamente normal, mas qualitativamente e estruturalmente defeituoso, caracterizando uma hipomineralização de esmalte ¹⁶.

Estes defeitos de desenvolvimento do esmalte podem afetar ambas as dentições, sendo causados por fatores genéticos e ambientais ¹⁶, que comprometem a função dos ameloblastos, que são células extremamente sensíveis a quaisquer insultos locais ou sistêmicos ^{72, 87} e incapazes de se regenerar após sofrerem um dano ⁶⁰.

Um defeito de esmalte que vem ganhando destaque na literatura mundial, devido ao grande desafio clínico que envolve o diagnóstico, a etiologia e o tratamento, é a Hipomineralização de Molares e Incisivos (HMI). Segundo Weerheijm et al., ¹⁰⁷ (2001) o termo descreve o aspecto clínico da hipomineralização de esmalte de origem sistêmica que afeta um ou mais primeiros molares permanentes, podendo ou não

estar associada aos incisivos permanentes. O esmalte afetado pela HMI apresenta opacidades demarcadas que variam de amarelo a castanho/marrom, e nos casos mais severos pode ainda apresentar perda de estrutura devido ao esmalte mais poroso, que aumenta os riscos de fraturas principalmente sob influência de forças mastigatórias, deixando a dentina desprotegida e favorecendo o desenvolvimento de lesões de cárie, evidenciando a associação deste defeito com a cárie dentária^{8, 15, 45}. Além de áreas hipomineralizadas no esmalte, crianças acometidas pela HMI podem apresentar problemas de manejo durante o atendimento clínico, com dificuldades na técnica operatória devido a hipersensibilidade dentária decorrente da variação de temperatura¹⁰⁷. A polpa dentária dos dentes afetados apresenta inflamação crônica devido a maior inervação na região subodontoblástica da área hipomineralizada, o que dificulta a ação anestésica⁴¹ e o tratamento odontológico. O esmalte afetado pela HMI também apresenta uma porosidade aumentada, tornando-se mais susceptível a fratura, principalmente sob influência de forças mastigatórias, deixando a dentina desprotegida, favorecendo o acúmulo de biofilme e o desenvolvimento de lesões de cárie^{42, 45}.

Estudos prévios abordaram o diagnóstico e prevalência da HMI no Brasil e no mundo^{18, 35, 39, 45, 50, 66, 96} a severidade da HMI e suas consequências¹⁷, os possíveis fatores etiológicos^{2, 4, 16, 91, 92, 112} além da relação com a cárie dentária^{6, 45, 71}. No que diz respeito a etiologia, desde sua descrição em 2001, vários estudos tentaram determinar a associação da HMI com uma variedade de fatores etiológicos, como por exemplo, problemas durante a gestação, parto prematuro, exposição a poluentes ambientais, doenças da primeira infância (catapora, otite, tonsilite, infecções urinárias), febre alta, distúrbios gastrointestinais, uso frequente de antibióticos e hipóxia no fim do período gestacional ou no momento do parto^{40, 62, 76, 105}. Porém, resultados de pesquisas e revisões sistemáticas da literatura concluíram que apesar de associados com HMI, nenhum dos potenciais fatores de risco analisados apresentaram uma causalidade convincente, sendo a evidência encontrada fraca ou moderada^{2, 16, 86, 101}. Assim sendo, o estudo da sua etiologia ainda representa um grande desafio a ser superado devido a dificuldade na identificação dos fatores que podem sensibilizar os ameloblastos durante a mineralização dos primeiros molares e incisivos permanentes e no potencial que estes eventuais fatores podem exercer no desequilíbrio dos processos biomoleculares.

Assim, estudos que utilizam modelos animais e técnicas de biologia molecular

representam um caminho promissor a fim de se elucidar os mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento da HMI. Um estudo in vitro com ratos demonstrou que a exposição diária a baixas doses de bisfenol-A (BFA) resulta no desenvolvimento de hipomineralizações no esmalte semelhantes a HMI em dentes humanos, através da modulação da expressão gênica de dois genes: *Enam* e *Klk4*, que são respectivamente responsáveis pela secreção e degradação da matriz protéica do esmalte - o que permite o crescimento mineral dos cristais ⁴⁴. Também foi reportado que a hipóxia pode aumentar a expressão de substâncias pró-inflamatórias endógenas, que afetam o metabolismo de células ameloblastóides por meio do aumento na expressão de genes do esmalte, como *Ambn*, *Enam*, *Amelx* e *Mmp-20* ⁸⁵. Essa hiperexpressão de proteínas extracelulares do esmalte pode induzir as propriedades fenotípicas observadas na HMI, uma vez que o esmalte afetado possui maior conteúdo proteico e menor conteúdo mineral ²⁷.

Ainda neste contexto, a análise da expressão gênica emerge como uma importante ferramenta, uma vez que a migração dos ameloblastos durante a amelogênese, a secreção de proteínas e a quantidade de células envolvidas estão sob controle genético ^{78, 87}. Dessa forma, alguns autores sugeriram que defeitos de esmalte poderiam ser resultados de variações em genes responsáveis pela formação do esmalte, e, portanto, associados com a HMI. Em 2013, Jeremias et al. ⁴⁶, investigaram possíveis polimorfismos nos genes relacionados à fase de maturação da amelogênese na população de Araraquara/SP (Brasil) e de Istambul (Turquia) e sugeriram a possibilidade de associação entre o esmalte com HMI e variações nos genes da formação do esmalte dentário. Em 2014, Kühnisch et al. ⁵⁶ analisaram a população de Munique (Alemanha) e identificaram o possível locus genético relacionado a HMI, localizado no cromossomo 22, referente ao gene *SCUBE1*, sugerindo que alterações nesse gene também poderiam resultar no desenvolvimento dessa condição.

Um fato interessante, é que muitas vezes os pais e/ou de crianças afetadas também apresentam HMI, sugerindo um possível fator hereditário. Dessa maneira, Jeremias et al. ⁴⁷, 2016 avaliaram a presença de associação genética de 63 polimorfismos em genes relacionados a amelogênese em um estudo baseado em família, utilizando o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), que avalia a frequência em que pais heterozigotos transmitem um determinado alelo para os filhos afetados e não afetados, encontrando que para o polimorfismo rs5979395 do gene da

AMELX, o alelo G foi transmitido para 97% das crianças afetadas, sugerindo que variações nos genes da amelogênese podem estar associados a maior susceptibilidade a desenvolver HMI.

Ainda no contexto de avaliações genéticas, o teste de genes candidatos é uma estratégia bastante eficiente e rápida para uma relação genótipo-fenótipo. Um método 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 sequência de DNA frequentes entre indivíduos e por isso mesmo, com grande potencial de uso como marcador genético para a localização de genes causadores de doenças ³⁴. No contexto do presente estudo, buscamos avaliar se o indivíduo apresenta carga genética relacionada a alteração nos genes da amelogênese, assim como da resposta-imune, sugerindo uma possível predisposição para a manifestação do defeito de esmalte em questão.

Considerando que o histórico médico de crianças afetadas pela HMI indica que o processo de formação dentária pode ser afetado por diversas doenças que resultam em períodos de febre prolongada ⁹⁷, e que substâncias pró inflamatórias da resposta imunológica decorrente dessas doenças (como as interleucinas, fator de transformação do crescimento beta e fator de necrose tumoral) podem regular a função de ameloblastos e odontoblastos durante o desenvolvimento dentário ^{31, 74, 85, 113} é plausível supor que a carga genética individual, que pode interferir com o grau de resposta imune (mais ou menos exacerbada), poderia também influenciar o processo de formação do esmalte dentário por meio da modulação da expressão dos genes envolvidos na maturação do esmalte.

Deste modo, o intuito deste estudo é verificar a possibilidade de haver polimorfismos nos genes relacionados a resposta-imune em pacientes com HMI, e se estes estão associados com genes relacionados a amelogênese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos 50 anos a Odontologia passou por uma grande mudança de paradigma, deixando de se preocupar apenas em buscar soluções técnicas para condições biológicas agudas. O desenvolvimento científico na área da saúde proporcionou um melhor entendimento dos fatores etiológicos relacionados a patogênese da cárie dentária e doença periodontal, e assim, ao invés de somente tratar as afecções bucais, o cirurgião dentista passou a preveni-las, desempenhando um papel fundamental no bem-estar do paciente e na redução na prevalência destas doenças. Com os menores índices de prevalência da cárie dentária e a manutenção do elemento dentário na boca, tornou-se mais fácil a identificação de outras alterações dentárias, que até então eram “mascaradas” pela cárie dentária. Um exemplo são os defeitos de desenvolvimento do esmalte, que compreendem tanto hipoplasias, quanto hipomineralizações.

As seções seguintes irão abordar os aspectos relacionados a classificação, diagnóstico e etiologia da Hipomineralização Molar-Incisivo, e também serão apresentados dados de uma metanálise realizada com os principais resultados da literatura, no que diz respeito as doenças que ocorrem durante os 4 primeiros anos de vida e que já foram relacionadas com a HMI.

2.1 Classificação e Diagnóstico

Em 2001, Weerheijm et al.¹⁰⁷ destacaram que além dos defeitos de desenvolvimento dentário herdados, como a amelogênese imperfeita e a dentinogênese imperfeita, defeitos adquiridos e idiopáticos também podem ser encontrados. Os defeitos adquiridos podem ser causados pela ingestão em excesso de flúor, hipocalcemia e trauma, enquanto que os idiopáticos acometem um número limitado de dentes com um esmalte poroso e aspecto de giz descolorido ou queijo holandês, sendo denominados pela literatura como opacidades não fluoróticas no esmalte, manchas opacas, opacidades idiopáticas no esmalte, e “molares em queijo”^{53, 99, 107}. Frente a variedade de nomenclatura desta condição, na reunião da Academia Europeia de Odontopediatria (EAPD) em 2001, esta hipomineralização idiopática passou a ser denominada de Hipomineralização Molar-Incisivo – HMI (ou do inglês MIH – Molar-Incisor Hypomineralisation), e definida como uma hipomineralização de origem sistema de um a quatro primeiros molares permanentes, que está frequentemente associada com incisivos afetados Weerheijm et al.¹⁰⁸, 2001.

De acordo com a FDI (Federação Internacional Dentária)²⁸, de forma geral, os defeitos de desenvolvimento do esmalte podem ser classificados em duas grandes categorias distintas: hipoplasia e hipomineralização. A hipoplasia apresenta uma menor espessura de esmalte na área afetada na forma de fossas profundas ou sulcos, sendo, portanto, um defeito quantitativo (FDI²⁸, 1982; Suckling et al.⁹⁴, 1989). Já a hipomineralização é caracterizada pela anormalidade na translucidez normal do esmalte, nas colorações branca, castanha, amarela ou marrom, de superfície lisa e espessura normal de esmalte, sendo, portanto, um defeito qualitativo (FDI²⁸, 1982; Suckling et al.⁹⁴, 1989). Porém esta classificação não diferencia claramente as hipoplasias das fraturas pós-eruptivas no esmalte, não sendo adequada para HMI. Dessa forma, frente as características peculiares que os dentes afetados pela HMI apresentam, em 2003 foi estabelecido um critério de diagnóstico para esta condição que incluía a presença de opacidades demarcadas, fraturas pós-eruptivas, restaurações atípicas e exodontias devido a HMI (Weerheijm et al.¹⁰⁶, 2003). Os autores responsáveis por esta classificação recomendam que os dentes devem estar limpos e húmidos para o exame, e que 8 anos é a idade ideal para a avaliação, uma vez que os quatro primeiros molares e incisivos permanentes já estão irrompidos.

Em 2006, Mathu-Muju e Wright⁶⁵ elaboraram uma forma de classificar a HMI de acordo com a severidade, baseada nas características da lesão descritas pelo critério de Weerheijm et al.¹⁰⁶, 2003. Foram consideradas de severidade leve as opacidades demarcadas em áreas onde não há estresse mastigatório, presença de opacidades isoladas, sem histórico de hipersensibilidade dentinária ou cáries associadas ao esmalte afetado e o envolvimento dos incisivos pode ser leve ou ausente. Já na severidade moderada há a presença de restaurações atípicas, fraturas pós-eruptivas e/ou cárie limitadas a uma ou duas superfícies dentárias, sensibilidade dentinária normal e preocupações estéticas por parte da criança ou dos pais. Nos casos graves, o esmalte apresenta fratura pós-eruptiva, que frequentemente ocorre durante a erupção dentária, lesões extensas de cárie, histórico de hipersensibilidade dentinária e restaurações atípicas defeituosas, sendo que a destruição coronária decorrente das fraturas pode facilmente atingir a polpa (Mathu-Muju et al.⁶⁵, 2006).

Na reunião da EAPD de 2009, Lygidakis et al.⁶³, 2010 elaboraram critérios de severidade mais simples, levando também em consideração o tamanho dos defeitos, determinando que aqueles menores de 1 mm não deveriam ser registrados. A severidade passou a ser dividida em leve (opacidades demarcadas sem fratura de

esmalte e ausência de hipersensibilidade dentinária); e severa (opacidades demarcadas associadas a fraturas pós-eruptivas, lesões de cárie e hipersensibilidade dentinária). Ainda buscando um índice adequado para classificar a severidade da HMI, Oliver et al.⁷⁰, 2014 propuseram um critério baseado na soma de pontos, atribuídos a nível de elemento e dentição afetados, de acordo com a coloração e localização do defeito, presença de restaurações atípicas, fraturas pós-eruptivas e hipersensibilidade à temperatura e à escovação. Assim, de acordo com a pontuação final obtida, a severidade da HMI era classificada em leve, moderada e severa, sendo também apresentadas opções de tratamento para cada nível de severidade, uma vez que quanto maior a pontuação obtida, maior a necessidade e complexidade do tratamento.

Hipomineralizações semelhantes a HMI podem também ser observadas em segundos molares decíduos, uma vez que o desenvolvimento simultâneo e localização anatômica dos segundos molares decíduos e dos primeiros molares permanentes pode ser indicativo de uma causa comum para o processo de hipomineralização. De acordo com Elfrink et al.²⁵ (2009), as opacidades em segundos molares decíduos devem ser denominadas de Hipomineralização de molares decíduos (HMD). Geralmente, os molares decíduos apresentam um acometimento mais leve em relação aos molares permanentes, porém foi demonstrado que a hipomineralização do esmalte representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de lesões de cárie na dentição decídua (Elfrink et al.²⁴, 2010).

Todo esse esforço em estabelecer um critério de classificação completo e de fácil utilização é importante para garantir o acompanhamento longitudinal de dentes afetados pela HMI, permitir a comparação de dados de prevalência em diferentes países, e principalmente facilitar o diagnóstico precoce, permitindo a adoção de medidas preventivas e terapias remineralizadoras tão logo as superfícies dentárias estejam acessíveis, e dessa forma evitar que fraturas pós-eruptivas ocorram.

2.2 Etiologia

Em pacientes com HMI não é raro encontrarmos mais de um molar afetado, sendo que muitas vezes os incisivos permanentes também estão acometidos. Este aspecto sugere uma origem sistêmica para esta condição, sendo que os dentes que estiverem em formação durante o período em que a alteração sistêmica ocorrer poderão ser afetados. Cabe lembrar que o processo de maturação do esmalte nos molares permanentes se inicia no primeiro ano após o nascimento e se estende até

os 3 anos de idade, sendo este período considerado o mais crítico para o desenvolvimento de defeitos no esmalte de primeiros molares e incisivos permanentes (Alaluusua ², 2010).

De acordo com os dentes envolvidos e o estágio de formação da coroa dentária, várias pesquisas tiveram objetivo de identificar condições que poderiam ser consideradas possíveis fatores etiológicos para HMI. Em 2003, Weerheijm et al.¹⁰⁶ desenvolveram um critério de classificação para HMI, permitindo que estudos observacionais com o objetivo de determinar possíveis fatores etiológicos associados a esta condição fossem conduzidos. Dentre as causas pré-natais, as doenças maternas durante a gestação, como por exemplo infecções de garganta, febre alta e estresse psicológico materno, foram relacionadas como possíveis fatores etiológicos por alguns autores (Ghanin et al.³³, 2013; Souza et al.⁹¹, 2012; Whatling et al.¹⁰⁹, 2008). Complicações durante o parto também foram associadas com o maior risco de desenvolver HMI, em um estudo conduzido por Pitiphat et al.⁷⁵, 2014. Os autores também encontraram associação significativa em crianças que nasceram por meio de cesarianas.

Alaluusua e Lukinmaas ³ (2006) relataram que a exposição a certos poluentes ambientais, como a Dioxina e o Furano, via leite materno também podem influenciar no processo de mineralização do esmalte e da dentina. Porém, devemos ter em mente que devido as políticas ambientais de controle da emissão de poluentes e o declínio nas concentrações de dioxinas, parece pouco provável que a contaminação por estas substancias via leite materno e/ou placenta estejam relacionados a HMI. Laisi et al.⁵⁹ (2008) avaliaram 167 mães e seus filhos, coletando amostras da placenta após o parto e examinando as crianças 7-10 anos após o nascimento para a presença de defeitos de esmalte e não encontraram associação entre a exposição a dioxinas via leite materno/placenta e HMI. Dessa forma, diversas condições sistêmicas e ambientais têm sido associadas a HMI, porém o limiar necessário para causar defeitos de esmalte durante os estágios de maturação da amelogenese ainda é desconhecido.

A etiologia da HMI também tem sido investigada por meio de modelos animais, onde a exposição a diferentes agentes etiológicos pode ser avaliada de maneira mais controlada. Ao expor ratos a baixas doses diárias de Bisfenol-A (BPA), Jedeon et al.⁴⁴ (2013) observaram que estes animais desenvolveram uma hipomineralização no esmalte muito similar a HMI em humanos, atribuindo este efeito à modulação que o

BPA exerce na expressão dos genes da *Klk4* e *Enam*, que são responsáveis pela secreção e degradação da matriz do esmalte, respectivamente.

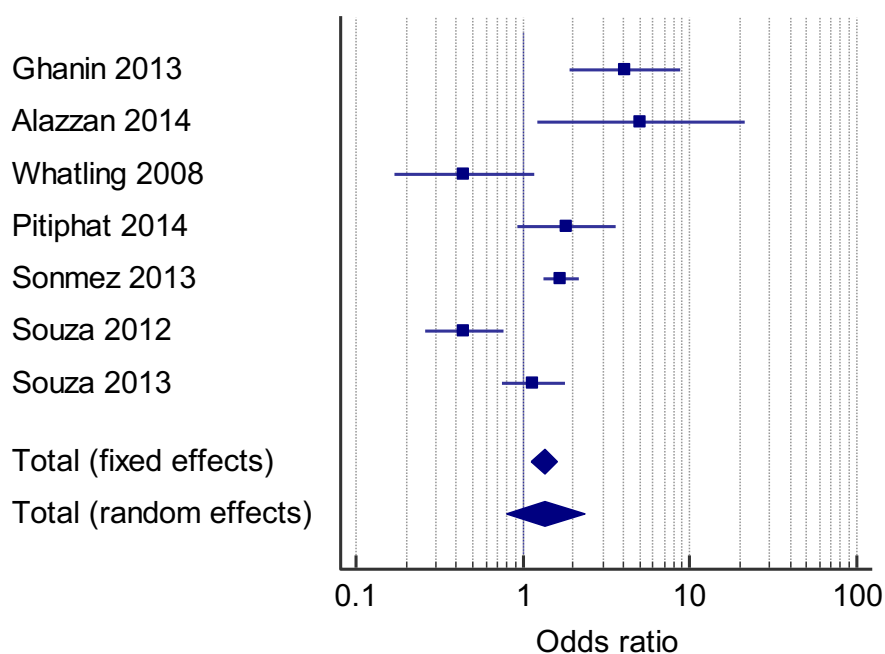
O uso de medicações também foi investigado como possível agente etiológico para HMI, sendo reportada a associação com o uso de antibióticos durante a infância (Allazzam et al.⁴, 2014; Souza et al.²⁰, 2016; Ghanin et al.³³, 2013; Jalevik et al.⁴⁰, 2001; Laisi et al.⁵⁹, 2008). Porém, considera-se que a associação com medicamentos seja particularmente problemática uma vez que é difícil estabelecer se a condição foi causada pelo tratamento em si ou pela doença. O mesmo caso acontece com medicamentos para o tratamento de asma e doenças respiratórias, onde associações positivas foram encontradas (Loli et al.⁶¹, 2015; Wogelius et al.¹¹⁰, 2010). Entretanto, em nenhum destes estudos foi possível controlar a própria doença, o que implica que as medicações para a asma possam também ter relação indireta na manifestação da doença, principalmente porque a asma e doenças respiratórias tem sido apontadas como possíveis fatores de risco para HMI por diversos estudos (Allazzam et al.⁴, 2006; Jalevik et al.⁴⁰, 2001; Kuhnisch et al.⁵⁵, 2014; Pitipath et al.⁷⁵, 2014).

As doenças que ocorrem na primeira infância, com idade até três ou quatro anos foram amplamente investigadas por diversos estudos retrospectivos, que além de avaliarem a relação entre uma série de condições específicas, como asma e febre, avaliaram também a saúde geral ou doença durante este período de vida. Assim, condições como febre alta (Allazzam et al.⁴, 2006; Ghanin et al.³³, 2013; Sonmez et al.⁹⁰, 2013; Souza et al.⁹², 2013), pneumonia e outras doenças respiratórias (Beentjes et al.¹¹, 2002; Ghanin et al.³³, 2013; Jalevik et al.⁴³, 2001) e otite média (Beentjes et al.¹¹, 2002; Jalevik et al.⁴³, 2001) tem sido positivamente associada ao desenvolvimento da HMI.

Nesta seção de revisão sobre etiologia, buscamos caracterizar as associações de eventos relacionados a HMI. Para isso, foi realizada uma busca nas principais bases de dados de saúde (PubMed, Scopus e Scielo) para identificação de estudos relevantes. Foram incluídos apenas estudos caso-controle ou coorte, realizados em crianças, tendo como desfecho apenas a variável binária: presença ou ausência de HMI. Após a extração dos dados dos artigos selecionados, foi realizada a metanálise com o objetivo de identificar as condições associadas a HMI. As Figuras de 1 a 5 mostram Forest Plots da associação entre as principais doenças da infância e a HMI, de acordo com estudos de etiologia publicados.

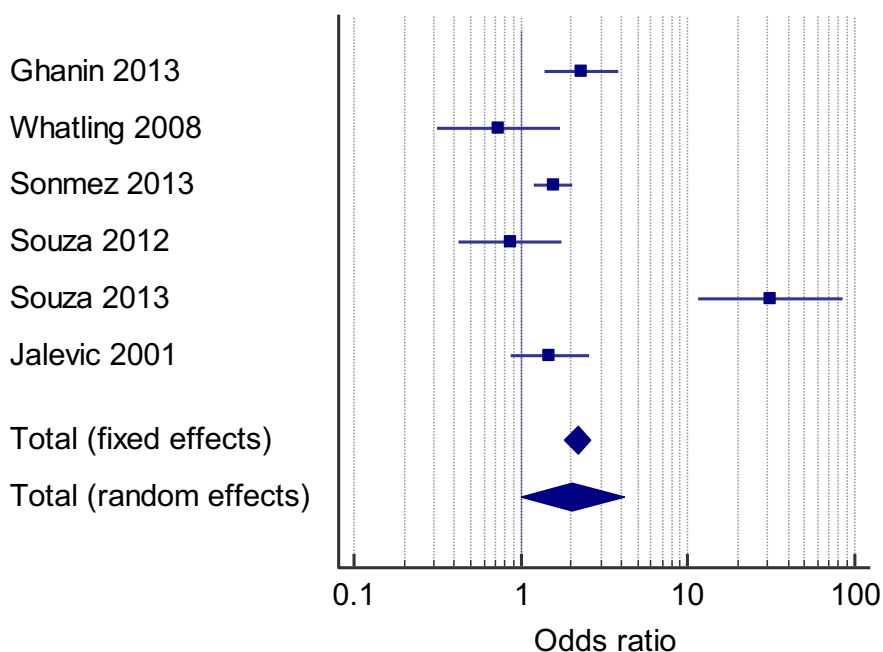
A partir da análise das figuras, podemos notar que obtivemos resultados significantes para doenças respiratórias (Figura 2), pneumonia (Figura 4) e asma (Figura 5). Porém é importante ressaltar que a heterogeneidade encontrada nos estudos foi significativa, demonstrando a necessidade de pesquisas futuras com amostras mais homogêneas.

Figura 1 - Forest Plot da associação entre febre alta relatada durante os 4 primeiros anos de vida e HMI.



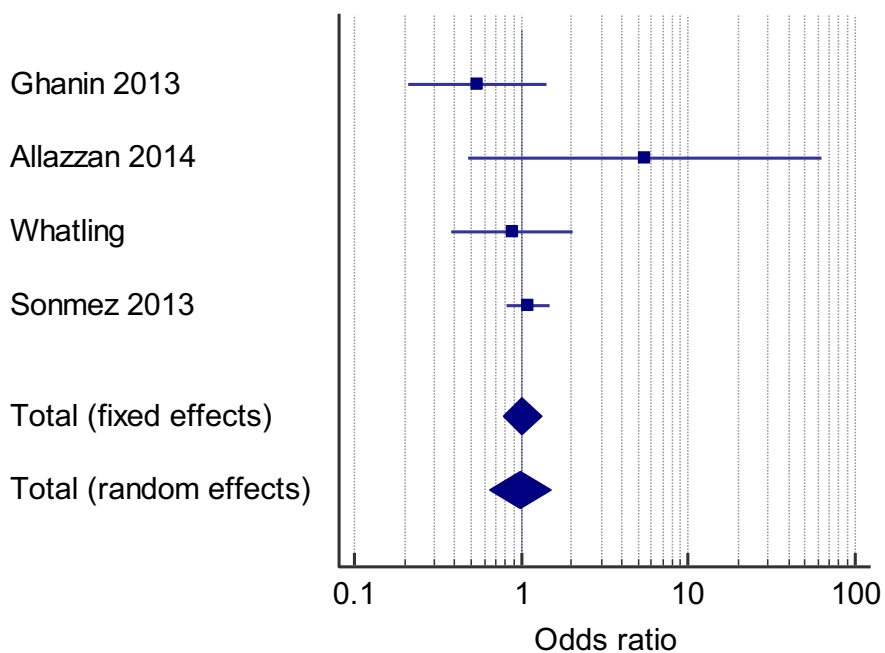
Fonte: Elaboração própria

Figura 2 - Forest Plot da associação entre doenças respiratórias relatadas durante os 4 primeiros anos de vida e HMI.



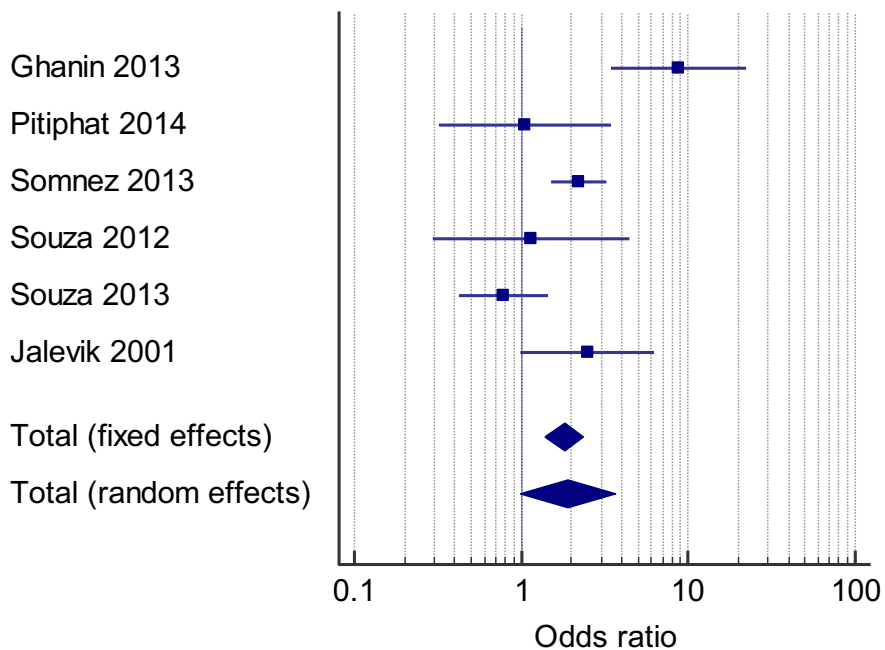
Fonte: Elaboração própria

Figura 3 - Forest Plot da associação entre otite relatada durante os 4 primeiros anos de vida e HMI.



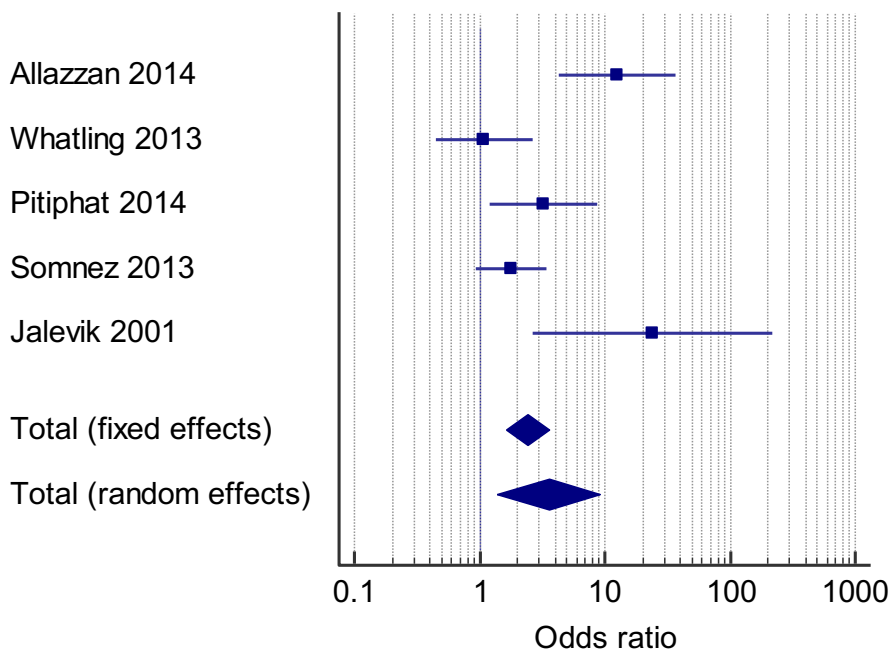
Fonte: Elaboração própria

Figura 4 - Forest Plot da associação entre pneumonia relatada durante os 4 primeiros anos de vida e HMI.



Fonte: Elaboração própria

Figura 5 - Forest Plot da associação entre asma relatada durante os 4 primeiros anos de vida e HMI.



Fonte: Elaboração própria

Com a redução dos índices de prevalência da cárie dentária, os defeitos de desenvolvimento de esmalte passaram a ser detectados com mais frequência não só em crianças, mas principalmente em adultos. Whatling et al.¹⁰⁹, (2008) relataram que os pais de crianças com HMI apresentavam histórico de defeitos de esmalte, sugerindo um possível componente genético envolvido. Jalevik e Noren⁴², em 2000 relataram casos de irmãos que apresentaram molares afetados por hipomineralizações e mancha branca nos incisivos permanentes, porém, nenhum registro da condição dentária dos pais foi realizado. A partir da observação de que os pais e/ou irmãos de crianças acometidas pela HMI frequentemente também apresentavam alguma alteração na formação do esmalte, estudos passaram a sugerir o potencial componente genético desta condição. Jeremias et al.⁴⁶, (2013) realizaram uma avaliação genética em cinco genes relacionados a amelogênese (ameloblastina - *AMBN*), amelogenina - *AMELX*, enamelina - *ENAM*, tuftelina - *TUFT1*) e proteína 11 que interage com tuftelina - *TFIP11*) em populações do Brasil e da Turquia, encontrando associação entre o marcador rs3796704 do gene *ENAM* e o defeito do esmalte avaliado em ambas populações, concluindo que vários genes envolvidos na formação do esmalte parecem contribuir para HMI.

Outro tipo de abordagem genética são os estudos de associação realizados em todo o genoma (GWAS), que por meio do sequenciamento completo de todo DNA busca associar a posição de gene (lócus genéticos) a uma determinada condição. Künish et al.⁵⁶ (2014) realizaram um estudo GWAS em crianças com HMI, e encontraram associação para o marcador rs13058467, localizado próximo ao gene *SCUBE1*, no cromossomo 22.

Em uma análise baseada em família, Jeremias et al.⁴⁷ (2016), avaliaram crianças com HMI e seus familiares, incluindo pais e irmãos. Após a genotipagem em 63 marcadores em genes relacionados a amelogênese, encontraram polimorfismos nos genes *FAM83H*, *AMBN*, *BMP2*, *BMP7*, *ENAM*, *MMP20*, *DLX3*, e *AMELX*, suportando a ideia de que a HMI é um distúrbio multifatorial com influência genética.

Do ponto de vista genético, apenas um evento isolado geralmente não é suficiente para o desenvolvimento de um determinado fenótipo, entretanto uma série de eventos consecutivos podem levar a alguma alteração de um alelo funcional anterior e consequentemente a um fenótipo alterado (Dimaras et al.²¹, 2012). Neste sentido, estudos que visam a associação de polimorfismos genéticos com uma determinada condição são úteis para a identificação de genótipos susceptíveis.

3 PROPOSIÇÃO

Investigar a possível associação entre polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *TNFA*, *TNFB1*, *IL17A*, *TGFBR1*, *STAT1*, relacionados a resposta imune, e a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) na população de Araraquara/SP; além de avaliar a possível interação entre os polimorfismos em genes da resposta imune e da amelogenese na susceptibilidade a HMI.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População estudada

A amostra deste estudo de associação foi constituída por 101 núcleos familiares (pai, mãe e irmãos biológicos), sendo que em cada um deles deveria constar pelo menos uma criança com HMI (probando). Dentro do núcleo familiar deveriam estar presentes indivíduos considerados caso e controle, sendo considerados caso os indivíduos com diagnóstico clínico de HMI e controle, os indivíduos sem o referido defeito de esmalte. Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram qualquer outro tipo de defeito de esmalte associado, evidência de síndromes congênitas, doenças sistêmicas, uso de aparelho ortodôntico fixo e aqueles cujos pais não aceitaram participar. O estudo foi iniciado após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (CAAE: 27484214.3.0000.5416) – ANEXO A.

No cálculo amostral realizado foram considerados os parâmetros da população a ser investigada, a estrutura familiar e parâmetros relacionados ao poder estatístico. O poder $(1 - \beta)$ de detectar associação genética com a amostra avaliada foi determinado com o programa TDT POWER CALCULATOR¹², utilizando um grau de significância α corrigido = 0,002 ajustado para múltiplos testes, por meio de correção de Bonferroni e uma prevalência da doença de 12,3% na população⁴⁵, resultando em um poder de 80%.

4.2 Exame clínico

O exame clínico foi realizado em um consultório odontológico dotado com luz artificial, sistema de sucção, água e ar, utilizando espelho plano número 5 e sonda preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Após limpeza e secagem dos dentes com gaze, foi realizada a inspeção completa por dois dentistas calibrados (κ intraexaminador = 0.88 e κ interexaminador = 0.85). O diagnóstico da HMI foi realizado utilizando-se o critério adaptado da EAPD¹⁰⁶, sendo o diagnóstico diferencial entre opacidades e lesão de mancha branca de cárie fundamentado nos critérios de Seow⁸³.

4.3 Coleta de material biológico e extração de DNA

A coleta de material biológico foi realizada em duplicata com bochecho de 3 mL

de solução autoclavada de glicose a 3% por 2 min, com intervalo de 5 minutos entre cada coleta. Familiares do probando também foram convidados a participar do estudo. As coletas foram realizadas na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP em tubos Falcon de 10 mL, que foram mantidos resfriados em caixa de isopor com gelo e transportados até o Laboratório de Genética Molecular da mesma Faculdade, onde foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min⁸². O sobrenadante foi desprezado e ao pellet de células foi adicionado 500 µL de solução tampão de extração de DNA (TrisHCl 10mM, EDTA 0,1 M, SDS 0,5% - pH 8.0) para posterior armazenagem em freezer a -80° C.

Para extração do DNA, foi utilizado o método do acetato de amônio a 8 M¹. Previamente, as amostras foram descongeladas, adicionadas de 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubadas a 42 °C overnight. Após esse período foram adicionados 500 µL de acetato de amônio 8 M, homogeneizado em vortex por 6 s e centrifugado a 30 °C a 14000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante transferido para dois microtubos (450 µL cada tubo). Na etapa seguinte foram adicionados 540 µL de isopropanol em cada tudo, que após agitação manual sutil foram novamente centrifugados a 14000 rpm, 30 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e 1800 µL de etanol 70 % foram adicionados para lavagem do DNA. Em seguida as amostras foram homogenizadas em vortex por 6 s e centrifugadas a 14000 rpm, 30 °C por 5 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi novamente descartado e um outro enxágue com etanol 70 % foi realizado. O pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de TE. O DNA genômico de cada amostra foi avaliado com relação a concentração (ng/µl) e pureza (260/280nm; 260/230nm) no aparelho NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -80°C até o momento da genotipagem.

4.4 Genotipagem

O software SNP Browser 4.0 (Applied Biosystems) foi utilizado para selecionar polimorfismos em 11 genes relacionados à resposta imune (*IL1A*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *TNFA*, *TNFB1*, *IL17A*, *TGFB1*, *STAT1*) – (Tabela 1). Cada SNP foi genotipado por meio de reações de PCR (Polimerase Chain Reaction) em Tempo Real, utilizando o sistema de genotipagem TaqMan® (Applied Biosystems) e o instrumento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Todos os ensaios de genotipagem foram realizados no volume de 20 µl,

contendo 2 µl de DNA na concentração 10 ng/µl, 0,96 µl de primer, 9,61 µl de Master Mix TaqMan e 7,43 µl de H₂O DNase free.

Tabela 1 - Marcadores e alelos dos polimorfismos nos genes relacionados a resposta imune.

Cromossomo	Gene	SNP	Alelo
1	<i>IL10</i>	rs1800872	AC
2	<i>IL1A</i>	rs1800587	CT
2	<i>IL1B</i>	rs1143634	CT
2	<i>STAT1</i>	rs3771300	AC
3	<i>TGFB1</i>	rs10733708	GT
4	<i>IL8</i>	rs4073	AT
5	<i>IL4</i>	rs2070874	CT
6	<i>TNF</i>	rs1800629	AG
6	<i>IL17A</i>	rs2275913	AG
7	<i>IL6</i>	rs1800795	CG
19	<i>TGFB1</i>	rs1800470	AG

Fonte: Elaboração própria

4.5 Análise estatística

4.5.1 Polimorfismos nos genes da resposta imune

A associação baseada em família foi realizada com o software PLINK v1.07⁷⁷, por meio do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) considerando a severidade da HMI (leve e severa). O método TDT avalia se a frequência de transmissão dos alelos de pais heterozigotos se desvia de 50% (frequência Mendeliana esperada) para os filhos afetados, avaliando se existe associação entre genes candidatos e uma determinada doença. Também foram calculadas as frequências dos alelos mais raros na população (*minimum allele frequency* – MAF), presença de erros Mendelianos e equilíbrio de Hardy-Weinberg. O poder estatístico ($1-\beta$) da amostra foi calculado com o software TDT Power Calculator v1.2.1¹² com parâmetros estabelecidos em 80%, erro tipo I corrigido em 95% e prevalência de HMI na população de 12,3%⁴⁵.

4.5.2 Interação gene-gene: resposta imune e amelogênese

A interação gene-gene entre os polimorfismos da resposta imune e os relacionados à amelogênese foi realizada levando em consideração os resultados não

significantes da análise de polimorfismos em genes relacionados à formação do esmalte, realizada previamente por nosso grupo de pesquisa ⁴⁷. Isso foi realizado por meio da observação da transmissão dos alelos referentes aos marcadores (um da resposta imune e outro da formação dentária) pelos pais heterozigotos para ambos os marcadores ¹⁰³. O teste Qui quadrado foi utilizado a fim de determinar se ambos os alelos são transmitidos mais frequentemente em associação, do que transmitidos individualmente. O nível de significância adotado para as análises foi estabelecido em 0,05.

5 RESULTADOS

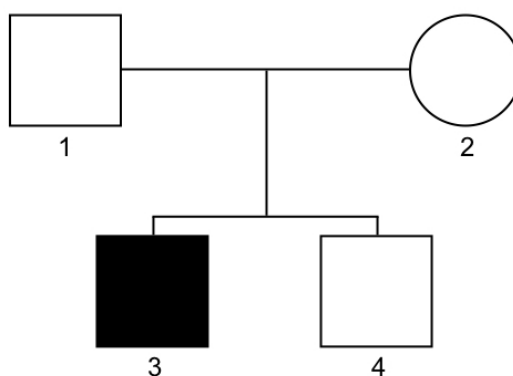
Com relação à presença de HMI nas famílias, 13,0 % das mães, 5,3% dos pais e 33,3% dos irmãos estavam afetados pela referida condição. Das 101 famílias avaliadas, 79 (78,2%) apresentaram apenas o probando afetado, 17 (16,8%) apresentaram dois indivíduos afetados (pais ou irmãos), e 5 famílias apresentaram 3 ou mais indivíduos afetados, equivalendo a 5% da casuística investigada. A média de idade dos indivíduos afetados avaliados foi de 10 anos (DMFT = 1.8). Na Figura 6 pode-se observar o heredograma de uma das famílias incluídas no estudo, com pais e irmão não afetados, e o probando afetado (indivíduo 3). A Tabela 2 mostra a distribuição e porcentagem dos indivíduos afetados e não afetados de acordo com o gênero. Entre os indivíduos afetados (n = 131), 50.4% foram diagnosticados com HMI severa (pelo menos um dente com perda estrutural).

Tabela 2 - Distribuição e porcentagem dos indivíduos afetados e não afetados de acordo com o gênero.

	Masculino	Feminino	Total
Ausente	71	25	96 (24,6%)
Não afetado	69	95	164 (41,9%)
Afetado	65	66	131 (33,5%)
Total	205 (53,4%)	186 (47,6%)	391

Fonte: Elaboração própria

Figura 6 - Heredograma de uma família incluída no estudo. A partir do probando (indivíduo 3), os pais e irmão foram convidados a participar do estudo.



Fonte: Elaboração própria

A Tabela 3 mostra os resultados da análise do desequilíbrio de transmissão (TDT), a frequência e transmissão do alelo mais raro (A1), e o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os marcadores relacionados à resposta imune nas famílias afetadas pela HMI.

Todos os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foram encontrados erros Mendelianos na amostra avaliada. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na análise do desequilíbrio de transmissão quando os dados foram analisados considerando todos os casos de HMI, mostrando que não houve transmissão preferencial de um dos alelos polimórficos para os indivíduos afetados.

Tabela 3 - Análise do desequilíbrio de transmissão dos SNPs relacionados à resposta imune nas famílias com HMI.

Gene	SNP	MAF	A1	T	NT	OR	HWE p-valor	TDT p-valor
<i>IL10</i>	rs1800872	0.309	T	14	24	0.58 (0.3-1.1)	1.000	0.086
<i>IL1A</i>	rs1800587	0.246	A	13	16	0.81 (0.3-1.6)	0.513	0.505
<i>IL1B</i>	rs1143634	0.214	A	16	17	0.94 (0.4-1.8)	1.000	0.631
<i>STAT</i>	rs3771300	0.493	T	28	20	1.4 (0.7-2.4)	1.000	0.258
<i>TGFBR1</i>	rs10733708	0.478	A	19	20	0.95 (0.5-1.7)	0.617	0.879
<i>IL8</i>	rs4073	0.442	A	22	30	0.73 (0.4-1.2)	1.000	0.241
<i>IL4</i>	rs2070874	0.224	T	15	15	1 (0.4-2.0)	1.000	1.000
<i>TNF</i>	rs1800629	0.112	A	9	11	0.81 (0.3-1.9)	1.000	0.827
<i>IL17A</i>	rs2275913	0.305	A	16	19	0.84 (0.4-1.6)	0.218	0.423
<i>IL6</i>	rs1800795	0.283	C	15	18	0.83 (0.4-1.6)	1.000	0.505
<i>TGFB1</i>	rs1800470	0.419	G	24	21	1.14 (0.6-2.0)	0.574	0.475

MAF: frequência do alelo mais raro, A1: alelo mais raro, T: transmitido / NT: não transmitido, HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg, OR: Odds ratio, IC 95%: intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração própria

Ao analisar os dados de genotipagem de acordo com severidade da HMI, foi observada diferença estatisticamente significativa para o SNP rs10733708 (*TGFBR1*, OR = 3.5, 95% Intervalo de Confiança = 1.1 - 10.6). Assim, verificou-se que dentre os casos severos de HMI o alelo G do SNP rs10733708 do gene *TGFBR1* foi transmitido com uma frequência de 78%, enquanto que o alelo A foi transmitido apenas em 22% dos casos (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise do desequilíbrio de transmissão dos SNPs relacionados à resposta imune nas famílias com HMI severa.

Gene	SNP	A1	T	NT	OR (IC 95%)	HWE p-valor	TDT p-valor
<i>IL10</i>	rs1800872	T	6	9	0.66 (0.2-1.8)	0.469	0.467
<i>IL1A</i>	rs1800587	A	4	6	0.67 (0.1-2.3)	0.672	0.763
<i>IL1B</i>	rs1143634	A	7	9	0.77 (0.2-2.0)	0.423	0.808
<i>STAT</i>	rs3771300	T	10	6	1.66 (0.6-4.5)	0.422	0.225
<i>TGFB1</i>	rs10733708	G	14	4	3.5 (1.1-10.6)	0.790	0.039
<i>IL8</i>	rs4073	A	10	7	1.42 (0.5-3.7)	0.780	0.394
<i>IL4</i>	rs2070874	T	3	4	0.75 (0.1-3.3)	1.000	0.480
<i>TNF</i>	rs1800629	A	3	6	0.5 (0.10-1.9)	1.000	0.317
<i>IL17A</i>	rs2275913	A	6	6	1 (0.3-3.1)	1.000	0.782
<i>IL6</i>	rs1800795	C	3	4	0.75 (0.1-3.3)	1.000	1.000
<i>TGFB1</i>	rs1800470	G	9	8	1.12 (0.4-2.9)	0.780	1.000

A1: Alelo mais raro, T: transmitido / NT: não transmitido, HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg, OR: Odds ratio, IC 95%: intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração própria

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da análise TDT dos polimorfismos nos genes da resposta imune analisados considerando os casos de HMI leve.

Tabela 5 - Análise do desequilíbrio de transmissão dos SNPs relacionados à resposta imune nas famílias com HMI leve.

Gene	SNP	A1	T	NT	OR (IC 95%)	HWE p-valor	TDT p-valor
<i>IL10</i>	rs1800872	T	8	15	0.53 (0.2-1.2)	0.803	0.102
<i>IL1A</i>	rs1800587	A	12	17	0.7 (0.3-1.4)	0.789	0.236
<i>IL1B</i>	rs1143634	A	9	9	1 (0.3-2.5)	0.199	0.531
<i>STAT</i>	rs3771300	T	17	13	1.3 (0.6-2.6)	0.194	0.590
<i>TGFB1</i>	rs10733708	A	13	8	1.62 (0.6-3.9)	0.084	0.200
<i>IL8</i>	rs4073	A	14	21	0.66 (0.3-1.3)	0.087	0.139
<i>IL4</i>	rs2070874	T	11	10	1.1 (0.4-2.5)	0.772	0.669
<i>TNF</i>	rs1800629	A	7	5	1.4 (0.4-4.4)	1.000	0.405
<i>IL17A</i>	rs2275913	A	9	13	0.69 (0.2-1.6)	0.406	0.161
<i>IL6</i>	rs1800795	C	12	12	1 (0.4-2.2)	1.000	0.694
<i>TGFB1</i>	rs1800470	G	14	13	1.07 (0.5-2.2)	0.647	0.465

A1: Alelo mais raro, T: transmitido / NT: não transmitido, HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg, OR: Odds ratio, IC 95%: intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração própria

Referente às análises de interação gene-gene, a Tabela 6 apresenta os resultados significativos obtidos dentre todas as 572 interações entre os genes selecionados relacionados à formação dentária e os genes da resposta imune. Nos Apêndices A-K pode-se observar os resultados de todas as interações entre os genes investigados neste estudo. Foram encontradas associações significativas entre s SNPs rs2070874 (*IL4*), rs2275913 (*IL17A*), rs1800872 (*IL10*), rs1800587 (*IL1A*) e rs3771300 (*STAT1*), com o SNP rs6654939 (*AMELX*), sugerindo um efeito sinérgico da transmissão destes alelos com a susceptibilidade à HMI. O SNP rs2070874 (*IL4*), também demonstrou associação significativa com os SNPs rs7526319 (*TUFT1*) e rs2355767 (*BMP4*) também demonstrou resultados significativos.

É interessante notar que não houve desequilíbrio de transmissão dos polimorfismos (quando analisados individualmente) com a HMI, mas que a presença de HMI foi associada à interação entre polimorfismos de determinados genes.

Tabela 6 - Interação gene-gene entre marcadores relacionados à formação dentária e da resposta imune. Apenas resultados significativos dentre as 572 análises de interação realizadas.

Genes (SNP rs)	Alelos	Famílias Informativas (n)	Transmitido/Não-transmitido	p-valor
<i>IL4</i> (2070874)/ <i>TUFT1</i> (7526319)	CT	22	12/3	0.03
	TC		3/12	0.03
	TT		5/2	NS
	CC		2/5	NS
<i>IL4</i> (2070874)/ <i>BMP2</i> (2355767)	CG	19	14/1	0.001
	TA		1/14	0.001
	TG		3/1	NS
	CA		1/3	NS
<i>IL4</i> (2070874)/ <i>AMELX</i> (6654939)	TT	27	7/5	NS
	CC		5/7	NS
	CT		14/2	0.006
	TC		2/14	0.006
<i>IL17A</i> (2275913)/ <i>AMELX</i> (6654939)	AT	27	10/3	NS
	GC		3/10	NS
	AC		1/13	0.003
	GT		13/1	0.003
<i>IL10</i> (1800872)/ <i>AMELX</i> (6654939)	GT	23	11/1	0.009
	TC		1/11	0.009
	GC		8/6	NS
	TT		6/6	NS
<i>IL1A</i> (1800587)/ <i>AMELX</i> (6654939)	AT	26	8/3	NS
	GC		3/8	NS
	GT		12/3	0.03
	AC		3/12	0.03
<i>STAT1</i> (3771300)/ <i>AMELX</i> (6654939)	GT	27	13/2	0.009
	TC		2/13	0.009
	GC		3/10	NS
	TT		10/3	NS

SNP rs = número de referência do SNP.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou associação entre o SNP rs10733708 do gene *TGFB1* (resposta imune) e pacientes com hipomineralização molar-incisivo severa em um desenho experimental baseado em família por meio do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). Estudos que apresentam componente familiar são robustos na presença de subestrutura populacional, uma vez que os indivíduos dentro de uma mesma família são geneticamente homogêneos, fazendo com que a condição investigada seja altamente correlacionada entre os indivíduos de uma mesma família^{9, 58}. O TDT avalia se a frequência de transmissão de alelos de pais heterozigotos para as crianças afetadas se desvia da frequência Mendeliana esperada, comparando os alelos transmitidos e não transmitidos em um locus⁹³. Em 2016, Jeremias et al.,⁴⁷ avaliaram o desequilíbrio de transmissão de polimorfismos em genes relacionados a formação do esmalte em pacientes com HMI, e encontraram que o alelo G do polimorfismo rs5979395 no gene *AMELX* era transmitido preferencialmente aos pacientes afetados pela HMI em 97% dos casos.

Considerando que a etiologia da HMI tem sido relacionada a doenças da infância com componente inflamatório^{16, 39, 86}, este estudo é o primeiro a investigar a possível associação entre HMI e polimorfismos em genes da resposta imune. Dessa forma, a escolha dos genes candidatos para esta análise enfocou genes da resposta imune e suas possíveis consequências no desenvolvimento de patologias de natureza inflamatória, como por exemplo a asma, doenças respiratórias e doenças autoimunes e periodontite. As citocinas são um grupo de proteínas que incluem as interleucinas, fator de necrose tumoral, interferons e fator transformador do crescimento, que possuem efeitos pleiotrópicos em vários órgãos, sendo liberadas em diversas infecções e distúrbios que afetam o sistema imunológico por mecanismos pró e antiinflamatórios^{22, 67}. Polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL8* e *IL10* tem sido significativamente associados ao risco de se desenvolver periodontite^{19, 30}, enquanto que variações nos genes *TNFA* e *IL6* podem resultar na alteração da produção destas citocinas e consequentemente uma resposta inflamatória alterada, contribuindo para o desenvolvimento de otite média em crianças²⁶.

A via JAK/STAT é o principal mecanismo de sinalização para uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento, e a sua ativação estimula a proliferação, migração e diferenciação celular, desempenhando um papel fundamental no

desenvolvimento da resposta imune e, portanto, qualquer alteração que possa modular a atividade desta via pode alterar a intensidade da resposta imune ^{69, 79}. Polimorfismos na via de sinalização JAK/STAT foram associados a susceptibilidade à doença pulmonar crônica ⁵⁴ e a alergias relacionadas ao sistema imune ⁷³. Embora estas condições sejam frequentemente identificadas em pacientes com HMI, nossos resultados não mostraram relação direta entre o SNP rs3771300 no gene *STAT1* e a HMI. Possivelmente, a investigação de algum outro SNP presente neste gene poderia potencialmente ter produzido um resultado diferente. Sabe-se que nem todos os SNPs podem produzir um efeito no fenótipo, ou seja, nem todo SNP é funcional. Alguns polimorfismos podem afetar a regulação da expressão do gene, alterar a sequência de uma proteína, ou ainda agir sobre os processos de processamento de mRNA e tradução ¹⁰⁴. Entretanto, cabe ressaltar que o indivíduo pode ou não nascer com essa característica genética, podendo ou não ser manifestada. A expressão alterada de múltiplos genes devido a polimorfismos poderia representar um mecanismo comum de susceptibilidade a doenças complexas, e este efeito pode ser verificado por estudos de funcionalidade. Este tipo de estudo deveria ser desenvolvido futuramente a fim de identificar quais polimorfismos são funcionais para a susceptibilidade à HMI, uma vez que são realizados em tecidos-alvo, e a regulação de genes e processamento de mRNA são eventos específicos do tecido ¹⁰⁴, e a identificação de polimorfismos funcionais poderia levar a identificação de biomarcadores que poderiam auxiliar no diagnóstico e avaliação da susceptibilidade a esta condição.

O fator de transformação do crescimento β (TGF- β) é uma citocina multifuncional que desempenha um papel significativo em diversos processos biológicos, como por exemplo diferenciação celular, apoptose, formação óssea, angiogênese e regulação do sistema imune, sendo predominantemente secretado por células T ^{49, 64}. Nossos resultados mostraram associação entre o SNP rs10733708 do gene *TGFB1* e HMI, indicando que a secreção de TGF- β pode desempenhar um papel fundamental na formação do esmalte dentário, o que corrobora com estudos prévios que afirmam que a sinalização do TGF- β exerce funções multibiológicas, estando envolvida no desenvolvimento do órgão do esmalte ^{31, 52, 81, 117}, e embora não sejam proteínas constitutivas do esmalte, o TGF- β e seu receptor (TGFB-R1) são expressos durante os estágios de diferenciação do órgão do esmalte e início da secreção da matriz ^{31, 81}.

O desenvolvimento dentário se inicia a partir da interação entre células epiteliais e mesenquimais do primeiro arco branquial pela ação de diversos fatores de crescimento, como o TGF- β , fator de crescimento fibroblástico (FGF), proteína morfogenética óssea (BMP) e fator de crescimento epitelial (EGF) que são expressos por ameloblastos e odontoblastos ¹¹⁶. No caso do TGF- β , foi demonstrado que a expressão transitória durante os estágios secretores iniciais dos ameloblastos resulta na secreção anormal de matriz e deposição alterada de minerais, na forma de estruturas semelhantes a cistos, sendo estas alterações responsáveis pelo desenvolvimento de defeitos de esmalte ³⁶. Estes fatos nos levam a acreditar que polimorfismos no gene do receptor do TGF- β (*TGFB-R1*), possam também influenciar os processos de maturação do esmalte, uma vez que tanto o TGF- β quanto *TGFB-R1* são expressos durante a amelogênese ³¹, e portanto, podem contribuir para o desenvolvimento da HMI.

O efeito do TGF- β nos processos de mineralização e maturação do esmalte também pode ser indireto, uma vez que ele modula a expressão de KLK-4 e MMP-20 ^{13, 31, 95}, duas importantes enzimas necessárias para degradar as proteínas da matriz do esmalte em desenvolvimento, permitindo a mineralização e crescimento dos cristais de hidroxiapatita. A MMP-20 é secretada pelos ameloblastos durante o estágio secretório, garantindo o crescimento aposicional do esmalte ¹⁰, enquanto que a KLK-4 é secretada por ameloblastos maduros, e tem a função de reabsorver produtos da degradação de proteínas, promovendo a deposição mineral à medida que o esmalte aumenta sua dureza ³⁷. Sabendo que a expressão alterada de KLK-4 e MMP-20 já foi relacionada a defeitos de desenvolvimento do esmalte ¹¹¹, é plausível supor que a associação entre HMI e o polimorfismo rs10733708 do gene *TGFB-R1* pode ter afetado a expressão dos genes *MMP20* e *KLK4*, via regulação do TGF- β . Futuros estudos funcionais deverão testar essa hipótese.

Uma outra via de sinalização intermediada pelo TGF- β é pela ação de SMADs. Após a ativação do TGF- β por meio de seus receptores *TGFB-R1* na superfície celular, os SMADs são fosforilados e translocados para o núcleo, onde cooperam com fatores de transcrição específicos para regular a expressão gênica ^{68, 84}. As proteínas SMAD 2 e 3 podem ser encontradas no núcleo de células do epitélio interno do esmalte e do mesênquima dentário, exibindo padrões de expressão únicos durante o processo de morfogênese dentária, sugerindo que as SMADs ativadas via TGF- β são críticas na regulação do desenvolvimento dentário ¹¹⁴. Já foi demonstrado que os

Incisivos e molares de ratos deficientes em SMAD-3 exibiram uma redução significativa no grau de mineralização quando comparados a ratos selvagens, sugerindo que essa proteína é necessária para o processo de biomineralização do esmalte¹¹⁵. Tais dados potencialmente sugerem que polimorfismos no gene *TGFBR1* podem estar associados ao desenvolvimento de HMI pela modulação de SMADs.

Além da análise do desequilíbrio de transmissão para os genes da resposta imune, foram avaliadas as possíveis interações entre polimorfismos em tais gene com polimorfismos em genes relacionados ao processo de maturação do esmalte. Essa avaliação da interação gene-gene foi realizada a fim de se verificar uma possível influência indireta dos polimorfismos em genes relacionados à resposta imune na susceptibilidade a HMI. A ideia foi avaliar se alguma alteração na resposta imune poderia aumentar o risco de desenvolver HMI na presença de alterações nos genes relacionados à amelogenese por meio de um efeito aditivo, uma vez que doenças da infância com componente inflamatório são listadas como possíveis fatores etiológicos da HMI. Para isso, foram utilizados os resultados de genotipagem realizados no estudo prévio de Jeremias et al.⁴⁷, 2016 que avaliaram 63 SNPs em 21 genes envolvidos na formação do esmalte, levando-se em consideração apenas aqueles marcadores que não foram significativos quando analisados de maneira independente (analisado anteriormente). Isso foi realizado porque, se a análise incluísse os marcadores previamente associados com suscetibilidade a HMI, não seria possível identificar se o resultado encontrado seria realmente de uma associação entre os polimorfismos investigados ou se seria devido ao efeito daquele marcador independente, caso o resultado da interação gene-gene fosse significativo. A partir desta análise, foram encontradas associações significativas na interação do SNP rs6654939 (*AMELX*) com os SNP's rs2070874 (*IL4*), rs2275913 (*IL17A*), rs1800872 (*IL10*), rs1800587 (*IL1A*) e rs3771300 (*STAT1*).

A amelogenina, principal componente orgânico do esmalte, é secretada durante o estágio secretório da amelogenese, sendo que variações neste gene foram relacionadas com defeitos de desenvolvimento do esmalte^{14, 51}. A associação positiva da *AMELX* com genes envolvidos na resposta imune nos leva a acreditar que essas interações parecem ter um efeito aditivo na susceptibilidade à HMI, uma vez que algumas doenças consideradas como fatores etiológicos da HMI já foram também associadas a polimorfismos em genes da resposta imune. Exemplos destas condições são a asma, infecções de ouvido e respiratórias e alergias, como pode-se observar

em revisões sistemáticas de literatura ^{2, 16, 86}. De maneira semelhante, polimorfismos nas citocinas IL-10, IL-17A já foram reportados como sendo fatores de risco para o desenvolvimento de asma ^{23, 38}, e otite média ²⁶, enquanto que alterações no gene *STAT1* foram associadas a susceptibilidade a doença pulmonar crônica ⁵⁴. De acordo com Garg et al.³², 2012, a relação entre doenças respiratórias e HMI pode ser explicada pelos níveis anormais de oxigênio, resultantes da hipoventilação em doenças respiratórias, que podem inibir a ação de enzimas proteolíticas e o desenvolvimento dos cristais de hidrxiapatita, resultando em um esmalte hipomineralizado.

A interleucina-4 (IL-4) é uma importante citocina envolvida no processo de inflamação, estando associada a doenças orais, como por o exemplo a periodontite, através do aumento da proliferação de linfócito Th2, supressão da proliferação de linfócitos Th1 e regulação da resposta imune mediada por linfócitos ⁴⁸. Como a periodontite é uma doença complexa, com componente inflamatório envolvido em sua etiologia, é plausível supor que as associações entre *IL4* com *BMP2* e *TUFT1* encontrada neste estudo, possa ser explicada pelo fato de polimorfismos no gene da *IL-4* possuírem a capacidade de alterar a resposta imune do hospedeiro diante determinada doença durante os estágios de formação dentária, o que poderia influenciar indiretamente a expressão de genes relacionados a amelogenese. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado para o gene *IL1A*, que já foi positivamente associado a periodontite crônica ¹⁹. Salientamos que esta explicação se trata de uma hipótese, sendo que pesquisas futuras são necessárias para estabelecer um melhor entendimento da interação entre esses genes.

Este estudo de associação levou em consideração o desequilíbrio de transmissão (TDT) relacionado a polimorfismos em genes da resposta imune em pacientes com HMI, e embora esta análise seja amplamente utilizada em estudos que buscam encontrar uma possível relação entre genes candidatos e doenças complexas, a interpretação destes resultados deve ser realizada com cautela, uma vez que, caso apenas os indivíduos afetados fossem incluídos na análise, seria previsível esperar que o alelo de risco para a condição fosse preferencialmente transmitido. Por esta razão, realizamos uma análise baseada em família, onde os pais e irmãos não afetados servem como controle para os membros familiares com diagnóstico positivo de HMI. Com relação a análise estatística, optamos por não aplicar a correção de Bonferroni em nossos resultados, uma vez que teríamos que

reduzir o valor de alfa para 0.004 (0.05/11) e aumentando o erro tipo II ^{98, 100}, o que poderia nos levar a rejeitar a hipótese de uma associação biológica verdadeira. Além disso, a utilização de testes corrigidos poderia não detectar possíveis efeitos biológicos discretos. Vieira et al.¹⁰², 2008 demonstraram que associações verdadeiras podem ser perdidas quando a correção para múltiplos teste é implementada. Dessa forma, nossos resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que é esperado que alguns dos valores de p abaixo de 0.05 possam ser devido ao acaso.

Uma potencial limitação de nosso estudo reside no fato da população brasileira ser geneticamente heterogênea, com descendência europeia (principalmente portugueses e italianos), africana e ameríndia ⁵, e por esta razão deve-se ter cautela na extrapolação destes resultados para outras populações. Pesquisas futuras devem ser realizadas envolvendo pacientes de diferentes populações mantendo a maior padronização possível no que se refere aos critérios clínicos para seleção dos pacientes. Do mesmo modo, futuros estudos também deverão investigar a possível influência da interação gene-ambiente, uma vez que estas interações sofrem influencia conjunta dos fatores genéticos e ambientais sobre o risco de desenvolver uma doença, sendo que diversos fatores de risco exógenos e endógenos podem interagir com o organismo antes do surgimento da condição ⁷. Exemplos desta interação no desenvolvimento dentário se observa com a antibióticos ²⁰, e com fluoretos ⁸⁰, demonstrando que estes agentes podem interferir no estágio inicial da amelogenese por meio de alterações estruturais nos ameloblastos e redução na secreção de matriz do esmalte. Outro fator limitante de nosso estudo foi que nem sempre era possível examinar todos os potenciais participantes dentro de um mesmo núcleo familiar, pois muitas vezes os pais não podiam se ausentar do trabalho, ou a criança estava sob a guarda de parentes próximos por razões diversas, e em alguns casos alguns participantes se negaram a participar.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que, além de polimorfismos em genes diretamente relacionados à formação do esmalte, os polimorfismos em genes da resposta imune podem ter um efeito sinérgico, aumentando o risco de desenvolver HMI. Esta possibilidade vai em direção ao conceito atual relacionado à etiologia desta condição, que afirma que a esta não se trata de uma condição idiopática, mas sim multifatorial, com componente genético relacionado a distúrbios no estágio de maturação do esmalte ¹⁰¹, sendo a interação gene-gene e gene-ambiente determinante para o seu desenvolvimento.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que existe uma associação entre o polimorfismo rs10733708 do gene *TGFB^R1* e os casos severos de HMI, sugerindo que alterações em genes da resposta imune podem influenciar no desenvolvimento do esmalte dentário. Além disso, a interação entre polimorfismos em genes da resposta imune e da amelogênese parece ter um efeito aditivo na susceptibilidade a desenvolver HMI.

REFERÊNCIAS*

1. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007; 18(2): 148-52.
2. Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010; 11(2): 53-8.
3. Alaluusua S, Lukinmaa PL. Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review. *Int Dent J.* 2006; 56(6): 323-31.
4. Allazzam SM, Alaki SM, El Meligy OA. Molar incisor hypomineralization, prevalence, and etiology. *Int J Dent.* 2014; 2014: 234508.
5. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(2): 444-61.
6. Americano GC, Jacobsen PE, Soviero VM, Haubek D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. *Int J Paediatr Dent.* 2017; 27(1): 11-21.
7. Baldi D, Izzotti A, Bonica P, Pera P, Pulliero A. Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: the role of gene-environment interactions. *Mutat Res.* 2009; 667(1-2): 118-31.
8. Balmer RC, Laskey D, Mahoney E, Toumba KJ. Prevalence of enamel defects and MIH in non-fluoridated and fluoridated communities. *Eur J Paediatr Dent.* 2005; 6(4): 209-12.
9. Bansal V, Libiger O, Torkamani A, Schork NJ. Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(11): 773-85.
10. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* 2013; 2013: 684607.
11. 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.
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 A, Haruyama N, Hall B, Danton MJ, Zhang L, Arany P, et al. TGF-ss regulates enamel mineralization and maturation through KLK4 expression. *PLoS One.* 2013; 8(11): e82267.
14. Cho ES, Kim KJ, Lee KE, Lee EJ, Yun CY, Lee MJ, et al. Alteration of conserved alternative splicing in AMELX causes enamel defects. *J Dent Res.* 2014; 93(10): 980-7.
15. Cho SY, Ki Y, Chu V. Molar incisor hypomineralization in Hong Kong Chinese children. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18(5): 348-52.

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

16. Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19(2): 73-83.
17. Da Costa-Silva CM, Ambrosano GM, Jeremias F, De Souza JF, Mialhe FL. Increase in severity of molar-incisor hypomineralization and its relationship with the colour of enamel opacity: a prospective cohort study. *Int J Paediatr Dent*. 2011; 21(5): 333-41.
18. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro Rde C, 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.
19. da Silva MK, de Carvalho ACG, Alves EHP, da Silva FRP, Pessoa LDS, Vasconcelos DFP. Genetic Factors and the risk of periodontitis development: findings from a systematic review composed of 13 studies of meta-analysis with 71,531 participants. *Int J Dent*. 2017; 2017: 1914073.
20. de Souza JF, Gramasco M, Jeremias F, Santos-Pinto L, Giovanini AF, Cerri PS, et al. Amoxicillin diminishes the thickness of the enamel matrix that is deposited during the secretory stage in rats. *Int J Paediatr Dent*. 2016; 26(3): 199-210.
21. Dimaras H, Kimani K, Dimba EA, Gronsdahl P, White A, Chan HS, et al. Retinoblastoma. *Lancet*. 2012; 379(9824): 1436-46.
22. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007; 37 Suppl 1: S34-45.
23. Du J, Han JC, Zhang YJ, Qi GB, Li HB, Zhang YJ, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms of IL-17 gene are associated with asthma susceptibility in an asian population. *Med Sci Monit*. 2016; 22: 780-7.
24. Elfrink ME, Schuller AA, Veerkamp JS, Poorterman JH, Moll HA, ten Cate BJ. Factors increasing the caries risk of second primary molars in 5-year-old Dutch children. *Int J Paediatr Dent*. 2010; 20(2): 151-7.
25. Elfrink ME, Veerkamp JS, Aartman IH, Moll HA, Ten Cate JM. Validity of scoring caries and primary molar hypomineralization (DMH) on intraoral photographs. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009; 10 Suppl 1: 5-10.
26. Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing-Duistermaat JJ, Walraven V, de Groot R, et al. Genetic polymorphisms in immunoresponse genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 are associated with recurrent acute otitis media. *Pediatrics*. 2007; 120(4): 814-23.
27. Farah RA, Monk BC, Swain MV, Drummond BK. Protein content of molar-incisor hypomineralisation enamel. *J Dent*. 2010; 38(7): 591-6.
28. FDI. An epidemiological index of developmental defects of dental enamel (DDE Index). Commission on oral health, research and epidemiology. *Int Dent J*. 1982; 32(2): 159-67.
29. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*. 1999; 126(3): 270-99.
30. Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SC, Secolin R, Scarel-Caminaga RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(22): e6932.

31. Gao Y, Li D, Han T, Sun Y, Zhang J. TGF-beta1 and TGFBR1 are expressed in ameloblasts and promote MMP20 expression. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292(6): 885-90.
32. Garg N, Jain AK, Saha S, Singh J. Essentiality of early diagnosis of molar incisor hypomineralization in children and review of its clinical presentation, etiology and management. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2012; 5(3): 190-6.
33. Ghanim A, Manton D, Bailey D, Marino 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.
34. Goldstein DB, Cavalleri GL. Genomics: understanding human diversity. *Nature*. 2005; 437(7063): 1241-2.
35. Gurrusquieta BJ, Nunez VM, Lopez ML. Prevalence of molar incisor hypomineralization in mexican children. *J Clin Pediatr Dent*. 2017; 41(1): 18-21.
36. Haruyama N, Thyagarajan T, Skobe Z, Wright JT, Septier D, Sreenath TL, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114 Suppl 1: 30-4; discussion 9-41, 379.
37. Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*. 2007; 186(1): 78-85.
38. Huang ZY, Cheng BJ, Wan Y, Zhou C. Meta-analysis of the IL-10 promoter polymorphisms and pediatric asthma susceptibility. *Genet Mol Res*. 2016; 15(2).
39. Hysi D, Kuscu OO, Droboniku E, Toti C, Xhemnica L, Caglar E. Prevalence and aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation among children aged 8-10 years in Tirana, Albania. *Eur J Paediatr Dent*. 2016; 17(1): 75-9.
40. Jalevik B, Klingberg G, Barregard L, Noren 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. Jalevik 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. Jalevik B, Noren 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. Jalevik B, Noren JG, Klingberg G, Barregard 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. Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, Loiodice S, Marciano C, Kirkham J, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol*. 2013; 183(1): 108-18.
45. Jeremias F, de Souza JF, Silva CM, Cordeiro Rde C, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4): 870-6.

46. Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, et al. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1434-42.
47. Jeremias F, Pierri RA, Souza JF, Fragelli CM, Restrepo M, Finoti LS, et al. Family-based genetic association for molar-incisor hypomineralization. *Caries Res.* 2016; 50(3): 310-8.
48. Jia XW, Yuan YD, Yao ZX, Wu CJ, Chen X, Chen XH, et al. Association between IL-4 and IL-4R polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers.* 2017; 2017: 8021279.
49. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Pillars Article: production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Immunol.* 2014; 192(7): 2939-52.
50. Kevrekidou A, Kosma I, Arapostathis K, Kotsanos N. Molar incisor hypomineralization of Eight- and 14-year-old children: prevalence, severity, and defect characteristics. *Pediatr Dent.* 2015; 37(5): 455-61.
51. Kim YJ, Kim YJ, Kang J, Shin TJ, Hyun HK, Lee SH, et al. A novel AMELX mutation causes hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol.* 2017; 76: 61-5.
52. Klopčič B, Maass T, Meyer E, Lehr HA, Metzger D, Chambon P, et al. TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *Eur J Cell Biol.* 2007; 86(11-12): 781-99.
53. 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.
54. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Kochetova OV, Aznabaeva YG, Zagidullin Sh Z, Victorova TV. Inflammatory and immune response genes polymorphisms are associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in tatars population from Russia. *Biochem Genet.* 2016; 54(4): 388-412.
55. Kuhnisch J, Mach D, Thiering E, Brockow I, Hoffmann U, Neumann C, et al. Respiratory diseases are associated with molar-incisor hypomineralizations. *Swiss Dent J.* 2014; 124(3): 286-93.
56. Kuhnisch J, Thiering E, Heitmüller D, Tiesler CM, Grallert H, Heinrich-Weltzien R, et al. Genome-wide association study (GWAS) for molar-incisor hypomineralization (MIH). *Clin Oral Investig.* 2014; 18(2): 677-82.
57. Kwak SY, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC. MMP20 Proteolysis of native amelogenin regulates mineralization in vitro. *J Dent Res.* 2016; 95(13): 1511-7.
58. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 2000; 19 Suppl 1: S36-42.
59. Laisi S, Kiviranta H, Lukinmaa PL, Vartiainen T, Alaluusua S. Molar-incisor-hypomineralisation and dioxins: new findings. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2008; 9(4): 224-7.
60. Levine RS, Turner EP, Dobbing J. Deciduous teeth contain histories of developmental disturbances. *Early Hum Dev.* 1979; 3(2): 211-20.

61. Loli D, Costacurta M, Maturo P, Docimo R. Correlation between aerosol therapy in early childhood and Molar Incisor Hypomineralisation. *Eur J Paediatr Dent.* 2015; 16(1): 73-7.
62. 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.
63. Lygidakis NA, Wong F, Jalevik 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.
64. Martelossi Cebinelli GC, Paiva Trugilo K, Badaro Garcia S, Brajao de Oliveira K. TGF-beta1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw.* 2016; 27(4): 81-9.
65. Mathu-Muju K, Wright JT. Diagnosis and treatment of molar incisor hypomineralization. *Compend Contin Educ Dent.* 2006; 27(11): 604-10; quiz 11.
66. Mishra A, Pandey RK. Molar incisor hypomineralization: an epidemiological study with prevalence and etiological factors in indian pediatric population. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2016; 9(2): 167-71.
67. Monastero RN, Pentyala S. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. *Int J Inflam.* 2017; 2017: 4309485.
68. Moustakas A, Heldin CH. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008; 582(14): 2051-65.
69. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 2002; 109 Suppl: S121-31.
70. Oliver K, Messer LB, Manton DJ, Kan K, Ng F, Olsen C, et al. Distribution and severity of molar hypomineralisation: trial of a new severity index. *Int J Paediatr Dent.* 2014; 24(2): 131-51.
71. Opydo-Szymaczek J, Gerreth K. Developmental enamel defects of the permanent first molars and incisors and their association with dental caries in the region of Wielkopolska, Western Poland. *Oral Health Prev Dent.* 2015; 13(5): 461-9.
72. Paine ML, Zhu DH, Luo W, Bringas P, Jr., Goldberg M, White SN, et al. Enamel biomineralization defects result from alterations to amelogenin self-assembly. *J Struct Biol.* 2000; 132(3): 191-200.
73. Pinto LA, Steudemann L, Depner M, Klopp N, Illig T, Weiland SK, et al. STAT1 gene variations, IgE regulation and atopy. *Allergy.* 2007; 62(12): 1456-61.
74. Pispa J, Mustonen T, Mikkola ML, Kangas AT, Koppinen P, Lukinmaa PL, et al. Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Dev Dyn.* 2004; 231(2): 432-40.
75. Pitiphat W, Luangchaichaweng S, Pungchanchaikul P, Angwaravong O, Chansamak N. Factors associated with molar incisor hypomineralization in Thai children. *Eur J Oral Sci.* 2014; 122(4): 265-70.
76. Preusser SE, Ferring V, Wlekinski 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.

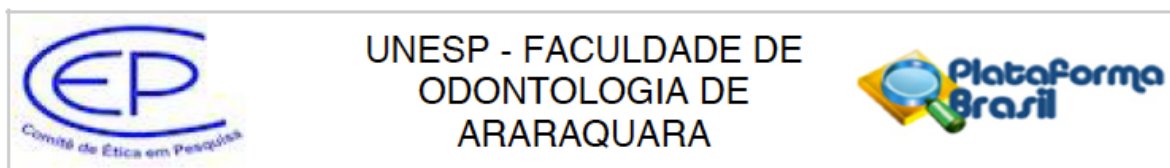
77. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(3): 559-75.
78. Rauth RJ, Potter KS, Ngan AY, Saad DM, Mehr R, Luong VQ, et al. Dental enamel: genes define biomechanics. *J Calif Dent Assoc.* 2009; 37(12): 863-8.
79. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 8): 1281-3.
80. 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.
81. Sassa Benedete AP, Sobral AP, Lima DM, Kamibeppu L, Soares FA, Lourenco SV. Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 in human developing teeth: immunolocalization according to the odontogenesis phases. *Pediatr Dev Pathol.* 2008; 11(3): 206-12.
82. Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipolito O, Jr., 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.
83. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J.* 1997; 47(3): 173-82.
84. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003; 113(6): 685-700.
85. Sidaly R, Landin MA, Suo Z, Snead ML, Lyngstadaas SP, Reseland JE. Hypoxia increases the expression of enamel genes and cytokines in an ameloblast-derived cell line. *Eur J Oral Sci.* 2015; 123(5): 335-40.
86. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar incisor hypomineralization - a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2016; 44(4): 342-53.
87. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3): 441-9.
88. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(2): 128-61.
89. Smith CE, Hu Y, Richardson AS, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. Relationships between protein and mineral during enamel development in normal and genetically altered mice. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 Suppl 1: 125-35.
90. Sonmez H, Yildirim G, Bezgin T. Putative factors associated with molar incisor hypomineralisation: an epidemiological study. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013; 14(6): 375-80.
91. 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.
92. Souza JF, Jeremias F, Costa-Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH) in Brazilian children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013; 14(4): 233-8.

93. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993; 52(3): 506-16.
94. Suckling GW. Developmental defects of enamel--historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Adv Dent Res.* 1989; 3(2): 87-94.
95. Suzuki M, Shin M, Simmer JP, Bartlett JD. Fluoride affects enamel protein content via TGF-beta1-mediated KLK4 inhibition. *J Dent Res.* 2014; 93(10): 1022-7.
96. Temilola OD, Folayan MO, Oyedele T. The prevalence and pattern of deciduous molar hypomineralization and molar-incisor hypomineralization in children from a suburban population in Nigeria. *BMC Oral Health.* 2015; 15: 73.
97. Tung K, Fujita H, Yamashita Y, Takagi Y. Effect of turpentine-induced fever during the enamel formation of rat incisor. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(6): 464-70.
98. Uhlen MM, Stenhagen KR, Dizak PM, Holme B, Mulic A, Tveit AB, et al. Genetic variation may explain why females are less susceptible to dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 2016; 124(5): 426-32.
99. van Amerongen WE, Kreulen CM. Cheese molars: a pilot study of the etiology of hypocalcifications in first permanent molars. *ASDC J Dent Child.* 1995; 62(4): 266-9.
100. Vieira AR, Bayram M, Seymen F, Sencak RC, Lippert F, Modesto A. In vitro acid-mediated initial dental enamel loss is associated with genetic variants previously linked to caries experience. *Front Physiol.* 2017; 8: 104.
101. Vieira AR, Kup E. On the etiology of molar-incisor hypomineralization. *Caries Res.* 2016; 50(2): 166-9.
102. Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med.* 2008; 10(9): 668-74.
103. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004; 83(9): 723-7.
104. Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.* 2006; 8(3): E515-20.
105. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update.* 2004; 31(1): 9-12.
106. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *Eur J Paediatr Dent.* 2003; 4(3): 110-3.
107. Weerheijm KL, Groen HJ, Beentjes VE, Poorterman JH. Prevalence of cheese molars in eleven-year-old Dutch children. *ASDC J Dent Child.* 2001; 68(4): 259-62.
108. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Res.* 2001; 35(5): 390-1.
109. Whatling R, Fearn JM. Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18(3): 155-62.
110. Wogelius P, Haubek D, Nechifor A, Norgaard M, Tvedebrink T, Poulsen S. Association between use of asthma drugs and prevalence of demarcated opacities in

permanent first molars in 6-to-8-year-old Danish children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010; 38(2): 145-51.

111. Wright JT, Hart TC, Hart PS, Simmons D, Suggs C, Daley B, et al. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189(1-4): 224-9.
112. Wuollet E, Laisi S, Salmela E, Ess A, Alaluusua S. Background factors of molar-incisor hypomineralization in a group of Finnish children. *Acta Odontol Scand.* 2014; 72(8): 963-9.
113. Xu LX, Kukita T, Yu H, Nakano Y, Koga T. Expression of the mRNA for types I and II interleukin-1 receptors in dental tissues of mice during tooth development. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63(4): 351-6.
114. Xu X, Jeong L, Han J, Ito Y, Bringas P, Jr., Chai Y. Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol.* 2003; 47(1): 31-9.
115. Yokozeiki M, Afanador E, Nishi M, Kaneko K, Shimokawa H, Yokote K, et al. Smad3 is required for enamel biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3): 684-90.
116. Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, et al. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1): 69-92.
117. Zhao H, Oka K, Bringas P, Kaartinen V, Chai Y. TGF-beta type I receptor Alk5 regulates tooth initiation and mandible patterning in a type II receptor-independent manner. *Dev Biol.* 2008; 320(1): 19-29.

ANEXO A - Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE DETERMINANTES GENÉTICOS E DEFEITOS DE ESMALTE DENTÁRIO

Pesquisador: Fabiano Jeremias

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 5

CAAE: 27584214.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.830.021

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda APROVADA em reunião de 22 de Novembro de 2016.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

APÊNDICE A – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL-4 (C/T) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	TT	14	6/3	NS
		CC		3/6	NS
		CT		5/1	NS
		TC		1/5	NS
	rs4970956	TG	17	5/3	NS
		CA		3/5	NS
		CG		8/1	0.04
		TA		1/8	0.04
	rs7526319	CT	22	12/3	0.03
		TC		3/12	0.03
		TT		5/2	NS
		CC		2/5	NS
	rs11204848	TT	17	3/7	NS
		CC		7/3	NS
		CT		5/2	NS
		TC		2/5	NS
KLK-4	rs198968	TG	13	6/5	NS
		CA		5/6	NS
		CG		2/0	NS
		TA		0/2	NS
	rs2235091	TC	19	2/7	NS
		CT		7/2	NS
		CC		4/6	NS
		TT		6/4	NS
FAM83H	rs12681370	CA	12	5/0	NS
		TG		0/5	NS
		CG		4/2	NS
		TA		2/4	NS
	rs7463064	TT	18	5/5	NS
		CC		5/5	NS
		CT		7/1	NS
		TC		1/7	NS
AMBN	rs4694075	TT	14	3/4	NS
		CC		4/3	NS
		TG		2/5	NS
		TC		5/2	NS
BMP-2	rs15705	CG	19	14/1	0.001
		TA		1/14	0.001
		TG		3/1	NS
		CA		1/3	NS
	rs235767	CT	16	7/1	NS
		TG		1/7	NS
		TT		3/5	NS
		CG		5/3	NS
BMP-7	rs230191	CC	12	6/2	NS
		TT		2/6	NS
		CT		4/1	NS
		TC		1/4	NS

	rs12479955	CG		1/2	NS
		TA	9	2/1	NS
		CA		3/3	NS
		TG		3/3	NS
BMP-4	rs17563	TC		4/3	NS
		CT	14	3/4	NS
		CC		5/2	NS
		TT		2/5	NS
	rs2071047	CT		6/2	NS
		TC	12	2/6	NS
		CC		3/1	NS
		TT		1/3	NS
ENAM	rs2609426	TG		3/3	NS
		CA	13	3/3	NS
		TA		3/4	NS
		CG		4/3	NS
MMP-20	rs1784410	TT		2/2	NS
		CG	14	2/2	NS
		TG		5/5	NS
		CT		5/5	NS
	rs1711441	CC		7/1	NS
		TA	18	1/7	NS
		TC		5/5	NS
		CA		5/5	NS
	rs1784441	TT		3/2	NS
		CC	10	2/3	NS
		CT		2/3	NS
		TC		3/2	NS
	rs1784440	CG		4/3	NS
		TA	13	3/4	NS
		CA		5/1	NS
		TG		1/5	NS
	rs1784423	TT		6/1	NS
		CC	28	1/6	NS
		TC		4/17	0.008
		CT		17/4	0.008
	rs1711422	CG		5/1	NS
		TA	18	1/5	NS
		TG		3/9	NS
		CA		9/3	NS
	rs2280211	TT		5/2	NS
		CC	13	2/5	NS
		CT		5/1	NS
		TC		1/5	NS
	rs1784438	CG		3/0	NS
		TA	8	0/3	NS
		CA		3/2	NS
		TG		2/3	NS
FGFR-2	rs1078806	CC	7	4/1	NS
		TT		1/4	NS

		TC		2/1	NS
		CT		1/2	NS
	rs2981427	CA		4/4	NS
		TG	14	4/4	NS
		TA		2/4	NS
		CG		4/2	NS
	rs4752566	TT		2/3	NS
		CG	10	3/2	NS
		TG		2/3	NS
		CT		3/2	NS
DLX3	rs3891034	TA		5/12	NS
		CG	23	12/5	NS
		CA		3/3	NS
		TG		3/3	NS
TGFB-1	rs11568785	CG		3/0	NS
		TA	8	0/3	NS
		CA		2/3	NS
		TG		3/2	NS
FGF-2	rs1048201	CT		4/0	NS
		TC	10	0/4	NS
		CC		4/2	NS
		TT		2/4	NS
SYN-2	rs6442307	CC		8/4	NS
		TA	20	4/8	NS
		CA		6/3	NS
		TC		3/6	NS
TGFB-1	rs4803455	CC		5/3	NS
		TA	14	3/5	NS
		TC		5/1	NS
		CA		1/5	NS
FGFR-1	rs6987534	CC		10/4	NS
		TG	18	4/10	NS
		CG		3/1	NS
		TC		1/3	NS
TIMP-2	rs2376999	CT		6/2	NS
		TC	13	2/6	NS
		TT		3/2	NS
		CC		2/3	NS
	rs7218729	CC		6/1	NS
		TG	9	1/6	NS
		TC		1/1	NS
		CG		1/1	NS
AMELX	rs5934996	TT		1/6	NS
		CA	14	6/1	NS
		CT		4/3	NS
		TA		3/4	NS
	rs946252	TA		6/4	NS
		CG	15	4/6	NS
		CA		4/1	NS
		TG		1/4	NS
	rs6654939	TT		7/5	NS
		CC	27	5/7	NS
		CT		14/2	0.006
		TC		2/14	0.006

AMTN	rs17878486	CC	11	2/2	NS
		TT		2/2	NS
		TC		3/4	NS
		CT		4/3	NS
	rs17149007	CC	12	5/2	NS
		TT		2/5	NS
		CT		3/2	NS
		TC		2/3	NS
	rs1351614	TG	17	5/4	NS
		CC		4/5	NS
		CG		8/1	0.04
		TC		1/8	0.04
	rs17676820	CC	13	7/3	NS
		TT		3/7	NS
		CT		3/0	NS
		TC		0/3	NS
DSPP	rs2615489	CG	15	7/1	NS
		TA		1/7	NS
		TG		5/2	NS
		CA		2/5	NS
	rs2615487	TT	16	2/2	NS
		CC		2/2	NS
		CT		8/3	NS
		TC		3/8	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE B – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL-6 (C/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	16	4/4	NS
		CC		4/4	NS
		CT		4/4	NS
		GC		4/4	NS
	rs4970956	GG	12	5/1	NS
		CA		1/5	NS
		CG		3/3	NS
		GA		3/3	NS
	rs7526319	GC	20	6/1	NS
		CT		1/6	NS
		CC		4/9	NS
		GT		9/4	NS
	rs11204848	GT	19	6/5	NS
		CC		5/6	NS
		GC		6/2	NS
		CT		2/6	NS
KLK-4	rs198968	CA	15	5/6	NS
		GG		6/5	NS
		GA		2/2	NS
		CG		2/2	NS
	rs2235091	GC	12	4/2	NS
		CT		2/4	NS
		GT		5/2	NS
		CC		2/5	NS
FAM83H	rs12681370	GG	12	5/3	NS
		CA		3/5	NS
		GA		2/2	NS
		CG		2/2	NS
	rs7463064	GT	15	3/4	NS
		CA		4/3	NS
		CG		4/4	NS
		GA		4/4	NS
AMBN	rs4694075	GT	18	4/6	NS
		CC		6/4	NS
		GC		6/2	NS
		CT		2/6	NS
BMP-2	rs15705	GG	20	10/3	NS
		CA		3/10	NS
		CG		6/1	NS
		GA		1/6	NS
	rs235767	GT	12	72/3	NS
		CG		3/2	NS
		GG		4/3	NS
		CT		3/4	NS
BMP-7	rs230191	GT	14	7/7	NS

		CC		7/7	NS
BMP-4	rs17563	GC	14	1/4	NS
		CT		4/1	NS
		GT		7/2	NS
		CC		2/7	NS
	rs2071047	GC	10	1/1	NS
		CT		1/1	NS
		GT		5/3	NS
		CC		3/5	NS
ENAM	rs7664896	GG	23	14/2	0.006
		CC		2/14	0.006
		CG		5/2	NS
		GC		2/5	NS
	rs2609426	GG	10	4/3	NS
		CA		3/4	NS
		GA		2/1	NS
		CG		1/2	NS
MMP-20	rs1784410	GT	14	3/4	NS
		CG		4/3	NS
		CT		4/3	NS
		GG		3/4	NS
	rs1711441	GC	20	8/4	NS
		CA		4/8	NS
		CC		5/3	NS
		GA		3/5	NS
	rs1784441	GC	10	2/4	NS
		CT		4/2	NS
		CC		2/2	NS
		GT		2/2	NS
	rs1784440	GG	15	5/5	NS
		CA		5/5	NS
		GA		3/2	NS
		CG		2/3	NS
	rs1784423	GT	22	11/3	NS
		CC		3/11	NS
		CT		44/4	NS
		GC		14/4	NS
	rs1711422	GG	19	7/3	NS
		CA		3/7	NS
		CG		3/6	NS
		GA		6/3	NS
	rs2280211	GT	18	9/3	NS
		CC		3/9	NS
		CT		3/3	NS
		GC		3/3	NS
	rs1784438	GG	12	3/3	NS
		CA		3/3	NS
		GA		3/3	NS
		CG		3/3	NS
FGFR-2	rs1078806	CC	12	3/4	NS
		GT		4/3	NS

		GC		4/1	NS
		CT		1/4	NS
	rs2981427	GA		5/3	NS
		CG	18	3/5	NS
		GG		6/4	NS
		CA		4/6	NS
	rs4752566	GG		3/5	NS
		CT	18	5/3	NS
		CG		3/7	NS
		GT		7/3	NS
DLX3	rs3891034	GG		6/6	NS
		CA	18	6/6	NS
		GA		4/2	NS
		CG		2/4	NS
TGFBR-1	rs11568785	GG		4/1	NS
		CA	9	1/4	NS
		CG		2/2	NS
		GA		2/2	NS
FGF-2	rs1048201	GT		7/5	NS
		CC	19	5/7	NS
		CT		4/3	NS
		GC		3/4	NS
SYN-2	rs6442307	GC		9/5	NS
		CA	24	5/9	NS
		GA		6/4	NS
		CC		4/6	NS
TGFB-1	rs4803455	GC		8/2	NS
		CA	16	2/8	NS
		GA		4/3	NS
		CC		3/4	NS
FGFR-1	rs6987534	GC		6/3	NS
		CG	21	3/6	NS
		CC		6/6	NS
		GG		6/6	NS
TIMP-2	rs2376999	GT		11/5	NS
		CC	20	5/11	NS
		GC		3/1	NS
		CT		1/3	NS
	rs7218729	GC		5/1	NS
		CG	13	1/5	NS
		CC		5/2	NS
		GG		2/5	NS
	rs5934996	GA		1/3	NS
		CT	12	3/1	NS
		CA		2/7	NS
		GT		7/2	NS
AMELX	rs946252	GA		5/4	NS
		CG	20	4/5	NS
		GG		2/9	NS
		CA		9/2	NS
	rs6654939	GT		13/4	0.05
		CC	26	4/13	0.05
		CT		7/3	NS
		GC		3/7	NS

AMTN	rs17878486	GC	12	3/2	NS
		CT		2/3	NS
		CC		2/5	NS
		GT		5/2	NS
	rs17149007	GT	13	5/7	NS
		CC		7/5	NS
		CT		2/0	NS
		GC		0/2	NS
	rs1351614	CG	15	4/1	NS
		GC		1/4	NS
		GG		8/2	NS
		CC		2/8	NS
	rs17676820	GT	15	2/4	NS
		CC		4/2	NS
		CT		2/7	NS
		GC		7/2	NS
DSPP	rs2615489	GA	15	4/1	NS
		CG		1/4	NS
		GG		8/2	NS
		CA		2/8	NS
	rs2615487	GC	16	5/3	NS
		CT		3/5	NS
		CC		4/4	NS
		GT		4/4	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE C – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL-8 (A/T) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	TT	14	2/2	NS
		AC		2/2	NS
		AT		3/7	NS
		TC		7/3	NS
	rs4970956	TG	15	3/1	NS
		AA		1/6	NS
		AG		3/5	NS
		TA		5/3	NS
	rs7526319	TC	21	5/3	NS
		AT		3/5	NS
		TT		10/3	NS
		AC		3/10	NS
	rs11204848	TT	14	2/4	NS
		AC		4/2	NS
		TC		6/2	NS
		AT		2/6	NS
KLK-4	rs198968	TA	14	5/1	NS
		AG		1/5	NS
		TG		6/2	NS
		AA		2/6	NS
	rs2235091	TC	14	4/4	NS
		AT		4/4	NS
		TT		3/3	NS
		AC		3/3	NS
FAM83H	rs12681370	TG	13	5/3	NS
		AA		3/5	NS
		AG		3/2	NS
		TA		2/3	NS
	rs7463064	TT	16	5/5	NS
		AC		5/5	NS
		TC		4/2	NS
		AT		2/4	NS
AMBN	rs4694075	TC	16	6/3	NS
		AT		3/6	NS
		AC		4/3	NS
		TT		3/4	NS
BMP-2	rs15705	TG	21	9/2	NS
		AA		2/9	NS
		AG		8/2	NS
		TA		2/8	NS
	rs235767	TG	10	4/2	NS
		AT		2/4	NS
		TT		1/3	NS
		AG		3/1	NS

BMP-7	rs230191	AT	11	4/0	NS
		TC		0/4	NS
		AC		4/5	NS
		TT		5/2	NS
	rs12479955	AG	10	3/1	NS
		TA		1/3	NS
		TG		5/1	NS
		AA		1/5	NS
BMP-4	rs17563	TC	17	3/5	NS
		AT		5/3	NS
		AC		4/5	NS
		TT		5/3	NS
	rs2071047	TC	15	5/5	NS
		AT		5/5	NS
		AC		1/4	NS
		TT		4/1	NS
ENAM	rs2609426	TG	17	1/7	NS
		AA		7/1	NS
		TA		7/2	NS
		AG		2/7	NS
MMP-20	rs1784410	TT	12	3/3	NS
		AG		3/3	NS
		AT		3/3	NS
		TG		3/3	NS
	rs1711441	TC	19	6/4	NS
		AA		4/6	NS
		AC		5/4	NS
		TA		4/5	NS
	rs1784441	AT	10	2/2	NS
		TC		2/2	NS
		AC		4/2	NS
		TT		2/4	NS
	rs1784440	TG	18	5/6	NS
		AA		6/5	NS
		AG		3/4	NS
		TA		4/3	NS
	rs1784423	AC	25	4/13	0.052
		TT		13/4	0.052
		TC		3/5	NS
		AT		5/3	NS
	rs1711422	TG	20	6/5	NS
		AA		5/6	NS
		TA		7/2	NS
		AG		2/7	NS
	rs2280211	TT	22	10/3	NS
		AC		3/10	NS
		AT		5/4	NS
		TC		4/5	NS
	rs1784438	AA	14	5/2	NS
		TG		2/5	NS
		TA		4/3	NS

		AG		3/4	NS
	rs1078806	AG		5/7	NS
		TA	12	7/5	NS
		AA		4/1	NS
		TG		1/4	NS
FGFR-2	rs2981427	AG		6/7	NS
		TA	23	7/6	NS
		AA		5/5	NS
		TG		5/5	NS
	rs4752566	TG		4/5	NS
		AT	19	5/4	NS
		TT		5/5	NS
		AG		5/5	NS
DLX3	rs3891034	TA		5/4	NS
		AG	20	4/5	NS
		AA		5/6	NS
		TG		6/5	NS
TGFBR-1	rs11568785	AG		1/1	NS
		TA	8	1/1	NS
		AA		1/5	NS
		TG		5/1	NS
FGF-2	rs1048201	AT		4/5	NS
		TC	16	5/4	NS
		AC		4/3	NS
		TT		3/4	NS
SYN-2	rs6442307	TA		9/2	NS
		AC	22	2/9	NS
		TC		5/6	NS
		AA		6/5	NS
TGFB-1	rs4803455	TA		2/4	NS
		AC	17	4/2	NS
		TC		8/3	NS
		AA		3/8	NS
FGFR-1	rs6987534	TG		6/4	NS
		AC	19	4/6	NS
		TC		6/3	NS
		AG		3/6	NS
TIMP-2	rs2376999	TC		10/3	NS
		AT	23	3/10	NS
		AC		3/7	NS
		TT		7/3	NS
	rs7218729	AG		3/2	NS
		TC	14	2/3	NS
		AC		5/4	NS
		TG		4/5	NS
	rs5934996	AT		3/1	NS
		TA	11	1/3	NS
		TT		4/3	NS
		AA		3/4	NS
AMELX	rs946252	TG		3/7	NS
		AA	18	7/3	NS
		TA		7/1	NS
		AG		1/7	NS
	rs6654939	TT	31	13/4	0.052

AMTN		AC		4/13	0.052
		AT		8/6	NS
		TC		6/8	NS
		rs17878486	AT	2/2	NS
	12	TC		2/2	NS
		AC		5/3	NS
		TT		3/5	NS
	rs17149007	AT		1/2	NS
		TC	12	2/1	NS
		TT		6/3	NS
		AC		3/6	NS
	rs1351614	AG		5/1	NS
		TC	12	1/5	NS
		TG		4/1	NS
		AC		1/4	NS
	rs17676820	TT		3/4	NS
		AC	16	4/3	NS
		AT		4/5	NS
		TC		5/4	NS
DSPP	rs2615489	TA		3/4	NS
		AG	16	4/3	NS
		TG		7/2	NS
		AA		2/7	NS
	rs2615487	TT		5/2	NS
		AC	12	2/5	NS
		TC		4/1	NS
		AT		1/4	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE D – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre TNF (A/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Trnasmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	7	2/0	NS
		AC		0/2	NS
		GC		3/1	NS
		AT		1/3	NS
	rs4970956	AG	10	2/3	NS
		GA		3/2	NS
		GG		4/1	NS
		AA		1/4	NS
	rs7526319	AC	11	3/6	NS
		GT		6/3	NS
		GC		1/1	NS
		AT		1/1	NS
	rs11204848	AT	8	3/1	NS
		GC		1/3	NS
		GT		3/1	NS
		AC		1/3	NS
KLK-4	rs198968	GG	9	4/1	NS
		AA		1/4	NS
		AG		2/2	NS
		GA		2/2	NS
	rs2235091	AC	8	2/1	NS
		GT		1/2	NS
		GC		3/2	NS
		AT		2/3	NS
FAM83H	rs7463064	AT	12	3/4	NS
		GC		4/3	NS
		AC		2/3	NS
		GT		3/2	NS
AMBN	rs4694075	GT	7	2/2	NS
		AC		2/2	NS
		GC		2/1	NS
		AT		1/2	NS
BMP-2	rs15705	AG	11	3/2	NS
		GA		2/3	NS
		AA		1/5	NS
		GG		5/1	NS
	rs235767	AT	12	3/2	NS
		GG		2/3	NS
		GT		6/1	NS
		AG		1/6	NS
BMP-7	rs230191	GT	11	5/3	NS
		AC		3/5	NS
		GC		2/1	NS
		AT		1/2	NS
BMP-4	rs17563	AC	12	3/3	NS

ENAM	rs2071047	GT		3/3	NS
		GC		5/1	NS
		AT		1/5	NS
		AC		2/2	NS
	rs2609426	GT	9	2/2	NS
		GC		4/1	NS
		AT		1/4	NS
		AA		1/3	NS
	rs1784410	GG	9	3/1	NS
		GA		4/1	NS
		AG		1/4	NS
		AG		3/4	NS
	rs1711441	GT	8	4/3	NS
		GG		1/0	NS
		AT		0/1	NS
		AC		3/4	NS
MMP-20	rs1711441	GA	12	4/3	NS
		AA		1/4	NS
		GC		4/1	NS
	rs1784441	AC		1/2	NS
		GT	5	2/1	NS
		AT		1/1	NS
		GC		1/1	NS
	rs1784440	AG		3/3	NS
		GA	8	3/3	NS
		GG		2/0	NS
		AA		0/2	NS
	rs1784423	AT		3/2	NS
		GC	13	2/3	NS
		AC		1/7	NS
		GT		7/1	NS
	rs1711422	AA		2/4	NS
		GG	10	4/2	NS
		GA		3/1	NS
		AG		1/3	NS
FGFR-2	rs2280211	AT		3/3	NS
		GC	12	3/3	NS
		GT		5/1	NS
		AC		1/5	NS
	rs1784438	AA		1/1	NS
		GG	5	1/1	NS
		AG		2/1	NS
		GA		1/2	NS
	rs1078806	AC		3/1	NS
		GT	5	1/3	NS
		GC		1/0	NS
		AT		0/1	NS
	rs2981427	GG		3/1	NS
		AA	9	1/3	NS
		AG		2/3	NS
		GA		3/2	NS

	rs4752566	AG		3/5	NS
		GT	10	5/3	NS
		GG		2/0	NS
		AT		0/2	NS
DLX-3	rs3891034	GA		1/0	NS
		AG	7	0/1	NS
		AA		1/5	NS
		GG		5/1	NS
FGF-2	rs1048201	GT		3/1	NS
		AC	7	1/3	NS
		GC		2/1	NS
		AT		1/2	NS
SYN-2	rs6442307	AA		2/3	NS
		GC	11	3/2	NS
		GA		5/1	NS
		AC		1/5	NS
TGFB-1	rs4803455	AA		2/4	NS
		GC	10	4/2	NS
		GA		3/1	NS
		AC		1/3	NS
FGFR-1	rs6987534	AG		1/5	NS
		GC	10	5/1	NS
		AC		3/1	NS
		GG		1/3	NS
TIMP-2	rs2376999	GT		3/2	NS
		AC	10	2/3	NS
		AT		2/3	NS
		GC		3/2	NS
	rs7218729	AC		1/2	NS
		GG	7	2/1	NS
		GC		2/2	NS
		AG		2/2	NS
	rs5934996	AT		1/1	NS
		GA	6	1/1	NS
		AA		3/1	NS
		GT		1/3	NS
AMELX	rs946252	AG		1/4	NS
		GA	7	4/1	NS
		AA		2/0	NS
		GG		0/2	NS
	rs6654939	AT		4/1	NS
		GC	12	1/4	NS
		AC		1/6	NS
		GT		6/1	NS
	rs17878486	GC		2/0	NS
		AT	5	0/2	NS
		GT		2/1	NS
		AC		1/2	NS
AMTN	rs17149007	AC		2/2	NS
		GT	7	2/2	NS
		GC		3/0	NS
		AT		0/3	NS

DSPP	rs1351614	AG	10	3/1	NS
		GC		1/3	NS
		AC		2/4	NS
		GG		4/2	NS
	rs17676820	GC	9	2/2	NS
		AT		2/2	NS
		GT		3/2	NS
		AC		2/3	NS
	rs2615489	GC	12	3/2	NS
		GA		2/3	NS
		GG		6/1	NS
		AA		1/6	NS
	rs2615487	AC	6	1/2	NS
		GT		2/1	NS
		AT		1/2	NS
		GC		2/1	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE E – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre TGFB1 (A/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	AT	10	3/3	NS
		GC		3/3	NS
		GT		2/2	NS
		AC		2/2	NS
	rs4970956	AG	11	3/1	NS
		GA		1/3	NS
		GG		6/1	NS
		AA		1/6	NS
	rs7526319	GC	18	5/7	NS
		AT		7/5	NS
		AC		3/3	NS
		GT		3/3	NS
	rs11204848	GT	14	3/3	NS
		AC		3/3	NS
		GC		6/2	NS
		AT		2/6	NS
KLK-4	rs198968	AA	11	3/4	NS
		GG		4/3	NS
		AG		3/1	NS
		GA		1/3	NS
	rs2235091	GT	14	4/4	NS
		AC		4/4	NS
		AT		4/2	NS
		GC		2/4	NS
FAM83H	rs12681370	GG	8	1/1	NS
		AA		1/1	NS
		GA		3/3	NS
		AG		3/3	NS
	rs7463064	GT	14	3/3	NS
		AC		3/3	NS
		GC		2/6	NS
		AT		6/2	NS
AMBN	rs4694075	AT	12	4/3	NS
		GC		3/4	NS
		AC		3/2	NS
		GT		2/3	NS
BMP-2	rs15705	GG	15	4/2	NS
		AA		2/4	NS
		AG		6/3	NS
		GA		3/6	NS
	rs235767	GT	10	2/2	NS
		AG		2/2	NS
		AT		3/3	NS
		GG		3/3	NS

BMP-7	rs230191	GT	12	4/3	NS
		AC		3/4	NS
		AT		3/2	NS
		GC		2/3	NS
	rs12479955	GG	6	3/1	NS
		AA		1/3	NS
		AG		2/0	NS
		GA		0/2	NS
BMP-4	rs17563	GC	12	3/2	NS
		AT		2/3	NS
		AC		3/4	NS
		GT		4/3	NS
	rs2071047	AC	11	4/2	NS
		GT		2/4	NS
		GC		2/3	NS
		AT		3/2	NS
ENAM	rs2609426	GA	7	3/3	NS
		AG		3/3	NS
		AA		1/0	NS
		GG		0/1	NS
MMP-20	rs1784410	GT	14	4/6	NS
		AG		6/4	NS
		GG		2/2	NS
		AT		2/2	NS
	rs1711441	GC	16	6/5	NS
		AA		5/6	NS
		AC		2/3	NS
		GA		3/2	NS
	rs1784441	AT	9	4/5	NS
		GC		5/4	NS
		AC		4/2	NS
		GT		2/4	NS
	rs1784440	GA	15	4/5	NS
		AG		5/4	NS
		AA		4/2	NS
		GG		2/4	NS
	rs1784423	GT	22	10/2	NS
		AC		2/10	NS
		AT		8/2	0.04
		GC		2/8	0.04
	rs1711422	AA	16	5/2	NS
		GG		2/5	NS
		AG		5/4	NS
		GA		4/5	NS
	rs2280211	GT	14	4/3	NS
		AC		3/4	NS
		AT		6/1	NS
		GC		1/6	NS
	rs1784438	GA	11	2/3	NS
		AG		3/2	NS
		GG		2/4	NS

		AA		4/2	NS
	rs1078806	AC		4/1	NS
		GT	10	1/4	NS
		GC		3/2	NS
		AT		2/3	NS
FGFR-2	rs2981427	AA		5/3	NS
		GG	16	3/5	NS
		AG		3/5	NS
		GA		5/3	NS
	rs4752566	GG		5/6	NS
		AT	15	6/5	NS
		GT		2/2	NS
		AG		2/2	NS
DLX3	rs3891034	GG		5/3	NS
		AA	13	3/5	NS
		AG		3/2	NS
		GA		2/3	NS
TGFBR-1	rs11568785	GG		3/2	NS
		AA	10	2/3	NS
		AG		3/2	NS
		GA		2/3	NS
FGF-2	rs1048201	GT		5/1	NS
		AC	14	1/5	NS
		AT		5/3	NS
		GC		3/5	NS
SYN-2	rs6442307	GC		3/2	NS
		AA	12	2/3	NS
		AC		3/4	NS
		GA		4/3	NS
TGFB-1	rs4803455	GC		9/3	NS
		AA	15	3/9	NS
		AC		2/1	NS
		GA		1/2	NS
FGFR-1	rs6987534	GG		4/6	NS
		AC	20	6/4	NS
		AG		4/6	NS
		GC		6/4	NS
TIMP-2	rs2376999	GT		4/1	NS
		AC	14	1/4	NS
		GC		3/6	NS
		AT		6/3	NS
	rs7218729	GC		7/3	NS
		AG	15	3/7	NS
		GG		2/3	NS
		AC		3/2	NS
	rs5934996	GA		5/7	NS
		AT	16	7/5	NS
		GT		1/3	NS
		AA		3/1	NS
AMELX	rs946252	GA		4/1	NS
		AG	11	1/4	NS
		GG		3/3	NS
		AA		3/3	NS
	rs6654939	GT	22	12/4	NS

		AC		4/12	NS
		GC		1/5	NS
		AT		5/1	NS
	rs17878486	AT		5/1	NS
		GC	11	1/5	NS
		AC		3/2	NS
		GT		2/3	NS
	rs17149007	GT		2/4	NS
		AC	11	4/2	NS
		GC		1/4	NS
		AT		4/1	NS
	rs1351614	AG		7/2	NS
AMTN		GC	14	2/7	NS
		AC		2/3	NS
		GG		3/2	NS
	rs17676820	GT		1/6	NS
		AC	16	6/1	NS
		GC		5/4	NS
		AT		4/5	NS
	rs2615489	GA		2/3	NS
		AG	14	3/2	NS
		GG		7/2	NS
		AA		2/7	NS
DSPP	rs2615487	GC		3/5	NS
		AT	12	5/3	NS
		GT		3/1	NS
		AC		1/3	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE F – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL17A (A/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	12	2/3	NS
		AC		3/2	NS
		GC		4/4	NS
		AT		4/4	NS
	rs4970956	GG	19	7/2	NS
		AA		2/7	NS
		GA		4/6	NS
		AG		6/4	NS
	rs7526319	AC	20	3/9	NS
		GT		9/3	NS
		AT		4/4	NS
		GC		4/4	NS
	rs11204848	AT	16	2/8	NS
		GC		8/2	NS
		AC		1/5	NS
		GT		5/1	NS
KLK-4	rs198968	GA	11	4/1	NS
		AG		1/4	NS
		GG		3/3	NS
		AA		3/3	NS
	rs2235091	AC	14	2/7	NS
		GT		7/2	NS
		AT		3/2	NS
		GC		2/3	NS
FAM83H	rs12681370	GG	14	5/3	NS
		AA		3/5	NS
		GA		5/1	NS
		AG		1/5	NS
	rs7463064	GT	17	4/2	NS
		AC		2/4	NS
		GC		6/5	NS
		AT		5/6	NS
AMBN	rs4694075	GT	16	4/5	NS
		AC		5/4	NS
		GC		6/1	NS
		AT		1/6	NS
BMP-2	rs15705	GG	16	6/1	NS
		AA		1/6	NS
		GA		3/6	NS
		AG		6/3	NS
	rs235767	GT	17	5/3	NS
		AG		3/5	NS
		GG		4/5	NS
		AT		5/3	NS
BMP-7	rs230191	GT	11	2/1	NS

		AC		1/2	NS
		AT		5/3	NS
		GC		3/5	NS
	rs12479955	GG		6/1	NS
		AA	12	1/6	NS
		AG		4/1	NS
		GA		1/4	NS
BMP-4	rs17563	GC		5/4	NS
		AT	15	4/5	NS
		GT		3/3	NS
		AC		3/3	NS
	rs2071047	AC		4/6	NS
		GT	18	6/4	NS
		AT		2/5	NS
		GC		5/2	NS
ENAM	rs2609426	GA		4/2	NS
		AG	13	2/4	NS
		GG		5/2	NS
		AA		2/5	NS
MMP-20	rs1784410	AT		2/4	NS
		GG	13	4/2	NS
		AG		1/6	NS
		GT		6/1	NS
	rs1711441	GC		11/1	NS
		AA	18	1/11	NS
		GA		3/3	0.009
		AC		3/3	0.009
	rs1784441	GT		1/2	NS
		AC	10	2/1	NS
		GC		4/3	NS
		AT		3/4	NS
	rs1784440	AG		2/7	NS
		GA	13	7/2	NS
		AA		2/2	NS
		GG		2/2	NS
	rs1784423	AT		8/2	NS
		GC	17	2/8	NS
		AC		1/7	NS
		GT		7/1	NS
	rs1711422	GG		5/1	NS
		AA	13	1/5	NS
		GA		4/3	NS
		AG		3/4	NS
	rs2280211	GT		8/2	NS
		AC	16	2/8	NS
		GC		1/5	NS
		AT		5/1	NS
	rs1784438	GG		4/1	NS
		AA	11	1/4	NS
		GA		1/5	NS
FGFR-2	rs1078806	GC	8	2/2	NS

		AT		2/2	NS
		GT		2/2	NS
		AC		2/2	NS
	rs2981427	AA		3/4	NS
		GG	12	4/3	NS
		GA		4/1	NS
		AG		1/4	NS
	rs4752566	GG		4/4	NS
		AT	14	4/4	NS
		GT		3/3	NS
		AG		3/3	NS
DLX-3	rs2278163	GC		3/2	NS
		AT	12	2/3	NS
		GT		5/2	NS
		AC		2/5	NS
FGF-2	rs1048201	GT		8/3	NS
		AC	18	3/8	NS
		GC		5/2	NS
		AT		2/5	NS
SYN-2	rs6442307	AA		1/5	NS
		GC	20	5/1	NS
		AC		3/11	NS
		GA		11/3	NS
TGFB-1	rs4803455	AA		2/8	NS
		GC	15	8/2	NS
		AC		3/2	NS
		GA		2/3	NS
FGFR-1	rs6987534	GG		7/1	NS
		AC	16	1/7	NS
		GC		6/2	NS
		AG		2/6	NS
TIMP-2	rs2376999	AC		4/3	NS
		GT	16	3/4	NS
		AT		5/4	NS
		GC		4/5	NS
	rs7218729	GC		7/2	NS
		AG	11	2/7	NS
		GG		0/2	NS
		AC		2/0	NS
	rs5934996	AT		3/3	NS
		GA	10	3/3	NS
		AA		2/2	NS
		GT		2/2	NS
AMELX	rs946252	AA		3/3	NS
		GG	13	3/3	NS
		AG		4/3	NS
		GA		3/4	NS
	rs6654939	AT		10/3	NS
		GC	27	3/10	NS
		AC		1/13	0.003
		GT		13/1	0.003
	rs17878486	AT		4/1	NS
		GC	8	1/4	NS
		AC		2/1	NS

		GT		1/2	NS
AMTN	rs17149007	AT	10	2/4	NS
		GC		4/2	NS
		AC		2/2	NS
		GT		2/2	NS
	rs1351614	GG	14	7/2	NS
		AC		2/7	NS
		GC		2/3	NS
		AG		3/2	NS
	rs17676820	GC	12	7/2	NS
		AT		2/7	NS
		GT		1/2	NS
		AC		2/1	NS
DSPP	rs2615489	GG	11	5/1	NS
		AA		1/5	NS
		GA		1/4	NS
		AG		4/1	NS
	rs2615487	AT	13	2/2	NS
		GC		2/2	NS
		AC		5/4	NS
		GT		4/5	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE G – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre TGBBR1 (G/A) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	16	6/2	NS
		AC		2/6	NS
		GC		1/7	NS
		AT		7/1	NS
	rs4970956	GG	12	4/2	NS
		AA		2/4	NS
		GA		2/4	NS
		AG		4/2	NS
	rs7526319	GC	26	6/9	NS
		AT		9/6	NS
		GT		5/6	NS
		AC		6/5	NS
	rs11204848	GT	15	6/3	NS
		AC		3/6	NS
		GC		5/1	NS
		AT		1/5	NS
KLK-4	rs198968	AA	13	3/1	NS
		GG		1/3	NS
		AG		6/3	NS
		GA		3/6	NS
	rs2235091	GT	13	6/5	NS
		AC		5/6	NS
		GC		1/1	NS
		AT		1/1	NS
FAM83H	rs12681370	GG	16	5/3	NS
		AA		3/5	NS
		GA		6/2	NS
		AG		2/6	NS
	rs7463064	AT	22	5/4	NS
		GC		4/5	NS
		AC		7/6	NS
		GT		6/7	NS
AMBN	rs4694075	GT	22	7/6	NS
		AC		6/7	NS
		GC		7/2	NS
		AT		2/7	NS
BMP-2	rs15705	GG	24	8/3	NS
		AA		3/8	NS
		GA		4/9	NS
		AG		9/4	NS
	rs235767	GT	17	2/7	NS
		AG		7/2	NS
		GG		5/3	NS
		AT		3/5	NS
BMP-7	rs230191	GT	19	3/2	NS
		AC		2/3	NS

		GC		7/7	NS
		AT		7/7	NS
	rs12479955	GG	16	6/1	NS
		AA		1/6	NS
		GA		3/6	NS
		AG		6/3	NS
BMP-4	rs17563	GC	20	5/6	NS
		AT		6/5	NS
		GT		6/3	NS
		AC		3/6	NS
	rs2071047	GT	18	7/2	NS
		AC		2/7	NS
		GC		5/4	NS
		AT		4/5	NS
ENAM	rs2609426	AG	15	8/4	NS
		GA		4/8	NS
		AA		2/1	NS
		GG		1/2	NS
MMP-20	rs1784410	GT	17	5/4	NS
		AG		4/5	NS
		GG		4/4	NS
		AT		4/4	NS
	rs1711441	GC	27	7/3	NS
		AA		3/7	NS
		GA		6/11	NS
		AC		11/6	NS
	rs1784441	GT	13	3/5	NS
		AC		5/3	NS
		GC		4/1	NS
		AT		1/4	NS
	rs1784440	GG	18	5/8	NS
		AA		8/5	NS
		GA		4/1	NS
		AG		1/4	NS
	rs1784423	GT	24	8/2	NS
		AC		2/8	NS
		GC		6/8	NS
		AT		8/6	NS
	rs1711422	GG	18	5/4	NS
		AA		4/5	NS
		GA		3/6	NS
		AG		6/3	NS
	rs2280211	GT	21	7/4	NS
		AC		4/7	NS
		GC		2/8	NS
		AT		8/2	NS
	rs1784438	GG	16	4/2	NS
		AA		2/4	NS
		GA		4/6	NS
		AG		6/4	NS
FGFR-2	rs1078806	AC	15	4/2	NS

FGFR-2		GT		2/4	NS
		AT		4/5	NS
		GC		5/4	NS
		GA		7/3	NS
	rs2981427	AG	18	3/7	NS
		GG		2/6	NS
		AA		6/2	NS
	rs4752566	GG		5/6	NS
		AT	25	6/5	NS
		GT		7/7	NS
		AG		7/7	NS
DLX3	rs3891034	GG		4/6	NS
		AA	22	6/4	NS
		GA		6/6	NS
		AG		6/6	NS
TGFB-1	rs11568785	GG		3/2	NS
		AA	14	2/3	NS
		GA		4/5	NS
		AG		5/4	NS
FGF-2	rs1048201	GT		5/6	NS
		AC	19	6/5	NS
		GC		5/3	NS
		AT		3/5	NS
SYN-2	rs6442307	GC		5/8	NS
		AA	28	8/5	NS
		GA		8/7	NS
		AC		7/8	NS
TGFB-1	rs4803455	GC		6/2	NS
		AA	20	2/6	NS
		GA		6/6	NS
		AC		6/6	NS
FGFR-1	rs6987534	GG		7/5	NS
		AC	21	5/7	NS
		GC		6/3	NS
		AG		3/6	NS
TIMP-2	rs2376999	GT		2/7	NS
		AC	22	7/2	NS
		GC		5/8	NS
		AT		8/5	NS
	rs7218729	GC		5/2	NS
		AG	16	2/5	NS
		GG		4/5	NS
		AC		5/4	NS
AMELX	rs5934996	GT		6/2	NS
		AA	15	2/6	NS
		GA		6/1	NS
		AT		1/6	NS
	rs946252	GG		3/5	NS
		AA	18	5/3	NS
		GA		8/2	NS
		AG		2/8	NS
	rs6654939	GT		9/2	NS
		AC	28	2/9	NS
		GC		6/11	NS
		AT		11/6	NS

AMTN	rs17878486	GT	12	4/1	NS
		AC		1/4	NS
		GC		4/3	NS
		AT		3/4	NS
	rs17149007	GT	14	3/5	NS
		AC		5/3	NS
		GC		2/4	NS
		AT		4/2	NS
	rs1351614	GG	15	8/2	NS
		AC		2/8	NS
		GC		1/4	NS
		AG		4/1	NS
	rs17676820	AT	21	2/5	NS
		GC		5/2	NS
		AC		8/6	NS
		GT		6/8	NS
DSPP	rs2615489	GG	23	9/3	NS
		AA		3/9	NS
		GA		3/8	NS
		AG		8/3	NS
	rs2615487	AT	18	6/2	NS
		GC		2/6	NS
		AC		6/4	NS
		GT		4/6	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE H – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL1B (G/A) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	8	6/2	NS
		AC		2/6	NS
	rs4970956	GG	15	7/2	NS
		AA		2/7	NS
		AG		5/1	NS
		GA		1/5	NS
	rs7526319	AC	17	3/5	NS
		GT		5/3	NS
		GC		4/5	NS
		AT		5/4	NS
	rs11204848	AT	16	6/4	NS
		GC		4/6	NS
KLK-4	rs198968	GT		6/1	NS
		GA		5/1	NS
		AG		1/5	NS
		AA		1/6	NS
	rs2235091	GG	15	5/3	NS
		AT		3/5	NS
		GT		6/1	NS
		AC		1/6	NS
FAM83H	rs12681370	GG	15	5/1	NS
		AA		1/5	NS
		AG		6/3	NS
		GA		3/6	NS
	rs7463064	AT	21	3/7	NS
		GC		7/3	NS
		AC		3/8	NS
		GT		8/3	NS
AMBN	rs4694075	GT	15	2/6	NS
		AT		6/2	NS
		GC		6/1	NS
		AC		1/6	NS
BMP-2	rs15705	AG	19	8/3	NS
		GA		3/8	NS
		GG		7/1	NS
		AA		1/7	NS
	rs235767	AT	16	6/3	NS
		GG		3/6	NS
		GT		5/2	NS
		AG		2/5	NS
BMP-7	rs230191	AT	14	2/4	NS
		GC		4/2	NS
		GT		6/2	NS
		AC		2/6	NS

	rs12479955	AG	10	4/2	NS
		GA		2/4	NS
		AA		1/3	NS
		GG		3/1	NS
BMP-4	rs17563	AC	20	5/4	NS
		GT		4/5	NS
		GC		6/5	NS
		AT		5/6	NS
	rs2071047	GC	16	4/3	NS
		AT		3/4	NS
		AC		4/5	NS
		GT		5/4	NS
ENAM	rs2609426	GG	13	4/1	NS
		AA		1/4	NS
		AG		3/5	NS
		GA		5/3	NS
MMP-20	rs1784410	GT	11	3/2	NS
		AG		2/3	NS
		AT		2/4	NS
		GG		4/2	NS
	rs1711441	AC	18	4/4	NS
		GA		4/4	NS
		GC		7/4	NS
		AA		4/7	NS
	rs1784441	GT	11	5/1	NS
		AC		1/5	NS
		AT		2/3	NS
		GC		3/2	NS
	rs1784440	GG	12	3/4	NS
		AA		4/3	NS
		GA		3/2	NS
		AG		2/3	NS
	rs1784423	GT	22	9/4	NS
		AC		4/9	NS
		AT		7/4	NS
		GC		4/7	NS
	rs1711422	GG	15	4/2	NS
		AA		2/4	NS
		GA		3/6	NS
		AG		6/3	NS
	rs2280211	GT	14	7/1	NS
		AC		1/7	NS
		AT		3/3	NS
		GC		3/3	NS
	rs1784438	AG	13	4/5	NS
		GA		5/4	NS
		GG		2/2	NS
		AA		2/2	NS
FGFR-2	rs1078806	GC	10	5/3	NS
		AT		3/5	NS
		AC		1/1	NS

		GT		1/1	NS
	rs2981427	GG		5/1	NS
		AA	16	1/5	NS
		AG		6/4	NS
		GA		4/6	NS
FGFR-2					
	rs4752566	AG		5/3	NS
		GT	17	3/5	NS
		GG		6/4	NS
		AT		4/6	NS
	rs3891034	GA		6/3	NS
DLX3		AG	16	3/6	NS
		GG		5/2	NS
		AA		2/5	NS
	rs11568785	GG		1/1	NS
TGFBR-1		AA	7	1/1	NS
		AG		4/1	NS
		GA		1/4	NS
	rs1048201	AT		4/3	NS
FGF-2		GC	14	3/4	NS
		GT		4/3	NS
		AC		3/4	NS
	rs6442307	AC		4/9	NS
SYN-2		GA	24	9/4	NS
		GC		9/2	NS
		AA		2/9	NS
	rs4803455	AC		5/5	NS
TGFB-1		GA	13	5/5	NS
		AA		1/2	NS
		GC		2/1	NS
	rs6987534	GG		8/2	NS
FGFR-1		AC	16	2/8	NS
		GC		3/3	NS
		AG		3/3	NS
	rs2376999	AT		3/4	NS
		GC	12	4/3	NS
TIMP-2		AC		2/3	NS
		GT		3/2	NS
	rs7218729	AC		5/4	NS
		GG	14	4/5	NS
		GC		4/1	NS
		AG		1/4	NS
	rs5934996	AA		3/2	NS
		GT	9	2/3	NS
		GA		2/2	NS
		AT		2/2	NS
	rs946252	AA		4/1	NS
		GG	15	1/4	NS
AMELX		GA		8/2	NS
		AG		2/8	NS
	rs6654939	AT		8/3	NS
		GC	21	3/8	NS
		GT		8/2	NS
		AC		2/8	NS
	rs17878486	GT	11	3/4	NS

		AC		4/3	NS
		GC		2/2	NS
		AT		2/2	NS
	rs17149007	AT		5/4	NS
		GC	15	4/5	NS
		GT		4/2	NS
		AC		2/4	NS
	rs1351614	GG		6/1	NS
AMTN		AC	13	1/6	NS
		AG		2/4	NS
		GC		4/2	NS
	rs17676820	AT		2/4	NS
		GC	14	4/2	NS
		GT		5/3	NS
		AC		3/5	NS
	rs2615489	AA		2/9	NS
		GG	16	9/2	NS
		GA		2/3	NS
		AG		3/2	NS
DSPP	rs2615487	AC		1/4	NS
		GT	12	4/1	NS
		AT		5/2	NS
		GC		2/5	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE I – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL10 (C/T) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	6	2/1	NS
		TC		1/2	NS
		GC		2/1	NS
		TT		1/2	NS
	rs4970956	GG	19	10/1	0.01
		TA		1/10	0.01
		GA		4/4	NS
		TG		4/4	NS
	rs7526319	GC	19	5/3	NS
		TT		3/5	NS
		GT		8/3	NS
		TC		3/8	NS
	rs11204848	GC	16	7/1	NS
		TT		1/7	NS
		GT		7/1	NS
		TC		1/7	NS
KLK-4	rs198968	GG	13	8/2	NS
		TA		2/8	NS
		GA		2/1	NS
		TG		1/2	NS
	rs2235091	GC	11	4/3	NS
		TT		1/4	NS
		GT		3/1	NS
		TC		1/3	NS
FAM83H	rs12681370	GG	17	3/3	NS
		TA		3/3	NS
		GA		9/2	NS
		TG		2/9	NS
	rs7463064	GT	15	3/4	NS
		CA		4/3	NS
		CG		4/4	NS
		GA		4/4	NS
AMBN	rs4694075	GC	16	7/1	NS
		TT		1/7	NS
		GT		6/2	NS
		TC		2/6	NS
BMP-2	rs15705	GG	22	11/1	0.009
		TA		1/11	0.009
		GA		6/4	NS
		TG		4/6	NS
	rs235767	GT	17	7/2	NS
		TG		2/7	NS
		GG		5/3	NS
		TT		3/5	NS
BMP-7	rs230191	TT	13	3/4	NS
		GC		4/3	NS

	rs12479955	GT	14	5/1	NS
		TC		1/5	NS
		GG		8/2	NS
		TA		2/8	NS
BMP-4	rs17563	TG	17	3/1	NS
		GA		1/3	NS
		GC		5/1	NS
		TT		1/5	NS
	rs2071047	GT	21	9/2	NS
		TC		2/9	NS
		GC		10/3	NS
		TT		3/10	NS
ENAM	rs2609426	GT	19	7/1	NS
		TC		1/7	NS
		GA		8/5	NS
		TG		5/8	NS
MMP-20	rs1784410	TA	17	3/3	NS
		GG		3/3	NS
		GT		7/2	NS
		TG		2/7	NS
	rs1711441	GG	19	6/2	NS
		TT		2/6	NS
		GA		6/5	NS
		TC		5/6	NS
	rs1784441	TA	14	1/7	NS
		GC		7/1	NS
		GC		7/1	NS
		TT		1/7	NS
	rs1784440	GT	14	4/2	NS
		TC		2/4	NS
		GA		8/2	NS
		TG		2/8	NS
	rs1784423	TA	17	3/1	NS
		GG		1/3	NS
		GT		10/2	0.04
		TC		2/10	0.04
	rs1711422	GC	16	4/1	NS
		TT		1/4	NS
		GA		5/3	NS
		TG		3/5	NS
	rs2280211	GG	16	7/1	NS
		TA		1/7	NS
		GT		7/1	NS
		TC		1/7	NS
	rs1784438	TT	13	2/6	NS
		GC		6/2	NS
		GA		4/2	NS
		TG		2/4	NS
FGFR-2	rs1078806	TA	10	2/5	NS
	GG	5/2		NS	

		TT		1/6	NS
		TC		2/1	NS
		GT		1/2	NS
	rs2981427	GA		12/4	NS
		TG	20	4/12	NS
		GG		3/1	NS
		TA		1/3	NS
	rs4752566	GT		6/3	NS
		TG	15	3/6	NS
		GG		5/1	NS
		TT		1/5	NS
DLX3	rs3891034	GG		8/2	NS
		TA	24	2/8	NS
		GA		10/4	NS
		TG		4/10	NS
TGFB-1	rs11568785	GG		3/1	NS
		TA	9	1/3	NS
		GA		3/2	NS
		TG		2/3	NS
FGF-2	rs1048201	GT		5/2	NS
		TC	14	2/5	NS
		GC		5/2	NS
		TT		2/5	NS
SYN-2	rs6442307	GC		7/2	NS
		TA	20	2/7	NS
		GA		9/2	NS
		TC		2/9	NS
TGFB-1	rs4803455	GC		6/1	NS
		TA	13	1/6	NS
		TC		3/3	NS
		GT		3/3	NS
FGFR-1	rs6987534	GG		7/1	NS
		TC	18	1/7	NS
		GC		8/2	NS
		TG		2/8	NS
TIMP-2	rs2376999	TT		3/5	NS
		GC	16	5/3	NS
		GT		7/1	NS
		TC		1/7	NS
	rs7218729	GC		5/1	NS
		TG	14	1/5	NS
		TC		2/6	NS
		GG		6/2	NS
	rs5934996	GT		3/1	NS
		TA	10	1/3	NS
		TT		2/4	NS
		GA		4/2	NS
AMELX	rs946252	TA		2/4	NS
		GG	13	4/2	NS
		GA		6/1	NS
		TG		1/6	NS
	rs6654939	GT		11/1	0.009
		TC	26	1/11	0.009
		GC		8/6	NS
		TT		6/8	NS

AMTN	rs17878486	GC	8	3/1	NS
		TT		1/3	NS
		GT		3/1	NS
		TC		1/3	NS
	rs17149007	GT	13	3/2	NS
		TC		2/3	NS
		GC		6/2	NS
		TT		2/6	NS
	rs1351614	GG	17	7/1	NS
		TC		1/7	NS
		GC		5/4	NS
		TG		4/5	NS
	rs17676820	GC	16	9/3	NS
		TT		3/9	NS
		TC		2/2	NS
		GT		2/2	NS
DSPP	rs2615489	TG	21	4/7	NS
		GA		7/4	NS
		GG		8/2	NS
		TA		2/8	NS
	rs2615487	GT	17	7/3	NS
		TC		3/7	NS
		TT		4/3	NS
		GC		3/4	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE J – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre IL1A (A/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/ Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	GT	8	4/3	NS
		AC		3/4	NS
		GC		0/1	NS
		AT		1/0	NS
	rs4970956	GG	16	10/1	0.01
		AA		1/10	0.01
		GA		2/3	NS
		AG		3/2	NS
	rs7526319	AC	16	3/7	NS
		GT		7/3	NS
		GC		3/3	NS
		AT		3/3	NS
	rs11204848	AT	16	3/5	NS
		GC		5/3	NS
		GT		7/1	NS
		AC		1/7	NS
KLK-4	rs198968	GG	13	6/1	NS
		AA		1/6	NS
		GA		3/3	NS
		AG		3/3	NS
	rs2235091	AC	11	1/3	NS
		GT		3/1	NS
		GC		3/4	NS
		AT		4/3	NS
FAM83H	rs12681370	GG	12	4/2	NS
		AA		2/4	NS
		GA		5/1	NS
		AG		1/5	NS
	rs7463064	AT	15	2/7	NS
		GC		7/2	NS
		GT		4/2	NS
		AC		2/4	NS
AMBN	rs4694075	GT	16	4/5	NS
		AC		5/4	NS
		GC		6/1	NS
		AT		1/6	NS
BMP-2	rs15705	AG	18	6/3	NS
		GA		3/6	NS
		GG		7/2	NS
		AA		2/7	NS
	rs235767	AT	15	3/2	NS
		GG		2/3	NS
		GT		7/3	NS
		AG		3/7	NS

BMP-7	rs230191	AT	15	2/1	NS
		GC		1/2	NS
		GT		9/3	NS
		AC		3/9	NS
	rs12479955	GA	8	1/2	NS
		AG		2/1	NS
		AA		1/4	NS
		GG		4/1	NS
BMP-4	rs17563	GT	17	4/3	NS
		AC		3/4	NS
		GC		6/4	NS
		AT		4/3	NS
	rs2071047	GC	14	3/2	NS
		AT		2/3	NS
		GT		6/3	NS
		AC		3/6	NS
ENAM	rs2609426	GG	15	6/1	NS
		AA		1/6	NS
		GA		4/4	NS
		AG		4/4	NS
MMP-20	rs1784410	GT	16	5/4	NS
		AG		4/5	NS
		GG		5/2	NS
		AT		2/5	NS
	rs1711441	AC	17	4/2	NS
		GA		2/4	NS
		GC		8/3	NS
		AA		3/8	NS
	rs1784441	GT	12	5/1	NS
		AC		1/5	NS
		GC		5/1	NS
		AT		1/5	NS
	rs1784440	GG	14	3/4	NS
		AA		4/3	NS
		GA		5/2	NS
		AG		2/5	NS
	rs1784423	GT	22	7/2	NS
		AC		2/7	NS
		GC		5/8	NS
		AT		8/5	NS
	rs1711422	GG	15	6/2	NS
		AA		2/6	NS
		AG		4/3	NS
		GA		3/4	NS
	rs2280211	GT	14	8/2	NS
		AC		2/8	NS
		GC		2/2	NS
		AT		2/2	NS
	rs1784438	AG	12	5/2	NS
		GA		2/5	NS
		GG		4/1	NS

		AA		1/4	NS
FGFR-2	rs1078806	GC	9	6/2	NS
		AT		2/6	NS
		AC		1/0	NS
		GT		0/1	NS
FGFR-2	rs2981427	GG	18	6/2	NS
		AA		2/6	NS
		GA		6/4	NS
		AG		4/6	NS
	rs4752566	AG	13	4/3	NS
		GT		3/4	NS
		GG		5/1	NS
		AT		1/5	NS
DLX-3	rs3891034	GA	18	6/3	NS
		AG		3/6	NS
		GG		7/2	NS
		AA		2/7	NS
FGF-2	rs1048201	AT	12	2/2	NS
		GC		2/2	NS
		GT		4/4	NS
		AC		4/4	NS
SYN-2	rs6442307	AC	21	5/6	NS
		GA		6/5	NS
		GC		7/3	NS
		AA		3/7	NS
TGFB-1	rs4803455	AC	15	4/5	NS
		GA		5/4	NS
		AA		2/4	NS
		GC		4/2	NS
FGFR-1	rs6987534	GG	18	9/4	NS
		AC		4/9	NS
		AG		5/1	NS
		GC		1/5	NS
TIMP-2	rs2376999	AT	12	2/5	NS
		GC		5/2	NS
		GT		4/1	NS
		AC		1/4	NS
	rs7218729	AC	14	6/6	NS
		GG		6/6	NS
		GC		2/0	NS
		AG		0/2	NS
AMELX	rs5934996	AA	9	4/4	NS
		GT		4/4	NS
		AT		1/0	NS
		GA		0/1	NS
	rs946252	AA	13	4/1	NS
		GG		1/4	NS
		GA		7/1	NS
		AG		1/7	NS
	rs6654939	AT	26	8/3	NS
		GC		3/8	NS
		GT		12/3	0.03
		AC		3/12	0.03

AMTN	rs17878486	GT	9	3/3	NS
		AC		3/3	NS
		AT		1/2	NS
		GC		2/1	NS
	rs17149007	AT	11	4/2	NS
		GC		2/4	NS
		GT		3/2	NS
		AC		2/3	NS
	rs1351614	GG	13	6/1	NS
		AC		1/6	NS
		GC		2/4	NS
		AG		4/2	NS
	rs17676820	AT	14	2/4	NS
		GC		4/2	NS
		GT		4/4	NS
		AC		4/4	NS
DSPP	rs2615489	AA	16	2/8	NS
		GG		8/2	NS
		GA		3/3	NS
		AG		3/3	NS
	rs2615487	AC	12	3/4	NS
		GT		4/3	NS
		GC		1/4	NS
		AT		4/1	NS

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE K – Interação gene-gene entre os marcadores da resposta imune e amelogênese.

Interação gene-gene entre STAT (T/G) e os marcadores relacionados a genes da amelogênese.					
Gene	SNP	Alelos	Famílias Informativas	Transmitido/Não Transmitido	p
TUFT-1	rs3790506	TT	14	4/3	NS
		GC		3/4	NS
		TC		2/5	NS
		GT		5/2	NS
	rs4970956	GG	20	7/2	NS
		TA		2/7	NS
		GA		3/8	NS
		TG		8/3	NS
	rs7526319	GC	25	6/5	NS
		TT		5/6	NS
		GT		9/5	NS
		TC		5/9	NS
	rs11204848	GT	21	6/7	NS
		TC		7/6	NS
		GC		9/5	NS
		TT		5/9	NS
KLK-4	rs198968	GG	14	5/2	NS
		TA		2/5	NS
		GA		5/2	NS
		TG		2/5	NS
	rs2235091	GT	21	5/2	NS
		TC		2/5	NS
		GC		7/6	NS
		TT		6/7	NS
FAM83H	rs12681370	GG	17	3/3	NS
		TA		3/3	NS
		GA		5/6	NS
		TG		6/5	NS
	rs7463064	TT	18	4/5	NS
		GC		5/4	NS
		TC		7/2	NS
		GT		2/7	NS
AMBN	rs4694075	TT	17	2/3	NS
		GC		3/2	NS
		TC		6/6	NS
		GT		6/6	NS
BMP-2	rs15705	GG	28	10/4	NS
		TA		4/10	NS
		GA		3/11	NS
		TG		11/3	NS
	rs235767	TT	12	2/2	NS
		GG		2/2	NS
		GT		3/5	NS
		TG		5/3	NS
	rs10055464	GG	11	6/1	NS

BMP-7	rs230191	TA		1/6	NS
		GA		1/3	NS
		TG		3/1	NS
		GT	17	6/4	NS
		TC		4/6	NS
		GC		5/2	NS
		TT		2/5	NS
	rs12479955	GG	13	5/2	NS
		TA		2/5	NS
		GA		2/4	NS
		TG		4/2	NS
BMP-4	rs17563	TC	15	5/3	NS
		GT		3/5	NS
		TT		4/3	NS
		GC		3/4	NS
	rs2071047	GC	17	6/5	NS
		TT		5/6	NS
		GT		3/3	NS
		TC		3/3	NS
ENAM	rs2609426	TA	19	9/3	NS
		GG		3/9	NS
		TG		1/6	NS
		GA		6/1	NS
MMP-20	rs1784410	GT	15	5/7	NS
		TG		7/5	NS
		GG		1/3	NS
		TT		3/1	NS
	rs1711441	TC	25	9/5	NS
		GA		5/9	NS
		TA		4/7	NS
		GC		7/4	NS
	rs1784441	TT	18	3/5	NS
		GC		5/3	NS
		TC		8/2	NS
		GT		2/8	NS
	rs1784440	GG	19	2/8	NS
		TA		8/2	NS
		GA		3/6	NS
		TG		6/3	NS
	rs1784423	GT	25	10/6	NS
		TC		6/10	NS
		GC		1/8	0.04
		TT		8/1	0.04
	rs1711422	GG	20	4/4	NS
		TA		4/4	NS
		GA		4/8	NS
		TG		8/4	NS
	rs2280211	GT	21	8/3	NS
		TC		3/8	NS
		GC		3/7	NS
		TT		7/3	NS

	rs1784438	TG		5/2	NS
		GA	14	2/5	NS
		TA		3/4	NS
		GG		4/3	NS
	rs1078806	TC		5/6	NS
		GT	16	6/5	NS
		TT		1/4	NS
		GC		4/1	NS
	rs2981427	GA		5/7	NS
FGFR-2		TG	26	7/5	NS
		GG		4/10	NS
		TA		10/4	NS
	rs4752566	GG		3/10	NS
		TT	25	10/3	NS
		GT		5/7	NS
		TG		7/5	NS
	rs3891034	GG		4/6	NS
DLX3		TA	22	6/4	NS
		GA		6/6	NS
		TG		6/6	NS
	rs11568785	GG		3/2	NS
TGFR-1		TA	11	2/3	NS
		GA		4/2	NS
		TG		2/4	NS
	rs1048201	GT		3/7	NS
FGF-2		TC	22	7/3	NS
		GC		3/9	NS
		TT		9/3	NS
	rs6442307	GC		9/12	NS
SYN-2		TA	28	12/9	NS
		GA		4/3	NS
		TC		3/4	NS
	rs4803455	GA		3/6	NS
TGFB-1		TC	16	6/3	NS
		GC		4/3	NS
		TA		3/4	NS
	rs6987534	GG		3/8	NS
FGFR-1		TC	20	8/3	NS
		GC		3/6	NS
		TG		6/3	NS
	rs2376999	GC		1/6	NS
		TT	19	6/1	NS
TIMP-2		GT		5/7	NS
		TC		7/5	NS
	rs7218729	TC		5/3	NS
		GG	17	3/5	NS
		TG		3/6	NS
		GC		6/3	NS
	rs5934996	TT		5/2	NS
		GA	19	2/5	NS
		TA		6/6	NS
		GT		6/6	NS
AMELX	rs946252	GA		8/5	NS
		TG	23	5/8	NS
		GG		3/7	NS
		TA		7/3	NS

AMTN	rs6654939	GT	27	13/2	0.009
		TC		2/13	0.009
		GC		3/10	NS
		TT		10/3	NS
	rs17878486	TT	15	5/3	NS
		GC		3/5	NS
		TC		4/3	NS
		GT		3/4	NS
	rs17149007	TT	12	2/3	NS
		GC		3/2	NS
		TC		4/3	NS
		GT		3/4	NS
	rs1351614	TC	17	3/7	NS
		GG		7/3	NS
		TG		5/2	NS
		GC		2/5	NS
	rs17676820	TC	19	9/3	NS
		GT		3/9	NS
		TT		1/6	NS
		GC		6/1	NS
DSPP	rs2615489	GG	20	8/2	NS
		TA		2/8	NS
		GA		3/7	NS
		TG		7/3	NS
	rs2615487	TC	16	5/4	NS
		GT		4/5	NS
		TT		4/3	NS
		GC		3/4	NS

Fonte: Elaboração própria

Autorizo a publicação deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 01 de agosto de 2017

DIEGO GIROTTTO BUSSANELI