

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**FATORES AMBIENTAIS E VARIAÇÕES GENÉTICAS NOS GENES *AMBN*,
ENAM, *KLK4*, *IRF6*, *TFG α* EM INDIVÍDUOS COM HIPOMINERALIZAÇÃO
MOLAR INCISIVO**

Fernanda Mafei Felix da Silva

Rio de Janeiro
2020

Fernanda Mafei Felix da Silva

**FATORES AMBIENTAIS E VARIAÇÕES GENÉTICAS NOS GENES *AMBN*,
ENAM, *KLK4*, *IRF6*, *TFG α* EM INDIVÍDUOS COM HIPOMINERALIZAÇÃO
MOLAR INCISIVO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadores:

Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa

Prof. Associado da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ), Brasil

Prof^a.Dr^a Flávia Martinez de Carvalho

Prof^a.Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênitas do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fio Cruz), Brasil

Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Prof. Departamento de Biologia e Medicina Oral da Universidade de Pittsburgh, EUA

Ficha Catalográfica

Silva, Fernanda Mafei Felix da.

Fatores ambientais e variações genéticas nos genes AMBN, ENAM, KLK4, IRF6, TFG α em pacientes com hipomineralização molar incisivo. / Fernanda Mafei Felix da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, 2020.

109 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Marcelo de Castro Costa, Flávia Martinez de Carvalho e Alexandre Rezende Vieira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2020.

Referências: f. 93-97.

1. Esmalte Dentário. 2. Anormalidades Dentárias- genética. 3. Hipoplasia do Esmalte Dentário-etilogia. 4. Dente Molar. 5. Odontopediatria. - Tese. I. Costa, Marcelo de Castro. II. Carvalho, Flávia Martinez de. III. Vieira, Alexandre Rezende. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe de Referência da Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA
Departamento de
Odontopediatria
e Ortodontia



FOLHA DE APROVAÇÃO

DA SILVA, FERNANDA MAFEI FELIX

**“FATORES AMBIENTAIS E VARIAÇÕES GENÉTICAS NOS GENES *AMNB*,
ENAM, *KLK4*, *IRF6*, *TFGA* NA HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR INCISIVO
EM UMA AMOSTRA NO RIO DE JANEIRO”**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 11 de março de 2020.

Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa
DO- Prof. Associado II do Dep^{to} de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

Profa. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo
DO-Prof. Associado do Dep^{to} de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro
DO-Prof. Adjunto do Dep^{to} de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

Profa. Dra. Luise Gomes da Motta
DO-Prof. Titular FO-UFF

Profa. Dra. Verônica Marques Zembrzusi
DO-Prof. Adjunto da UFRGS

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Marco,

Eu poderia ficar por horas e horas falando sobre tudo o que eu sinto por você. Falando como o seu abraço é o melhor de todos, sobre como me sinto protegida estando em seus braços, sobre como são divertidas as nossas tardes. Poderia dizer sobre o som da sua voz quando você liga para perguntar do meu dia. Poderia passar o ano inteiro falando de cada qualidade sua. Mas hoje eu quero apenas te dizer o quanto eu te amo, o quanto sou grata por ter você em minha vida! Obrigada por ser meu porto seguro. Sua eterna Batatinha!!

À minha mãe amada Benedita,

Obrigada, por me fazer acreditar que tudo é possível. Você sempre esteve ao meu lado dando amor e carinho. Tudo que sou hoje representa o seu empenho, o seu suor, a sua força e principalmente o seu amor. Amo você sem limite, sem condição!

Obrigada por tudo!

À minha pequena Julia,

Alguns dizem que é sorte, outros que é coisa do destino. Eu prefiro dizer que é luz. Quando você chegou, foi isso que você trouxe pra mim, luz e amor. Uma luz e um amor que destino nenhum ou sorte nenhuma seriam capazes de explicar. Obrigada minha filha por esse amor incondicional. Te amo!!!

Ao meu marido Diogo,

Seu amor e apoio me incentivaram a fazer tudo que planejei nesses últimos anos e durante todo o percurso me apoiou com seus pensamentos otimistas, perseverantes e cautelosos. Obrigada por tudo! “Se o céu for você, se você for pra mim, entrego tudo a Deus, eu digo que sim”

Te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por ter concedido a oportunidade de realizar este Doutorado e me capacitado durante toda a trajetória da minha vida.

Aos meus irmãos Marco e Patrícia, por estarem presente na minha vida lado a lado. Sou grata por todas as risadas, por todos os dias de choro, por ouvirem as minhas aflições pessoais, enfim por serem tão maravilhosos comigo. Amo vocês!

À minha mãe de coração Cátia Regina, pelo carinho, amizade, paciência e amor.

Aos meus orientadores,

Professor Marcelo de Castro Costa, por acreditar na pesquisa e por ter acreditado em mim. Agradeço o cuidado especial em todas as orientações, o carinho e as oportunidades que recebi durante toda essa caminhada acadêmica. Muito obrigada!

Professora Flávia Martinez de Carvalho, por ter acompanhado a realização deste trabalho de forma tão atenciosa e cuidadosa. Estava sempre disponível a me ajudar, tranquilizando-me nos momentos difíceis e tirando minhas dúvidas. A vida não poderia ter me dado uma orientadora melhor. Passou a ser para mim um exemplo de pessoa e profissional. Obrigada por ser tão generosa comigo!

Professor Alexandre Rezende Vieira, por toda a dedicação, inspiração e pelas sábias orientações. Um exemplo profissional e de pessoa. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Às minhas amigas, Marcela, Aline, Maysa e Thais por todos os momentos vividos nesses anos. As lembranças que levarei comigo farão parte da minha história. Cada uma, à sua maneira contribuiu para essa caminhada ser especial. Obrigada pela amizade e o carinho. Amo vocês!

À minha linda cunhada Fabiane, por todo apoio e carinho durante essa trajetória, por cuidar da minha filha, nos momentos que precisei, com amor, carinho e paciência, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Muito obrigada!

À minha prima Daniele, por todo apoio, conversas, carinho e atenção durante toda a minha vida. Obrigada por sempre me apoiar nos momentos difíceis e deixar meus dias mais tranquilos. Te amo!

Aos meus professores Rogerio Gleiser, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Luciana Pomarico, Lucianne Cople Maia, Andréa Fonseca-Gonçalves, Aline Neves e Matheus Pithon, por todo conhecimento transmitido durante o percurso. Vocês são referência de excelentes profissionais para mim.

A professora Laura Guimarães Primo, pelas orientações de excelência na clínica e seminários. Muito obrigada por me mostrar como ser uma profissional de excelência.

A professora Gloria Fernanda de Castro, que tenho uma grande admiração como mulher e profissional. Obrigada pelas sábias orientações, dicas e conselhos sobre a parte acadêmica e de vida.

Aos odontólogos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria (FO/UFRJ) Thomaz Chianca, Claudia Tavares, Vanessa Moraes e Andrea Pintor, pelas orientações, apoio e transmissão do conhecimento. Muito obrigada!

A todos os pacientes que contribuíram para a minha formação, aos responsáveis desses pacientes pela credibilidade confiada. Muito obrigado!

A todos os funcionários da Disciplina de Odontopediatria (FO/UFRJ) João Carlos Monteiro, Robson, Luiza, Rose, Isabel, Mere, Andréa e Kátia Seixas, pela atenção, carinho e por toda ajuda nessa caminhada.

A professora Ieda do Departamento de Malformação Congênita da UFRJ, pelo apoio, confiança e disponibilidade do laboratório para elaboração do trabalho. Muito obrigada.

A equipe de professores, funcionários e alunos do Laboratório de Malformação Congênita da UFRJ, em especial à técnica Maura e à aluna Ana Luiza pelo apoio, carinho e a ajuda para conclusão do trabalho. Sou muito grata por tudo.

A equipe do laboratório do Departamento de Biologia e Medicina Oral da Universidade de Pittsburgh, em especial à Mariana e Rosani, por todo o carinho, disponibilidade e apoio para conclusão do trabalho. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, por terem, na fase de qualificação, contribuído com suas observações para o aprimoramento deste trabalho e por aceitarem com gentileza fazer parte da avaliação final da Tese.

À minha amiga Andrea, por estar comigo durante toda a minha caminhada acadêmica. Obrigada por me guiar durante o processo com seus pensamentos positivos, otimistas, pelas risadas, carinho e por me trazer de volta nos momentos de insanidade. Te amo infinito dupla!

Às minhas amadas amigas Barbara, Gabriela, Cintia, Andréa e Julia, pelos momentos maravilhosos juntos e pelas ótimas conversas. Por todo o carinho e amizade. Amo vocês.

À minha amiga Marina Rocha, pelos momentos maravilhosos juntos. Por toda ajuda, carinho e amizade. Muito obrigada!

A todos os amigos do Mestrado e Doutorado, pessoas especiais com quem pude vivenciar muitos momentos inovadores.

RESUMO

Da Silva Felix Mafei Fernanda. Fatores ambientais e variações genéticas nos genes *AMBN*, *ENAM*, *KLK4*, *IRF6*, *TGF α* em indivíduos com Hipomineralização Molar Incisivo. Rio de Janeiro 2020. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

Trata-se de uma tese composta por quatro estudos, com o objetivo de avaliar possíveis fatores etiológicos (ambientais e genéticos) associados a presença de Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) através de (a) : um estudo observacional transversal para verificar a prevalência de HMI na amostra estudada, junto com uma revisão bibliográfica da prevalência desta condição na população brasileira (objetivo-I); associação de fatores ambientais (durante o período gestacional e nos primeiros anos de vida) relacionados à presença de HMI e a influência destes fatores com a gravidade dessa condição (objetivo-II); associação dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) localizados nos genes *ameloblastina* (*AMBN*), *enamelina* (*ENAM*) e *calecreína* com HMI, além da possível susceptibilidade dos SNPs com à cárie dentária (objetivo-III) e a interação entre fatores ambientais e as variações genéticas nos SNPs localizados nos genes *fator 6 regulador de interferon* (*IRF6*) e *fator de crescimento transformador alfa* (*TGF α*) estudados em amostras no Rio de Janeiro, Curitiba e turca (Istambul) (objetivo-IV). As coletas de dados do presente estudo foram realizadas em duas etapas: clínica e laboratorial. Os resultados encontrados foram: (I) uma alta heterogeneidade entre os estudos ($Q = 52,81$, $p < 0,01$, $I^2 = 98$) com a prevalência final de HMI de 13.48% na população brasileira; (II) as intercorrências na gestação e o uso de medicamentos na primeira infância tiveram uma associação significativa com a presença de HMI ($OR = 3,01$; 95% $CI = 1,74- 8,42$; $p = 0,014$; $OR = 3,55$; 95% $CI = 1,35-10,57$; $p = 0,019$), entretanto esses fatores não influenciaram a gravidade dessa condição ($p > 0,05$); (III) houve um resultado significativo no SNP rs2235091 localizado no gene *KLK4* com a HMI ($p < 0,001$), e os polimorfismos rs4694075 (*AMBN*) e rs3796704 (*ENAM*) mostraram associação com a cárie dentária ($p < 0,05$); (IV) a amostra do Rio de Janeiro apresentou uma interação entre os SNPs rs1523305 (*TGF α*) e rs642961 (*IRF6*) ($p = 0,03$) e entre rs2073487 (*IRF6*) e rs2902345 (*TGF α*) ($p = 0,04$). Além disso, no estudo de Istambul houve uma associação entre o SNP rs930655 (*TGF α*) com todos os marcadores do gene *IRF6* ($p < 0,05$). Em relação ao uso de medicamentos nos primeiros anos de vida houve uma associação com os genes *TGF α* e *IRF6* nas amostras de Curitiba e do Rio de Janeiro ($p < 0,05$). Conclui-se que; (I) a prevalência de HMI é de 13.48% na população brasileira; (II) existe uma relação entre a presença de HMI com complicações que ocorrem durante a gestação (uso de medicamentos) e nos primeiros anos de vida da criança, entretanto esse fatores não influenciaram na gravidade dessa condição; (III) os genes que atuam na formação do esmalte são capazes de influenciar tanto no desenvolvimento da HMI como podem estar associados à cárie dentária e (IV) os polimorfismos localizados nos genes *IRF6* e *TGF α* estão relacionados com o desenvolvimento da HMI. Além disso, o uso de medicamentos nos primeiros anos de vida podem potencializar o desenvolvimento da HMI.

Palavras Chaves: Esmalte dentário, Etiologia, Epidemiologia, Anomalias dentárias, Gene

ABSTRACT

Da Silva Felix Mafei Fernanda. Fatores ambientais e variações genéticas nos genes *AMBN*, *ENAM*, *KLK4*, *IRF6*, *TGF α* em indivíduos com Hipomineralização Molar Incisivo. Rio de Janeiro 2020. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

It is a thesis composed of four studies, with the main to evaluate possible etiological factors (environmental and genetic variation) associated with the presence of MIH in the Brazilian population through (e); (objective-I); a cross-sectional observational study, with a bibliographic review of the prevalence of MIH in Brazil (objective-I); to determine of environmental factors (during in the pregany period and childhood) associated with the presence of MIH, and to evaluate the influence of these factors with the MIH severity (objective-II); associations of single nucleotide polymorphism (SNPs) presentin the genes *ameloblastin (AMBN)*, *enamelin (ENAM)* and *kalekrein (KLK-4)* with MIH, in addition to the possible susceptibility of this genes to dental caries (objective-III); and interaction of environmetal factors and to determine the influence of genes *interferon regulatory factor 6 (IRF6)* and *transforming growth factor alpha (TGF α)* with MIH in a Brazilian (Rio de Janeiro e Curitiba) and Turkish (Istanbul) population (objective-IV). Data collections of the present study were carried out in two stages: clinical and laboratory. The results found were: (I) a high heterogeneity among the studies ($Q = 52.81$, $p < 0.01$, $I^2 = 98$) with a final prevalence of 13.48% na Brazilian population; (II) an association between interurrences during pregnancy and child taking medications with the presence of MIH (OR = 3.55; 95% C.I = 1.35-10.57, $p = 0.014$; OR = 3.01; 95% C.I = 1.74- 8.42, $p = 0.019$, respectively), however these factors did not influence the severity of MIH ($p > 0.05$); (III) there was an association between the variant alleles of polymorphisms rs2235091 in the *KLK4* gene ($p \leq 0.01$) with the presence of MIH and the SNPs rs4694075 in *AMBN* and rs3796704 in *ENAM* presents association with dental caries ($p < 0.05$); (IV) that the study from Rio de Janeiro showed a statistical evidence of interaction between *TGF α* rs1523305 and *IRF6* rs642961 ($p = 0.03$) and between genes *IRF6* rs2073487 and *TGF α* rs2902345 ($p = 0.04$). Significant results were found for the study from Istanbul between *TGF α* rs930655 and all *IRF6* markers ($p < 0.05$). Also, there was found statistical evidence for interaction of the SNPs in *IRF6* and *TGF α* genes and medication taking from Curitiba and Rio de Janeiro studies ($p < 0.05$). In summary; (I) the prevalence of MIH is 13.48% in the Brazilian population; (II) there is a relationship between complication that occur during pregnancy and in the child's first years of life with the presence of MIH, however these factors do not influence the severity of this condition; (III) the genes that acting in the enamel formation may influence the development of MIH and them, may be associated with dental caries; (IV) the polymorphisms located in the *IRF6* and *TGF α* genes play a role in the development of MIH in different populations and that these genes may interacting with the medication taken in the first years of life, pontecialising the presence of MIH.

Keywords: Enamel defects; Etiology; Epidemiology, Tooth anomalies, Gene.

RESUMEN

Da Silva Felix Mafei Fernanda. Factores ambientais e variações genéticas nos genes *AMBN*, *ENAM*, *KLK4*, *IRF6*, *TGF α* em indivíduos com Hipomineralização Molar Incisivo. Rio de Janeiro 2020. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

Es una tesis compuesta por cuatro estudios, evaluar posibles factores etiológicos (ambientales y genéticos) asociados con la presencia de HMI en la población brasileña a través de (e): un estudio observacional, junto con una revisión bibliográfica de la prevalencia de HIM em no Brasil (objetivo-I); interacción de los factores ambientales asociados con la presencia de HIM y la influencia de estos factores con el grado de severidad de HIM (objetivo II); asociación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), ubicados en los genes *ameloblastina* (*AMBN*), *enamelin* (*ENAM*) y calcitreína con HIM, además de la posible susceptibilidad de estos SNPs a la caries dental (objetivo III) y la interacción entre los factores ambientales y la influencia los genes factor regulador del interferón (*IRF6*) y factor transformante de crecimiento alfa (*TGF α*) con el desarrollo de HIM n una población brasileña (Rio de Janeiro e Curitiba) y turca (Estanbul) (objetivo IV). As coletas de dados do presente estudo foram actuaciones em duas etapas: clínica e laboratorial. Los resultados encontrados fueron: (I) una alta heterogeneidad entre los estudios ($Q = 52,81$, $p < 0,01$, $I^2 = 98$) con una prevalencia final de 13,48%; (II) los factores ambientales; como complicaciones durante el embarazo y el uso de medicamentos en la primera infancia tuvieron una asociación estadísticamente significativa con el HIM ($OR = 3,01$; $IC\ 95\% = 1,74- 8, 42$; $p = 0,014$; $OR = 3,55$; $IC\ 95\% = 1,35-10,57$; $p = 0,019$), estos factores no influyeron en el grado de severidad de la condición ($p > 0,05$); (III); hubo una asociación en los SNP rs2235091 ubicados en el gen *KLK4* ($p \leq 0,01$) con HIM, además, los SNP rs4694075 en el gen *AMBN* y rs 3796704 em el gen *ENAM* mostraron una asociación con la presencia de caries ($p < 0,05$); y (IV) la muestra de Río de Janeiro mostró evidencia estadística de interacción entre *TGFA* rs1523305 e *IRF6* rs642961 ($p = 0,03$) y entre *IRF6* rs2073487 y *TGF α* rs2902345 ($p = 0,04$) y los resultados encontrados en el estudio de Istanbul entre *TGF α* rs930655 y todos los marcadores *IRF6* fueron estadísticamente positivos ($p < 0,05$). Resulta que; (I) la prevalencia de HMI es del 13,48% en la población brasileña; (II) existe una relación entre la presencia de HMI con las complicaciones que ocurren durante el embarazo y en los primeros años de vida del niño, sin embargo, estos factores no influyen en la gravedad de esta afección; (III) los genes que actúan en la formación del esmalte son capaces de influir tanto en el desarrollo de HMI y pueden estar asociados con la caries dental y ; (IV) los polimorfismos ubicados en los genes *IRF6* y *TGF α* juegan un papel en el desarrollo de HMI en diferentes poblaciones. Además, estos genes pueden interactuar con factores ambientales como el uso de drogas en los primeros años de vida, lo que aumenta el riesgo de desarrollar HMI.

Palabras clave: Esmalte dental, Etiología, Epidemiología, Anomalías dentarias, Gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma.....	25
Figura 2. Imagem da Hipomineralização Molar Incisivo no primeiro molar permanente e nos incisivos centrais superiores permanentes. Opacidade demarcada sem perda de estrutura classificada no grau leve. Imagem realizada na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ.....	27
Figura 3. Imagem da Hipominerlização Molar Incisivo nos primeiros molares permanentes. Opacidade demarcada com perda de estrutura classificada no grau grave. Imagem realizada na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ.....	27

ARTIGO 1

Figure 1. Plot of MIH of prevalence with a new result.....	41
Figure 2. Plot of prevalence MIH.....	41

ARTIGO 2

Figure 1: A) Incisors with mild degree of MIH; B) First permanent molar presenting opacity without loss of structure; C) First permanent molar with opacity and loss of structure. Image made from Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro.....	54
--	----

ARTIGO 4

Figure 1. Expression of Irf6 and Tgfa in sagittal sections of E16.5 wild type murine embryos. Irf6 is expressed in ameloblasts (AM) but not odontoblasts (Raposo et al. 2019), whereas Tgfa expression was not detected.....	89
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA

Tabela 1. Características dos genes e polimorfismos incluídos no estudo.....	23
--	----

ARTIGO 1

Table 1. Characteristics of the articles (MIH study location, and prevalence, and diagnostic criteria).....	39
Table 2. Characteristics of the MIH group	40

ARTIGO 2

Table 1. Interaction between environments facts and Molar Incisor Hypomineralization (MIH).....	52
Table 2. Relationship between MIH severity and environmental factors	53

ARTIGO 3

Table 1. Genetic polymorphism characteristics in this study	65
Table 2. Caries experience genotype and Allele frequency.....	66
Table 3. Genotype and Allele frequency comparisons related to caries experience in MIH group.....	67
Table 4. Genotype and Allele frequency in the groups MIH/without MIH.....	68
Table 5. Summary of the Allelic association with MIH.....	69

ARTIGO 4

Table 1. Breakdown of populations used in the study.....	85
Table 2. Characteristics of the selected variants and genotypic results.....	86
Table 3. Summary results of gene-gene interaction analysis between TGFA rs930655 and the other IRF6 markers in the samples from Istanbul	87
Table 4. Summary of gene-environment interaction results considering medications (taken after three years of age).and its association with MIH phenotype in the cohort from Curitiba (Federal University of Paraná) and Rio de Janeiro (Universidade Federal).....	88

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

<i>AMELX</i>	<i>Amelogenina/Amelogenin</i>
<i>AMTA</i>	<i>Minomethyltransferase</i>
<i>AMBN</i>	<i>Ameloblastina/Ameloblastin</i>
BBO	Biblioteca Brasileira Odontologia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CPO-D	Índice de dentes cariados, perdidos e obturados
DDE	Defeito no Esmalte Dentário
DMFT	Decayed, Missed, Filled, Teeth Index
EAPD	European Academy of Paediatric Dentistry
<i>ENAM</i>	<i>Enamelina/Enamelin</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro
FO	Faculdade de Odontologia
HMI	Hipomineralização Molar Incisvo
<i>IRF6</i>	<i>Interferon regulatory factor 6</i>
<i>KLK4</i>	<i>Calecreína /Kallikrin</i>
LILACS	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
Medline	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
MeSH	Medical Subject Headings
MIH	Molar Incisor Hypomineralizaion
<i>MMP20</i>	<i>Matrix metalloproteinase</i>
PubMed	PubMed Unique Identifier
<i>TGFα</i>	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TCLE	Termos de Consentimento Livre e Esclarecido
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
SNPs	Polimorfismo de um único nucleotídeo/Single nucleotide polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SIMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
=	Igual
χ^2	Qui-quadrado
I^2	I-quadrado
OR	Teste Razão de Chance/Odds Ratio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. DELINEAMENTO DA PESQUISA	24
3.1 Tipo de estudos	24
3.2 Considerações Éticas	24
3.3 População e local dos estudos	24
3.3 Delineamento Metodológico	26
3.3.1 Primeiro estudo.....	26
3.3.2 Segundo estudo.....	28
3.3.3 Terceiro Estudo.....	28
3.3.4 Quarto Estudo	32
4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	36
4.1 Artigo 1: Defining the Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization in Brazil	37
4.2 Artigo 2: Influence of environmental factors on the presence and severity of molar incisor hypomineralization	44
4.3 Artigo 3: Association between genetic polymorphisms in genes acting in the amelogenesis with Molar Incisor Hypomineralization and caries experience	55
4.4 Artigo 4: Medication Gene Interaction in Molar Incisor Hypomineralization.....	70
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
6. CONCLUSÃO.....	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8. ANEXOS.....	98
9. APÊNDICES.....	102

1. INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é o tecido mais mineralizado do corpo humano e a sua formação (amelogênese) se divide em três importantes fases: formação da matriz, na qual as proteínas (amelogenina, ameloblastina e enamelinina) estão atuando; calcificação, na qual o mineral é depositado e a maior parte das proteínas são removidas; e maturação, cujo esmalte dentário sofre o processo de mineralização (ALALUUSUA et al., 2010). Estas fases são reguladas e controladas pelos ameloblastos, células altamente sensíveis e formadas por genes que codificam proteínas essenciais para o seu desenvolvimento (PARK et al., 2007).

Até o presente momento, sabe-se que a presença de qualquer influência de origem genética e/ou ambiental (ALALUUSUA et al., 2010; JEREMIAS et al., 2016; FATTURI et al., 2019), durante os estágios de formação do esmalte dentário, podem resultar em alterações permanentes na sua estrutura, uma vez que, o esmalte não sofre mais nenhum processo de remodelação após completamente formado (SEOW,1997; VIEIRA et al., 2008). Um exemplo dessas alterações é a Hipomineralização Molar Incisivo (HMI), classificada como um defeito qualitativo dos tecidos dentários (WEERHEIJM et al., 2003).

O primeiro relato da HMI foi no final dos anos 70 (KOCH et al., 1987). Porém, somente em 2001 o termo “Hipomineralização Molar Incisivo” foi definido com o objetivo de unificar as denominações das hipomineralizações idiopáticas não fluoróticas em primeiros molares permanentes (WEERHEIJM et al., 2001). A HMI é caracterizada como uma alteração ligada à dentição permanente, afetando os primeiros molares podendo ou não estar associada aos incisivos (WEERHEIJM, 2004; JÄLEVIK et al., 2010). Entretanto, recentemente foi relatada uma associação desta alteração com caninos permanentes e segundo molares decíduos (ELFRINK et al., 2012; SCHMALFUSS et al., 2016). Em relação a prevalência, é observada uma variação entre 2,4% a 40% em diversos países (WOGELIUS et al., 2003; JÄLEVIK et al., 2010; SCHMALFUSS et al., 2016). Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil apontam frequências semelhantes variando entre 2,5% e 40% (SOVEIRO et al., 2009; DA COSTA-SILVA et al., 2010; HANAN et al., 2015), sendo a região sudeste com o maior índice da população afetada (SOVEIRO et al., 2009; DA COSTA- SILVA et al., 2010; TOURINO et al., 2016).

Clinicamente, o dente afetado apresenta opacidades com a coloração variando do branco/opaco ao amarelo/castanho (JÄLEVIK et al., 2010). Em relação à gravidade, a HMI

pode ser classificada em leve (opacidade intacta) e grave (opacidade com perdas estruturais ou presença de restaurações e/ou necessidade de tratamento) (LYGIDAKIS et al., 2010). Outra característica desta condição é a alta porosidade dos dentes envolvidos favorecendo possíveis fraturas durante a mastigação, contribuindo para a sensibilidade dentária e o desenvolvimento da cárie (ALALUUSUA et al., 2010; OZGÜL et al., 2013). Devido às possíveis consequências, os pacientes com referido diagnóstico requerem consultas periódicas frequentes com objetivo de um melhor controle de sua condição bucal.

A etiologia da HMI ainda é muito controversa na literatura. Uma variedade de fatores ambientais como: uso de medicamentos na gravidez, complicações nutricionais na infância, infecções graves e o grande consumo de medicamentos nos primeiros anos de vida estão associados (LAISI et al., 2009; WHATLING et al., 2008). Porém, nenhum destes fatores isoladamente apresentam uma associação robusta com a etiologia desta condição (CROMBIE et al., 2009; ALALUUSUA, 2010; SILVA et al., 2016).

Recentemente, estudos relataram a associação entre a HMI e variações nos polimorfismos localizados nos genes envolvidos nas fases da amelogênese (*ENAM*, *AMBN*, *KLK4*, *MMP20*, *AMTN*, *AMELX*) (GUTIERREZ et al., 2012; JEREMIAS et al., 2013; BUSSANELI et al., 2019). Dentre esses pode-se destacar: a *ameloblastina* (*AMBN*) que está localizada no cromossomo 4 (4q21) com um papel fundamental na mineralização do esmalte (WRIGHT et al., 2009), a *enamelin* (*ENAM*) localizada no cromossomo 4 (4q13.3) responsável pela organização da estrutura do esmalte (FUKAE et al., 1993). Outro gene que pode ser citado é o gene *calecreína* (*KLK4*) que atua na fase de maturação do esmalte com a função de fragmentação das proteínas da matriz do esmalte e está localizado no cromossomo 19 (19q13.4).

Um fator que vem chamando a atenção, é a possível associação entre a HMI com genes que atuam na formação craniofacial. Existem relatos na literatura que diferentes fenótipos podem estar presentes no mesmo indivíduo (BEZAMAT et al., 2019). As condições como a fissura labiopalatina mostram prevalência aumentada de anomalias dentárias principalmente em relação à forma, ao tamanho e ao número (LETRA et al., 2007; WALLER et al., 2009). Foi identificada, recentemente, a presença de HMI em pacientes com fissura labiopalatina (ALLAM et al., 2018), o que leva a acreditar que algumas associações genéticas para HMI podem ser identificadas, quando estudadas com outras alterações bucais (KORUYUCU et al., 2018). Os genes Fator 6 regulador de interferon (*IRF6*), localizado no cromossomo 1 (1q32.2) e o *fator de crescimento transformador alfa*

(*TGF α*) presente no cromossomo 2 (2q13.3) são fundamentais para o desenvolvimento das estruturas na cavidade bucal e craniofaciais (LETRA et al., 2007). As variações nos polimorfismos destes genes estão relacionadas às fendas orais e à agenesia dentária, o que leva a supor possíveis associações com outras anomalias relacionadas com a cavidade bucal.

Estudos genéticos são fundamentais para o avanço no conhecimento sobre a etiologia de determinadas doenças. Um método bastante usado é o estudo de associação, utilizando-se o polimorfismo como marcador para localização de genes candidatos a doenças. O polimorfismo genético é a existência de diferentes alelos de um gene em uma população humana como resultado de mutações no DNA com uma frequência esperada na população de pelo menos 1% (SCHORK et al., 2000). Vários polimorfismos são encontrados no genoma humano devido a variantes decorrentes de deleções, inserções, substituição ou duplicações de um par de bases a centenas ou milhares de pares de bases de DNA.

O tipo mais frequente de polimorfismo é o de um único nucleotídeo (SNP). O SNP é uma forma variante de um par de bases da sequência de DNA que pode estar presente nos indivíduos de uma população dentro de um espectro considerado biologicamente normal, podendo ocorrer tanto em regiões codificantes (éxons) como em regiões não codificantes (íntrons, não traduzidas/região promotora 5' e 3') ou ainda em regiões intergênicas sem função conhecida. Muitos SNPs que ocorrem nos genes não têm efeito na proteína codificada, enquanto um grande número de SNPs tem efeitos biológicos importantes no produto genético (SCHORK et al., 2000).

Os SNPs são fundamentais em pesquisa sobre genética humana. Após a genotipagem de uma população, para um ou para vários polimorfismos, é possível calcular as frequências alélicas e genotípicas e observar a diferença dessas frequências entre os indivíduos afetados e controles (indivíduos não afetados). Sendo assim, os SNPs têm sido utilizados como marcadores para localizar genes candidatos a defeitos no esmalte e alterações bucais (VIEIRA et al., 2008; JEREMIAS et al., 2016).

Possíveis fatores etiológicos para HMI têm sido investigados utilizando-se diferentes abordagens. As melhores evidências são derivadas de estudos genéticos de associações entre SNPs em genes que atuam na formação do esmalte dentário. Entretanto não podemos deixar de relatar a contribuição dos fatores ambientais. Entende-se que a HMI pode ser classificada como uma condição multifatorial ou complexa, influenciada tanto por genes candidatos, quanto por fatores ambientais. É fundamental um maior entendimento dos fatores etiológicos para Hipomineralização Molar Incisivo, principalmente em diferentes populações, uma vez

que a expressão dos genes é diferente em cada indivíduo. O conhecimento dos fatores risco que influenciam, são fundamentais para o controle e prevenção de doenças.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de alguns fatores ambientais presentes durante o período gestacional e na primeira infância e verificar as associações genéticas localizadas nos genes (*AMBN*, *ENAM*, *KLK4*, *IRF6* e *TGF α*) com a HMI.

2.2 Objetivos específicos

Estudo 1

- Verificar a prevalência de HMI em indivíduos em atendimento na clínica da Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, junto com uma revisão bibliográfica na população brasileira.

Estudo 2

- Avaliar a influência entre fatores ambientais, tais como uso de medicamentos, infecções graves e complicações sistêmicas durante a gestação e nos primeiros anos de vida, com a presença de HMI, bem como avaliar a associação desses fatores com a gravidade dessa condição.

Estudo 3

- Verificar a associação dos polimorfismos localizados nos genes *AMBN* (rs4694075), *ENAM* (rs3796704), *KLK4* (rs2235091) com HMI;
- Investigar a relação entre polimorfismos citados nos genes *AMBN*, *ENAM* e *KLK4* com a experiência de cárie nos indivíduos com HMI.

Estudo 4

- Verificar a associação entre os SNPs (rs2073487, rs2013162, rs17015215, rs861019 e rs642961) localizados nos genes *IRF6* e os SNPs (rs292354, rs1523305, rs2166975, rs930655) no *TGF α* com a presença de HMI; e a interação entre fatores ambientais e as variações genéticas nesses SNPs estudados em duas amostras brasileiras (Rio de Janeiro e Curitiba) e uma turca (Istambul).

Tabela 1 Características dos genes e polimorfismos incluídos no estudo.

Genes	Atuação	Localização Cromossomo	Polimorfismos (SNPs) Seleccionados	Troca de bases	Região (SNPs)	Referências
<i>Ameloblastina (AMBN)</i>	Atuação na formação da matriz do esmalte e na mineralização do esmalte. Associado com Amelogênese Imperfeita e defeitos no esmalte.	4q21	rs4694075	C>T	Intron	JEREMIAS et al., 2016
<i>Enamelina (ENAM)</i>	Atuação na formação da matriz do esmalte (fase inicial da formação do esmalte). Associado com Amelogênese Imperfeita.	4q13.3	rs3796704 rs7664896	G>A C>G	Intron 3'UTR	JEDEON et al., 2013
<i>Callikreina (KLK-4)</i>	Atua na fase de mineralização do esmalte dentário. Variações nesse gene podem gerar alterações de cor (amarelo/castanho) e alterações na mineralização. Associado com Amelogenese Imperfeita Hipomaturada.	19q13.3/q13.4	rs2235091	A>G	Intron	JEDEON et al., 2013
<i>Fator regulador interfron 6 (IRF6)</i>	Atua no desenvolvimento das estruturas craniofaciais (lábio e palato). Variações nos polimorfismos desse gene têm como consequências fissuras labiopalatais e agenesia dentária.	1q32.2	rs2013162	A>C	Exon	VIEIRA, 2006 LETRA et al., 2007
			rs17015215	C>T	Exon	
			rs861019	A>G	5'UTR	
			rs642961	A>G	Intergênica	
			rs2073487	T>C	Intron	
<i>Fator transformador de crescimento Alfa (TGFA)</i>	Atua no desenvolvimento das estruturas craniofaciais (lábio e palato). Variações nesse genes podem levar formas raras de fissura lábio palatinas, além disso esse gene foi associado com agenesia dentária.	2q13.3	rs2902345	T>C	Intron	VIEIRA, 2006 LETRA et al., 2007
			rs1523305	C>T	Intron	
			rs2166975	G>A	Exon	
			rs930655	A>G	Intron	

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

3.1 Tipo de estudos

Trata-se de uma Tese composta por quatro diferentes estudos, que se propõem a responder a cada um dos objetivos. Nesta composição, foram incluídos um estudo observacional transversal juntamente com uma revisão bibliográfica, dois estudos observacionais transversais e um estudo multicêntrico (Figura 1).

3.2 Considerações Éticas

Para atingir cada objetivo, o estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho pelo protocolo nº 44598514.7.00005257 (Anexo 1). Além disso, o quarto estudo por ser multicêntrico os trabalhos tiveram aprovação dos Comitês de Éticas de cada centro (Figura 1).

Além disso, os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido [TCLE] (Apêndice A) e os Termos de Assentimento Livre e Esclarecido [TALE] (Apêndice B) foram apresentados e assinados pelos integrantes (responsável legal /criança /adolescente).

3.3 População e local dos estudos

A amostra estudada foi composta por crianças e adolescentes que estavam em atendimento na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ) (Figura 1). Para a análise laboratorial foi utilizada a infraestrutura do Laboratório de Malformação Congênita do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), do Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênicas do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz e a colaboração com Laboratório do Departamento de Biologia e Medicina Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Pittsburgh (EUA).

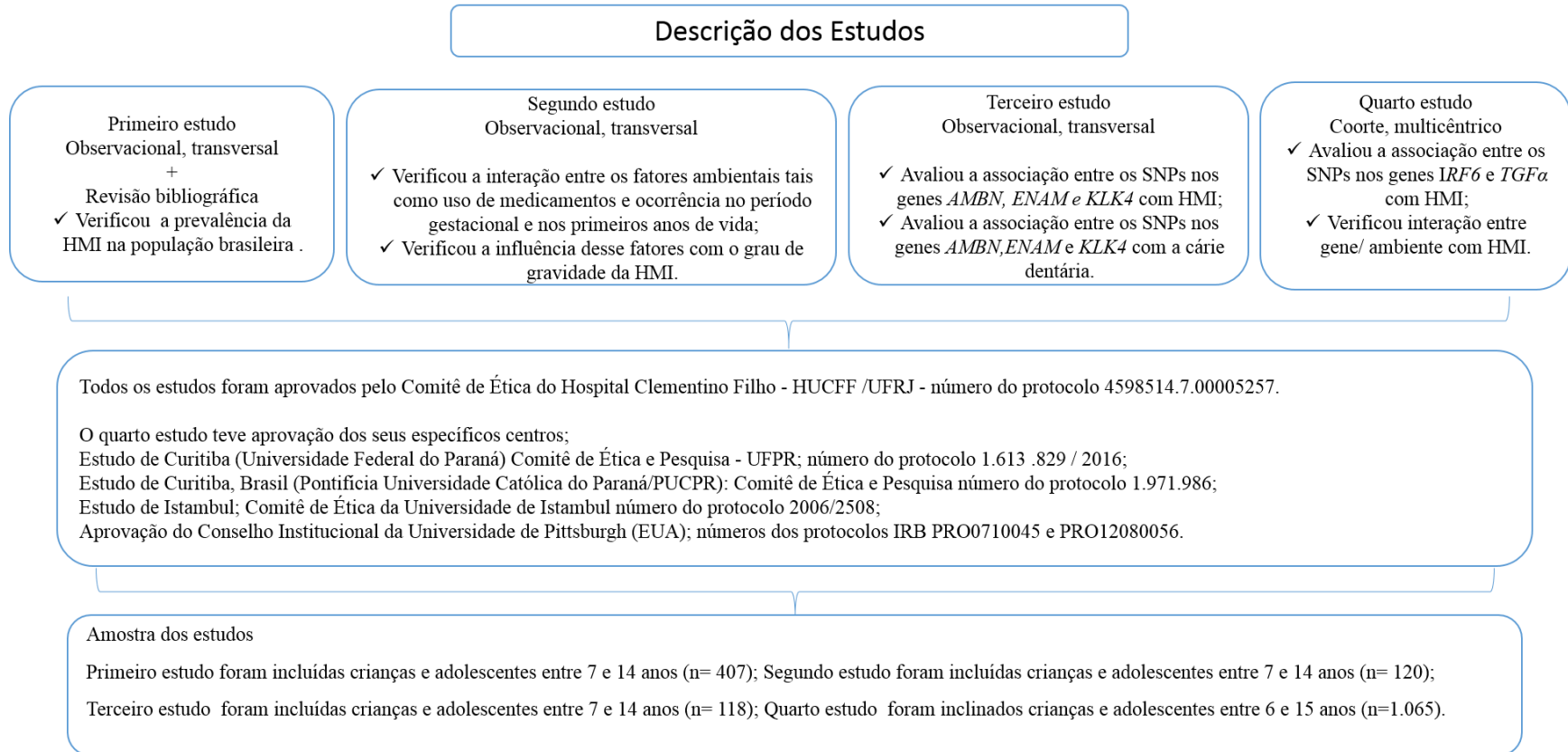


Figura 1. Fluxograma

3.3 Delineamento Metodológico

3.3.1 Primeiro estudo

Esse estudo observacional transversal verificou a prevalência da Hipomineralização Molar Incisivo em indivíduos que procuraram atendimento na clínica da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ no período de Julho de 2015 à Abril de 2017, junto com uma revisão bibliográfica da prevalência de HMI na população brasileira.

Os participantes foram alocados em dois grupos: grupo com HMI (representado pelos pacientes diagnosticados com Hipomineralização Molar Incisivo) e o grupo sem HMI (pacientes que não apresentavam Hipomineralização Molar Incisivo). Foram considerados elegíveis, para ambos os grupos, indivíduos entre 7 e 14 anos que apresentavam os quatro primeiros molares permanentes completamente erupcionados. Os critérios de não inclusão para grupos foram indivíduos portadores de síndromes congênitas, crianças ou adolescentes que apresentavam algum defeito no esmalte dentário (opacidades, hipoplasias e amelogenese imperfeita) e os que faziam uso de aparelho ortodôntico.

Para avaliar a concordância inter-examinador e a intra-examinador (entre o examinador e o padrão ouro), um exercício foi aplicado com 20 imagens clínicas com diversas alterações relacionadas ao esmalte dentário (sendo 8 imagens com HMI). O tempo para visualização das imagens foi de 2 minutos. Após um intervalo de duas semanas, as imagens foram reavaliadas pelo mesmo examinador caracterizando o método para avaliação. Foi obtido um índice Kappa= 0,88, e 0,90 que é indicativo de alta concordância.

Todos os indivíduos incluídos (n=407) no estudo foram submetidos a um exame clínico intraoral, realizado na cadeira odontológica sob luz artificial. Essa etapa foi feita por um examinador especialista em Odontopediatria. O critério para o diagnóstico da Hipomineralização Molar Incisivo seguiu as normas da European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD) (WEERTHEIJM et al., 2003). Os resultados foram registrados em uma ficha clínica (Apêndice D). Os indivíduos cujos os dentes apresentassem somente opacidade demarcada, sem qualquer perda de estrutura, foram considerados como portadores de HMI de grau leve (Figura 2). Os dentes que apresentassem perda de estrutura com necessidade tratamento ou com presença de restaurações eram classificados no grau grave de HMI (Figura 3) (LYGIDAKIS et al., 2010).

Para complementação do estudo, uma pesquisa bibliográfica foi realizada nas bases de dados PubMed, Medline, Lilacs e BBO. Os descritores utilizados foram ‘Dental Enamel

Hypoplasia’, ‘Molar Incisor Hypomineralization’, ‘MIH’, ‘Hypomineralization Molar Incisor’, ‘First permanente molars and incisors’, ‘Prevalence’, ‘Epidemiology’, ‘Epidemiol’ e ‘Brazil’. Os operadores “AND” e “OR” foram utilizados para combinar os termos.

Os dados obtidos no estudo foram registrados e analisados no SPSS versão 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). O teste Qui-quadrado (X^2) foi utilizado para avaliar a possibilidade de associação entre a HMI com a variável gênero com o nível de significância 5%. Para a estimativa da prevalência do estudo uma meta-análise foi realizada utilizando o programa software Review Manager 5.3. A heterogeneidade entre os estudos foi analisada pelo o teste estatístico *I*-quadrado (I^2). Os resultados de 25%, 50% e 75% foram nomeados como estimativas baixa, moderada e alta, respectivamente.



Figura 2. Imagem da Hipomineralização Molar Incisivo no primeiro molar permanente e nos incisivos centrais superiores permanentes. Opacidade demarcada sem perda de estrutura classificada no grau leve. Imagem realizada na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ.

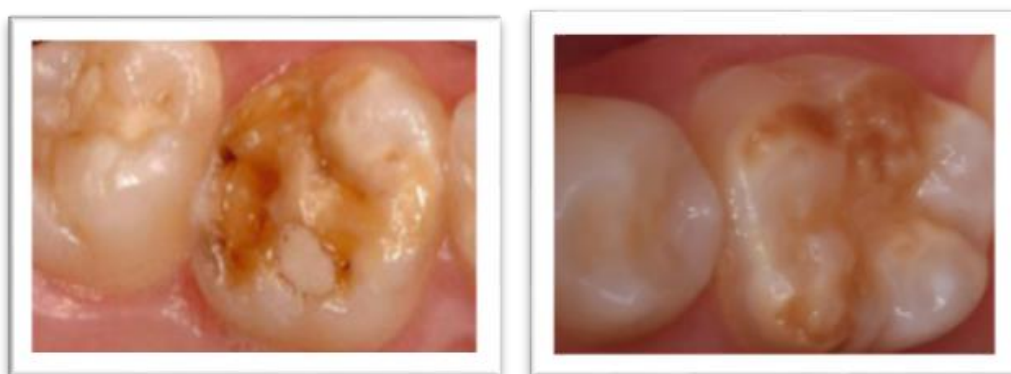


Figura 3. Imagem da Hipomineralização Molar Incisivo nos primeiros molares permanentes. Opacidade demarcada com perda de estrutura classificada no grau grave. Imagem realizada na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ.

3.3.2 Segundo estudo

O presente estudo, do tipo observacional transversal verificou a interação de fatores ambientais tais como o uso de medicamentos e ocorrências durante o período gestacional e nos primeiros anos de vida com a presença de HMI. Além disso verificou a influência desses fatores com o grau de gravidade da HMI (Figura 1).

A amostra de conveniência foi composta por 120 pacientes que estavam em tratamento na clínica de Odontopediatria da FO/UFRJ. Os grupos foram divididos em crianças/adolescentes com HMI (n = 60) e sem HMI (n = 60) pareados por gênero. Além disso, os indivíduos de ambos os grupos deveriam ter os quatro primeiros molares permanentes completamente erupcionados. Os critérios de elegibilidade e de não inclusão foram os mesmo que do primeiro estudo.

Os dados da pesquisa foram coletados por meio do preenchimento da ficha de anamnese contendo informações sobre dados demográficos (idade da criança, sexo, local de nascimento, residência e condição econômica), além de informações sobre saúde da mãe durante o período gestacional (medicamentos utilizados, infecções graves e complicações durante o parto) e histórico médico da criança/adolescente nos primeiros anos de vida (medicamentos utilizados, doenças sistêmicas e casos de infecções graves) (Apêndice C).

O exame clínico foi realizado por um especialista em Odontopediatria calibrado (Kappa 0,88) (Da Silva et al., 2020). O critério de diagnóstico da Hipomineralização Molar Incisivo foi de acordo com as normas da European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD) e as opacidades foram classificadas nos graus leve e grave (Figuras 2 e 3) (WEERTHEIJM et al., 2003).

As análises estatísticas foram feitas no programa SPSS versão 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). O teste de Regressão Logística foi aplicado para avaliar a diferença entre os grupos (com HMI e sem HMI) em relação aos fatores ambientais (período gestacional e o histórico médico do paciente) ($p < 0,05$). Para avaliar as associações entre fatores etiológicos de acordo com o gravidade da HMI o teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado com o nível de significância 5%.

3.3.3 Terceiro Estudo

O estudo foi observacional do tipo transversal, realizado na clínica de Odontopediatria do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FO/UFRJ (Figura 1).

A população estudada foi formada por uma amostra de conveniência, constituída por 118 pacientes de ambos os sexos, recrutados durante o período de Julho de 2015 a Dezembro de 2016. Foram elegíveis para o trabalho crianças/adolescentes entre 07 e 14 anos com os quatro primeiros molares permanentes completamente erupcionados. Não foram incluídos indivíduos portadores de síndromes congênitas e/ou cognitivas, crianças em tratamento ortodôntico e as que apresentavam alterações dentárias (forma, número e tamanho) e defeitos no esmalte dentário (fluorose, opacidades, hipoplasias e amelogenese imperfeita).

Coleta de dados

Todas as etapas da coleta foram realizadas por examinadores previamente calibrados ($Kappa = 0,88$) com objetivo de minimizar as variações e uniformizar os critérios adotados para os diagnósticos. Os dados foram obtidos por meio de anamnese (informações pessoais e informações sobre a condição de saúde do indivíduo (Apêndice C) e preenchimento de uma ficha clínica (Apêndice D). Além disso, para realização da etapa laboratorial, foi feita a coleta do material biológico (saliva) para a posterior extração do DNA.

Exame Clínico

No exame clínico buscou-se avaliar a saúde bucal (diagnóstico de cárie dentária) e o diagnóstico da HMI (Figura 2). O exame foi realizado por um dentista especialista calibrado na cadeira odontológica após profilaxia prévia e sob luz artificial com o auxílio do espelho odontológico. O resultado do exame foi registrado em uma ficha clínica (Apêndice E). Ao final da avaliação, pacientes e responsáveis receberam instruções de higiene oral. Os pacientes que apresentaram indicação de tratamento foram encaminhados para clínica da Odontopediatria para realização do tratamento de acordo com as suas necessidades.

Diagnóstico de cárie dentária/ Hipomineralização Molar Incisivo

O índice para a detecção da doença cárie foi realizado segundo os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997). Foram avaliados o número de dentes cariados, perdidos, extraídos ou obturados na dentição permanente (CPO-D). Os dentes extraídos ou perdidos por trauma dentário não foram incluídos no CPO-D. O critério para o diagnóstico da HMI seguiu com as normas EAPD e se encontra nas Figuras 2 e 3.

Etapa Laboratorial

Coleta do material biológico

A segunda etapa foi iniciada com a coleta do material biológico (saliva) de todos os indivíduos como fonte de DNA genômico. Os participantes foram orientados a estimular a saliva (bochecho) durante 1 minuto e em seguida expectorar em tubos falcos de 15 ml. Além disso, os participantes foram orientados a não ingerir alimentos 30 minutos antes da coleta do material.

Cada tubo foi identificado por uma numeração e congelados a -25°C até a realização da extração do DNA. O material coletado foi processado, armazenado e analisado no Laboratório de Malformação Congênita do Departamento de Genética da UFRJ.

Seleção dos polimorfismos

Para seleção dos polimorfismos uma busca bibliográfica foi realizada e os SNPs escolhidos estão relacionados aos genes presentes nas fases da amelogênese. Foram selecionados um total de quatro SNPs (Tabela 1).

Extração do DNA

A extração do DNA foi feita até duas semanas após a coleta do material biológico. O protocolo utilizado foi a partir de 2 mL de saliva (ORAGENEtm, DNA GenotekInc, Ontario, Canada) seguindo as etapas conforme descrito abaixo:

- Foi misturado por inversão o conteúdo de saliva no coletor por alguns segundos antes de incubá-lo em incubadora aquática à temperatura de 50°C por no mínimo 1 hora, podendo deixar por overnight;
- Posteriormente foi transferido 500 μL de saliva para um tubo de micro centrífuga esterelizado de 1.5mL (Eppendorf). O excedente da amostra foi congelado a -20°C ;
- Foi adicionado para cada 500 μL de saliva 20 μL da proteinase Oragene Purifier (OG-L2P) e mantindo no vortex por 5 segundos;
- As amostras foram incubadas no gelo por 10 minutos e em seguida, centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 13,000 RPM (15,000 x g);
- O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, e adicionado 500 μL de etanol a 95 -100%, posteriormente foi misturado 10 vezes por inversão e deixado à

temperatura ambiente por 10 minutos para completar a precipitação da molécula de DNA;

- Em seguida, foram colocados os tubos na centrífuga por 2 minutos em 13,000rpm (15,000 x g) e foi descartado o sobrenadante e centrifugado por mais 1 minuto a 13,000 rpm (15,000 x g) para precipitar o DNA.
- Foram deixados os eppendorf por 30 minutos na bancada com tampa aberta para total evaporação do etanol;
- 100 µL de TE foi adicionado (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA, ph 8.0) para dissolver o pellet e foi mantido no vortex por 5 segundos;
- Por último, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente overnight (24 horas) com uma proteção de suporte de vidro. As amostras foram estocadas no freezer a – 20°C até as próximas etapas.

Avaliação da quantidade e da pureza do DNA/ Genotipagem

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se 1µL do material extraído. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280nm foi usada para estimar a pureza do DNA. Somente as amostras de DNA com razão 260/280 acima de 1,7 foram incluídas e analisadas.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termo ciclador 7900HT da Applied Biosystems. O método utilizado para as reações foi o TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) (RNADE et al., 2001), no qual foram utilizadas sondas específicas para a distinção alélica (Sondas TaqMan). Todas as reações em PCR foram preparadas com um volume final de 3,0µL (1µL de DNA com a concentração de 1 ng/µL reação); 1,5µL TaqMan PCR máster mix; 0,075µL da sonda TaqMan de cada SNP incluído no estudo e 0,425µL de água deionizada q.s.q.). A amplificação das amostras, foi realizada em condição padrão de 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 52°C por 2 minutos e a 60°C por 1 minuto e 30 segundos. Foram incluídos dois controles negativos e um controle positivo.

Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através do software PLINK (PURCELL *et al.*, 2007). Os testes χ^2 ou exato de Fisher e Razão de Chance (OR) foram usados para comparar as frequências alélicas e genotípicas distribuídas nos grupos com HMI (afetado versus não

afetado), com o grupo HMI (com/sem cárie) e com toda a amostra (com/sem cárie). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo teste do χ^2 em cada polimorfismo e uma estatística descritiva foi realizada no programa SPSS versão 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III)

3.3.4 *Quarto Estudo*

Trata-se de um estudo multicêntrico composto por 1,065 indivíduos constituídos por duas amostra brasileira (Rio de Janeiro e Curitiba) e uma amostra turca (Istambul) (Figura 1). Foram avaliados indivíduos na cidade de Curitiba; o primeiro grupo foi composto por 356 indivíduos (169 do sexo feminino e 187 do sexo masculino), o segundo por 200 indivíduos (108 do sexo feminino e 92 do sexo masculino). A amostra do Rio de Janeiro foi composta por 174 indivíduos (73 do sexo feminino e 101 do sexo masculino). E a última amostra da Turquia foi formada por 335 indivíduos (164 do sexo feminino e 171 do sexo masculino).

Estudo de Curitiba, Brasil (Universidade Federal do Paraná)

Foi um estudo do tipo caso-controle formado por 731 alunos de escolas públicas da cidade de Curitiba. Para seleção da amostra, duas etapas foram realizadas. Para garantir a representatividade da amostra, foi realizada a amostragem por cluster em dois estágios. Primeiro, duas escolas foram selecionadas aleatoriamente. Posteriormente, três salas de aula de cada escola foram selecionadas randomicamente. Esse método foi realizado pelo site www.randomizer.org.

Foram incluídas crianças de 8 anos de idade, com os quatro primeiros molares permanentes erupcionados. O grupo de indivíduos com HMI foi composto por crianças com pelo menos um dos primeiros molares permanentes e/ou segundos molares decíduos afetados. Os critérios de inelegibilidade foram indivíduos que utilizavam aparelho ortodôntico, portadores de síndrome congênita e indivíduos com alteração do esmalte (amelogênese imperfeita). Para a complementação do estudo, uma anamnese com dados demográficos e socioeconômicos previamente validado foi preenchido pelos responsáveis.

Para realização do exame clínico quatro examinadores foram previamente calibrados com um exercício teórico e com trinta imagens de defeitos no esmalte dentário (DDE) de HMI. Posteriormente 60 fotografias de diferentes contextos clínicos envolvendo várias

manifestações de DDE e HMI foram analisadas independentemente. Após uma semana, os examinadores analisaram as mesmas fotografias.

O exame clínico foi realizado em ambiente escolar, com luz artificial, espelho, sonda exploradora e com uma gaze estéril. O critério de diagnóstico para Hipomineralização Molar Incisivo foi com base nas normas da EAPD (WEERHEIJM et al., 2003), e os defeitos do esmalte dentário (DDE) foram diagnosticados através do índice modificado DDE (Comissão de Saúde Oral, Pesquisa e Epidemiologia. Grupo de Trabalho FDI 1992).

Estudo de Curitiba, Brasil (Pontifícia Universidade Católica do Paraná)

A amostra foi composta por 200 indivíduos (100 com HMI e 100 sem HMI), matriculados em escolas municipais de Curitiba. Essa amostra foi recrutada independentemente da amostra do estudo da Universidade Federal do Paraná. Os critérios de inclusão foram crianças entre 6 e 10 anos de idade, com dentes afetados com HMI e completamente erupcionados. Os critérios de não inclusão foram indivíduos em tratamento ortodôntico ou pontuação 3, 4, 5 e 6 do ICDAS (Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie). Um total de dois examinadores foram calibrados para realização do diagnóstico de HMI, utilizando métodos de fotografias de acordo com um critério publicado anteriormente (GHANIM et al., 2017).

Estudo do Rio de Janeiro, Brasil (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Trata-se de um estudo composto por 174 indivíduos entre 7 e 14 anos de ambos os sexos. Os participantes foram recrutados da clínica de Odontopediatria da FO/UFRJ. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: com HMI (n = 78) e sem HMI (n = 96). Foram incluídas crianças e adolescentes com os quatro primeiros molares permanentes completamente erupcionados. Os critérios de não inclusão foram pacientes com síndromes congênitas, indivíduos que apresentavam defeitos no esmalte dentário (lesões hipoplásicas, fluorose, amelogenese imperfeita), presença de anomalias dentárias de forma, tamanho ou número e aqueles que faziam uso de aparelho ortodôntico.

Para a realização da etapa clínica, foi feito o preenchimento da ficha de anamnese (Apêndice C) contendo informações como: idade, gênero, local de nascimento, residência, escolaridade e renda familiar. Além de informações sobre a saúde da mãe durante o período gestacional (medicamentos utilizados, infecções graves e complicações durante o parto) e

histórico médico da criança durante os primeiros anos de vida (medicamentos utilizados, doenças sistêmicas, febre alta, desnutrição, asma, bronquite, casos de epilepsia e infecções graves). Em seguida, foi realizado um exame clínico buscando avaliar a saúde bucal do paciente e o diagnóstico para HMI utilizando os critérios da EAPD (Figuras 2 e 3).

Estudo de Istambul

Os indivíduos selecionados foram crianças e adolescentes entre 6 e 12 anos, recrutados da Clínica de Odontopediatria da Universidade de Istambul. Os critérios de elegibilidade foram pacientes portadores de síndrome congênita, pacientes com fluorose ou que faziam uso de um aparelho ortodôntico fixo. O diagnóstico de HMI foi realizado de acordo com os critérios da EAPD (WEERHEIJM et al., 2003). Os grupos foram divididos em pacientes com e sem HMI. Todos os examinadores estavam devidamente calibrados. O exame clínico foi realizado com o uso de luz artificial, um espelho intraoral e uma gaze.

Etapa laboratorial

Foram coletadas amostras de saliva de todos os participantes como fonte de DNA genômico para atingir os objetivos propostos. Um total de cinco polimorfismos foram selecionados no gene *IRF6* (rs2073487, rs2013162, rs17015215, rs861019, rs642961) e quatro no gene *TGF α* (rs2902345, rs1523305, rs930655, rs2166975) (Tabela 1). A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo previamente publicado (TREVILATTO E LINE, 2000). A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se 1 μ L do material extraído. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280nm foi usada para estimar a pureza do DNA. Somente as amostras de DNA com a razão 260/280 acima de 1,7 foram incluídas neste estudo.

As reações de PCR em tempo real foram feitas em um termociclador (Stratagene Mx3005P). O método utilizado para as reações foi o TaqMan (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA, EUA) (RANADE et al., 2001), no qual foram selecionadas sondas específicas para a distinção alélica (Sondas TaqMan). Todas as reações foram feitas com volume final de 3,0 μ L (1 μ L de DNA com a concentração de 2 ng/ μ L por reação; 1,5 μ L TaqMan PCR máster mix; 0,075 μ L da sonda TaqMan de cada SNPs e 0,425 μ L de água deionizada q.s.q.). A amplificação das amostras foi realizada em condição padrão de 95°C por 10 minutos, sendo 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 40 segundos.

Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados no programa SPSS versão 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito para todos os SNPs incluídos no estudo. O programa software Plink (PURCELL et al., 2007) foi utilizado para realizar as análises de comparação dos genótipos e dos fenótipos entre os indivíduos com e sem HMI. Foram calculadas razões de chances (OR) para os grupos com e sem HMI com o intervalo de confiança de 95%. Para explicar os testes múltiplos, foi realizada uma correção de Bonferroni e valores de p de 0,001 (0,05/36).

4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Artigo 1: Defining the Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization in Brazil

Status: Publicado

Revista: Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada 2020;20:e5146

<https://doi.org/10.1590/pboci.2020.021> ISSN 1519-0501 / eISSN 1983-4632

Artigo 2: Influence of Environmental Factors on the Presence and Severity of Molar Incisor Hypomineralization.

Status: Submetido

Revista: European Archives of Paediatric Dentistry

Artigo 3: Association between genetic polymorphisms in genes acting in the amelogenesis with Molar Incisor Hypomineralization and caries experience

Status: Em processo de submissão

Revista: Clinical Oral Investigation

Artigo 4: Medication-Gene Interaction in Molar Incisor Hypomineralization

Status: Submetido

Revista: Journal of Dentistry Research (JDR)

4.1 Artigo 1: Defining the Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization in Brazil



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada 2020; 20:e5146
<https://doi.org/10.1590/pboci.2020.021>
 ISSN 1519-0501 / eISSN 1983-4632



SHORT COMMUNICATION

Defining the Prevalence of Molar Incisor Hypomineralization in Brazil

Fernanda Mafei Félix da Silva¹, Yuqiao Zhou², Fernanda Gabriela de Fátima Vieira¹, Flávia Martinez de Carvalho³, Marcelo de Castro Costa¹, Alexandre Rezende Vieira⁴

¹Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.

³Laboratory of Congenital Malformation Epidemiology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations, National Institute of Population Medical Genetics, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Author to whom correspondence should be addressed: Alexandre Rezende Vieira, University of Pittsburgh, 335 Sutherland Dr. Pittsburgh, PA, USA. 15261. Phone: +1 412 383-8972. E-mail: alexandre_vieira@pitt.edu.

Academic Editors: Alessandro Leite Cavalcanti and Wilton Wilney Nascimento Padilha

Received: 21 August 2019 / Accepted: 15 November 2019 / Published: 25 November 2019

How to cite this article: Silva FMF, Zhou Y, Vieira FGF, Carvalho FM, Costa MC, Vieira AR. Defining the prevalence of molar incisor hypomineralization in Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2020; 20:e5146. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.021>

Abstract

Objective: To define the prevalence of Molar Incisor Hypomineralization (MIH) in Brazil since the reports ranged from 2.5% to 40.2%. **Material and Methods:** We studied 407 children from 7 to 14 years of age. MIH was measured using the European Academy of Paediatric Dentistry criteria of 2003. Clinical data were collected by a calibrated dentist (Kappa=0.88) and included affected teeth and degree of MIH severity (mild/severe). Mild MIH cases were considered when the tooth presented demarcated opacity ≥ 1.0 mm, without any loss of structure. While severe cases were defined by teeth in which loss of structure was present, or past or current lesion that required treatment, or presence of atypical restorations. In addition, published data (nine studies) reporting MIH in Brazilians were identified, and the heterogeneity of these studies was tested (I² index/ $p \leq 0.01$). **Results:** In the original sample studied, the majority of patients were males (55.3%; $n = 225$), with an average age of 10.1 years (± 2.1 years). The prevalence of MIH in this group was 14.5% (59 affected in 407), and most of the affected teeth had a mild degree of alteration (77.4% or 202 in 261 teeth). **Conclusion:** A meta-analysis including nine published reports, and our original data showed that MIH prevalence in Brazil is 13.48 (95% CI, 8.66% -18.31%).

Keywords: Dental Enamel Hypoplasia; Molar; Prevalence; Cross-Sectional Studies.



Association of Support to Oral Health Research - APESB



Introduction

Molar Incisor Hypomineralization (MIH) is defined as a qualitative enamel defect that occurs during different stages of amelogenesis [1]. This condition usually affects at least one of the first permanent molars and may be associated with permanent incisors [2]. However, some studies report the association of MIH with permanent canines and primary second molars [3,4].

Disturbances during pregnancy, severe infections, the frequent use of antibiotics in childhood [5], and other exposures [6] have been investigated as etiologic factors and the genetics play role [7]. One of the main characteristics of MIH is enamel porosity and opacity, which may vary from white/yellowish to brown [2]. In some cases, MIH may cause the loss of tooth structure, resulting in functional (pain, tooth sensitivity and dental caries), and aesthetic problems for the individual [8].

It is suggested that the diagnosis of MIH should be performed on clean and wet teeth, and epidemiological studies of MIH should be based on 8-year-olds since, at this age, all permanent molars and incisors have erupted [2,9]. Likely due to different criteria of diagnosis, the prevalence of MIH varies considerably in different parts of the world ranging from 2.4 to 37% in European countries [10-12], 2.5% in China [13], and 2.5% to 40% [14-17] across Brazil. Due to these facts, the present study aimed to define the prevalence of MIH in Brazilians, which shows the widest range reported in the literature.

Material and Methods

Sample and Calibration

A sample consisting of 407 individuals of both sexes from 7 to 14 years of age treated at the Paediatric Dentistry. The inclusion criteria for this study was the patients having all first permanent molars erupted. Children with syndromes known to affect the enamel development were not included in the study.

To assess the intra-examiner reliability, an exercise was first applied to the examiner (F.M.F.S) and the gold standard evaluator (M.C.C.). Twenty clinical pictures of dental enamel defects (eight with MIH) were shown to the two individuals. Two weeks after the first assessment, a new assessment was carried out with the examiner, and the resulting Kappa was 0.88.

Clinical Examination

The clinical examination was performed by the calibrated dentist (F.M.F.S) carried out with a mirror and a probe in the dental chair using artificial light. MIH was evaluated using the European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD) [2,9]. Mild MIH cases were considered when the tooth presented demarcated opacity $\geq 1.0\text{mm}$, without any loss of structure. While severe cases were defined by teeth in which loss of structure was present, or past or current lesion that required treatment, or presence of atypical restorations [2]. The study included 225 males (55.3%) and 182 (44.7%) females, with an average age of 10 years.

Bibliographic Sources

A database search was performed in PubMed, Lilacs (Latin American and Caribbean Health Sciences Literature) and BBO (Brazilian Bibliography of Dentistry) using the following terms: "Dental Enamel Hypoplasia", "Molar Incisor Hypomineralization", "MIH", "Hypomineralization Molar Incisor", "First permanent molars and incisors", "Prevalence", "Epidemiology", "Epidemiol" and "Brazil". A total of 383 references were identified and after excluding the publications that did not report denominators to allow calculation of frequencies, case reports, and studies that included the same sample of other publications, nine articles were selected (Table 1).



Table 1. Characteristics of the articles (MIH study location, prevalence, and diagnostic criteria).

Author and Year	City (State)	Type of Study	Sample	Age/Years	Calibration/Kappa	Prevalence MIH%	Diagnostic Criteria
Soviero et al., 2009 [17]	Rio de Janeiro (RJ)	Cross-Sectional	249	7-13	0.80/0.90/0.96 Theoretical + Clinical Examination	40.2	EAPD (2003) Koch (2001) Opacity (—)
Costa Silva et al., 2010 [8]	Botelhos (MG)	Cross-Sectional	918	6-12	0.91 Photographs	19.8	EAPD (2003) Opacity >1.0mm
Jeremias et al., 2013 [7]	Araraquara (SP)	Cross-Sectional	1.157	6-12	0.91	12.3	EAPD (2003) Opacity >2.0mm
Hanan et al., 2015 [18]	Manus (AM)	Cross-Sectional	2.062	6-10	0.87 Clinical Examination	9.12	EAPD (2003) Opacity >2.0mm
Rodrigues et al., 2015 [19]	São Luis (MA)	Cross-Sectional	1.179	7-14	0.91 Photographs	2.5	EAPD (2003) Opacity >2.0mm
Silva Junior et al., 2015 [14]	Belém (PA)	Cross-Sectional	260	5-17	0.7 Clinical Examination	8.84	EAPD (2003) Opacity >2.0mm
Lima et al., 2016 [20]	Teresina (PI)	Cross-Sectional	594	11-14	0.91 Theoretical + Clinical Examination	18.4	EADP (2003) Opacity >1.0mm
Tourino et al., 2016 [21]	Lavras (MG)	Cross-Sectional	1.181	8-9	0.96 Theoretical + Photographs + Clinical examination	20.4	EADP (2003) Opacity >1.0mm
Costa Silva et al., 2017 [16]	Botelhos (MG)	Prospective Cohort	142	5-6	0.93 Theoretical + Photographs	16.1	EADP (2003) Opacity >1.0mm

Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS version 20.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). Chi-square, with a significance level set at 5%, was used to compare the MIH distribution by sex. The prevalence estimates from the literature were pooled together using random-effects meta-analysis that accounted for between-study heterogeneity. Statistical heterogeneity (RevMan) was assessed by the chi-square test on *Q* statistic, which was quantified by the *I*-square values. *I*-square values of 25, 50, and 75% were nominally assigned as low, moderate, and high estimates, respectively.

Ethical Aspects

This study was performed after approval from the local Ethics Committee for Research Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Protocol No. 44598514.7.00005257). All subjects/guardians read and signed a written informed consent before their participation in the study.

Results

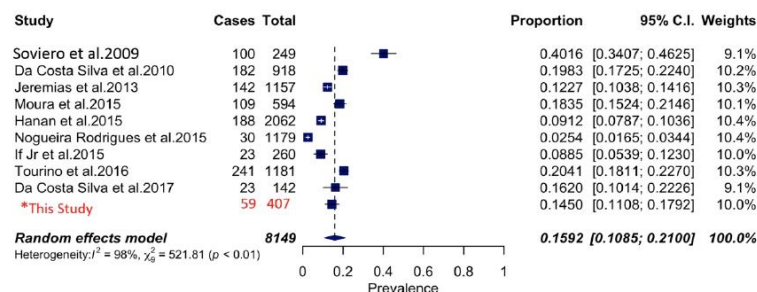
The prevalence of MIH in the studied sample was 14.5 % (59 affected in 407 individuals studied), and there was no statistically significant difference in MIH affection by sex ($p=0.914$).

A total of 261 teeth were affected by MIH, 33% of them ($n=86$) were first permanent maxillary molars, 28.3% ($n=74$) first permanent mandibular molars, 22.2% ($n=58$) permanent maxillary incisors, and 16.5% ($n=43$) permanent mandibular incisors. According to the degree of severity, it was observed that most teeth were mildly affected by MIH (77.4%; 202 in 261 affected teeth). Among the most severely affected teeth, most of them were first permanent molars (84.7%; 50 in 160 affected molars) (Table 2).

Table 2. Characteristics of the MIH group.

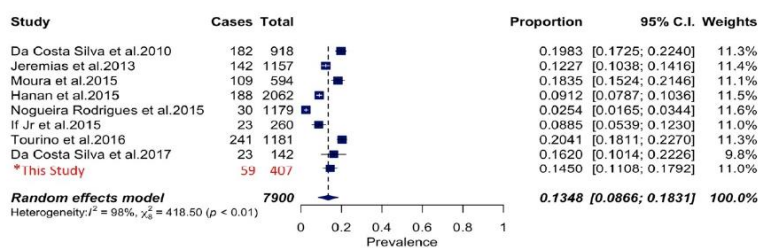
Variables	MIH Group (n=59)	
Mean Age (SD)	10.15 (± 1.5)	
Sex	N (%)	
Male	33 (55.9)	
Female	26 (41.1)	
Teeth Affected by MIH	Mild	Severe
	N (%)	N (%)
Permanent Maxillary Central Incisors	38 (18.1)	6 (10.2)
Permanent Maxillary Lateral Incisors	13 (6.4)	1 (1.6)
Permanent Mandibular Central Incisors	26 (13)	1 (1.6)
Permanent Mandibular Lateral Incisors	15 (7.5)	1 (1.6)
Firs Permanent Maxillary Molars	64 (32.)	22 (37.4)
First Permanent Mandibular Molars	46 (23.)	28 (47.6)
Total	202 (77.4)	59 (22.6)

Meta-analysis was performed on data from nine articles results in addition to our original data. Figure 1 shows the estimates of MIH reported by the ten studies, which yielded a summary prevalence of 15.92 (95% CI, 10.85%–21.00%) with significant evidence of between study heterogeneity ($Q = 521.81$, $p < 0.01$, $I^2 = 98$) (Figure 1). In an attempt to reduce heterogeneity, the sensitivity analysis was performed by removing the study that reported a different clinical diagnostic (the size of the lesions was not taken into consideration and used two methods for diagnostics). The new estimate was 13.48 (95% CI, 8.66%–18.31%) (Figure 2).



*The new prevalence study of MIH.

Figure 1. Plot MIH of prevalence with a new result.



*The new prevalence study of MIH.

Figure 2. Plot MIH of prevalence without Soviero et al. [17].

Discussion

There is great interest in understanding why MIH occurs, but this is a difficult task if we do not have even a decent estimate of the prevalence of the condition. However, it is notable that over the years, prevalence studies of MIH have been increasing mainly in Brazil.

The prevalence of MIH in the present study was 14.5%, which was consistent with most of the literature [22,23]. Not surprising, the prevalence estimate in our sample is close to the one found in the city of São Paulo (12.3%) [15], which is just 400 kilometers from downtown Rio de Janeiro. This may also be due to the diagnostic criteria that was similar among these studies. The frequency in the north-eastern region of Brazil appears to be lower [18,14]. This may be due to the inclusion of opacities greater than 2 mm in studies conducted in the region, which makes it more a strict criterion.

The meta-analysis showed high heterogeneity among the studies included. This is probably related to the use of different indexes, diagnostic criteria, and age groups. All selected articles had their examiners calibrated, but in different types of photographic training, clinical examination, or both. Eight studies, included our original data, used the same diagnostic criteria. Some studies included in the meta-analysis [14,19,20],



except for one [16], reported lower prevalence compared to our study, probably because they considered only opacities that were larger than 2 millimeters of diameter.

In our sample, most cases had mild MIH, although more than 50% of affected teeth were first permanent molars with some degree of loss of structure. Such cases can have discomfort, caries lesion development, and esthetic concerns [14]. Prevalence studies are important to help formulate strategies to prevent or reduce the possibility of the consequences of MIH.

Conclusion

The prevalence of MIH in Brazilians is 13.48 (95% CI, 8.66% -18.31%).

Authors' Contributions

FMFS	0000-0003-3247-7746	Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – Original Draft Preparation and Writing – Review and Editing.
YZ	0000-0001-9450-4055	Validation, Formal Analysis and Writing – Review and Editing.
FGFV	0000-0001-9437-1715	Investigation and Writing – Review and Editing.
FMC	0000-0003-2617-9689	Formal Analysis and Writing – Review and Editing.
MCC	0000-0003-2192-1960	Formal Analysis and Writing – Review and Editing.
ARV	0000-0003-3392-6881	Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Writing – Original Draft Preparation and Writing – Review and Editing.

All authors declare that they contributed to critical review of intellectual content and approval of the final version to be published.

Financial Support

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J* 1997; 47(5):173-82. <https://doi.org/10.1002/j.1875-595x.1997.tb00785.x>
- [2] Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou AM, Alaluusua S, Espelid I. Best clinical practice guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH): an EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010; 11(2):75-81. <https://doi.org/10.1007/bf03262716>
- [3] Elfrink ME, ten Cate JM, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Veerkamp JS. Deciduous molar hypomineralization and molar incisor hypomineralization. *J Dent Res* 2012; 91(6):551-5. <https://doi.org/10.1177/0022034512440450>
- [4] Schmalfuss A, Stenhagen KR, Tveit AB, Crossner CG, Espelid I. Canines are affected in 16-year-olds with molar-incisor hypomineralisation (MIH): an epidemiological study based on the Tromsø study: "fit futures". *Eur Arch Paediatr Dent* 2016; 17(2):107-13. <https://doi.org/10.1007/s40368-015-0216-6>
- [5] Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010; 11(2):53-8. <https://doi.org/10.1007/bf03262713>
- [6] Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 354(1-2):74-84. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.001>
- [7] 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. <https://doi.org/10.1159/000445726>
- [8] Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro RC, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-265X.2010.01097.x>
- [9] Weerheijm KL, Duggal M, Majare 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.



- [10] Kukleva MP, Petrova SG, Kondeva VK, Nihtyanova TI. Molar incisor hypomineralisation in 7-to-14-year old children in Plovdiv, Bulgaria - an epidemiologic study. *Folia Med* 2008; 50(5):71-5.
- [11] Dietrich G, Sperling S, Hetzer G. Molar incisor hypomineralisation in a group of children and adolescents living in Dresden (Germany). *Eur J Paediatr Dent* 2008; 4(3):133-7.
- [12] Wogelius P, Haubek D, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities in permanent 1st molars and incisors in 6 to 8-year-old Danish children. *Acta Odontol Scand* 2008; 66(1):58-64. <https://doi.org/10.1080/00016350801926941>
- [13] Cho S, Ki Y, Chu V. Molar incisor hypomineralization in Hong Kong Chinese children. *Int J Paediatr Dent* 2008; 18(5):348-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2008.00927.x>
- [14] Silva Júnior IF, Aguiar NL, Barros WRC, Silva LS, Arantes DC, Nascimento LS. Prevalence and severity of molar incisor hypomineralization in students of Belém, Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* 2015; 15(1):377-85. <https://doi.org/10.4034/PBOCI.2015.151.40>
- [15] Jeremias F, Souza JF, Silva CM, Cordeiro RC, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and molar-incisor hypomineralization. *Acta Odontol Scand* 2013; 71(3-4):S70-6. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.734112>
- [16] Costa Silva CM, Ortega EMM, Mialhe FL. The impact of molar-incisor hypomineralisation on dental caries in permanent first molars: a prospective cohort study. *Oral Health Prev Dent* 2017; 15(6):581-6. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a39590>
- [17] Soviero V, Haubek D, Trindade C, Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand* 2009; 67(3):170-5. <https://doi.org/10.1080/00016350902758607>
- [18] Hanan SA, Alves Filho AO, Medina PO, Cordeiro RCL, Santos-Pinto L, Zuanon ACC. Molar-incisor hypomineralization in schoolchildren of Manaus, Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* 2015; 15(1):309-17. <https://doi.org/10.4034/PBOCI.2015.151.33>
- [19] Rodrigues FCN, Ribeiro PHB, Thomaz EBAF, Lima GQT, Neves PAM, Ribeiro CCC. Molar-incisor hypomineralization in schoolchildren of São Luis, Brazil, Maranhão: Prevalence and associated factors. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* 2015; 15(1):271-8 <https://doi.org/10.4034/PBOCI.2015.151.29>
- [20] Lima MD, Andrade MJ, Dantas-Neta NB, Andrade NS, Teixeira RJ, Moura MS, et al. epidemiologic study of molar-incisor hypomineralization in schoolchildren in north-eastern Brazil. *Pediatr Dent* 2015; 37(7):513-9.
- [21] Tourino LF, Correa-Faria P, Ferreira RC, Bendo CB, Zarzar PM, Vale MP. Association between molar incisor hypomineralization in schoolchildren and both prenatal and postnatal factors: a population-based study. *PLoS One* 2016; 11(6):e0156332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156332>
- [22] Zawaideh FI, Al-Jundi SH, Al-Jal'oli MH. Molar incisor hypomineralisation: prevalence in Jordanian children and clinical characteristics. *Eur Arch Paediatr Dent* 2011; 12(1):31-6. <https://doi.org/10.1007/bf03262776>
- [23] Kuscu O, Caglar E, Aslan S, Durmusoglu E, Karademir A, Sandalli N. The prevalence of molar incisor hypomineralization (MIH) in a group of children in a highly polluted urban region and a windfarm-green energy island. *Int J Paediatr Dent* 2009; 19(5):176-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2008.00945.x>

4.2 Artigo 2: Influence of environmental factors on the presence and severity of molar incisor hypomineralization

Fernanda Mafei Felix da Silva¹ Fernanda Gabriela de Fatima Vieira² Thais Rodrigues Campos Soares³ Flavia Martinez de Carvalho⁴ Alexandre Rezende Vieira⁵ Marcelo de Castro Costa⁶

¹DDS, MSD, PhD student, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²DDS, Master student, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³DDS, MSD, PhD, Post Doctoral Research – Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴DDS, MSD, PhD- Laboratory of Congenital Malformation Epidemiology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ECLAMC (Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations) at INAGEMP (National Institute of Population Medical Genetics), Rio de Janeiro, Brazil.

⁵DDS, MSD, PhD, Professor, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh.

⁶DDS, MSD, PhD, Associate Professor, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding Author:

Marcelo de Castro Costa

Disciplina de Odontopediatria da FO-UFRJ

Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, 325 - Faculdade de Odontologia, Cidade

Universitária – Ilha do Fundão.

E-mail: pttpo2009@yahoo.com.br

Fax/phone: +5521 39382098

CEP: 21941-971 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine whether MIH is associated with risk factors during the gestational period and during the first years of life of a child with MIH, and to evaluate the association of these factors with MIH severity. **Material and Methods:** This study was conducted with 120 patient paired by sex, 60 with MIH and 60 without MIH, at average ages of 9.9 (± 1.9) and 9.7 (± 1.7) years, respectively. Data collected included the child's medical history and the mother's health during pregnancy. Chi-square and logistic regression were performed to determine any statistical evidence of the environmental factors contributing to MIH, with the significance level set at 5%. **Results:** There was a statistically significant difference between individuals with and without MIH ($p = 0.014$, OR = 3.55; 95% CI = 1.35-10.57; $p = 0.019$, OR = 3.01; 95% CI = 1.74- 8.42, respectively), related to the association with intercurrents during pregnancy and medication taken by the child. In addition mothers in the group of patients with MHI showed more complications during childbirth ($p = 0.045$). There was no association with degree of MIH severity ($p > 0.05$). **Conclusion:** The study suggests that use of medications in childhood and complications during pregnancy, such as infections, can trigger the development of MIH. However, these factors do not influence MIH severity.

Keywords: Children, Enamel defects; Etiology; Hypomineralization.

Introduction

Dental enamel is the most mineralized tissue in the human body, and its formation is divided into three important phases: secretory, transition and maturation¹. It is known that the presence of any genetic disturbance and / or environmental aggressors during these phases can result in permanent alterations in enamel structure, since the enamel does not undergo remodeling^{1,2,3}. An example of these defects is Molar Incisor Hypomineralization (MIH).

MIH is defined as a qualitative enamel defect that affects one or more permanent molars and/ or permanent incisors^{4,5} and its prevalence varies considerably in different parts of the world, ranging from 2.8% to 44%⁶. One of the main characteristics of MIH is enamel porosity and opacity, which may vary from white/yellowish to brown⁷. In some cases, MIH may cause loss of tooth structure, resulting in functional and aesthetic problems for the individual, which may affect their quality of life^{8,9,10}.

According to the literature, MIH is associated mainly with disorders during pregnancy, severe infections, frequent use of antibiotics in childhood and genetic changes in genes responsible for enamel formation^{11,12}. However, the aetiology the condition is yet to be clearly defined. Thus, the purpose of this study was to determine risk factors during gestational period and the first years of the child's life with MIH and to evaluate the association of these factors with the MIH severity.

Materials and Methods

Ethics

This study was performed after approval from the local Ethics Committee for Research (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ – Number: 44598514.7.00005257). All subjects/guardians read and signed a written informed consent before their participation in the study.

Study Design

This cross-section study was conducted at the Paediatric Dentistry Clinics of the Universidade Federal do Rio de Janeiro between Abril 2015 to May 2017. A sample

consisting of 120 individuals of both sexes between 7 and 14 (10 ± 1.2) years of age were recruited in the cited period.

The groups were paired by sex and divided into children/adolecents with MIH ($n=60$) and without MIH ($n=60$). The inclusion criteria for this study was patients with all the first permanent molars erupted. The exclusion criteria for both groups included children with syndromes, enamel defects (hypoplastic lesions, fluorosis, and amelogenesis imperfecta) and patients undergoing orthodontic treatment.

Training and Calibration

To assess intra and interexaminer reliability, an exercise was undertaken by the examiner and evaluator with 20 clinical pictures of dental enamel defects (eight with MIH). Two weeks after the first assessment, a new one was carried out by the examiner and resulting in Kappa 0.88 and 0.90

Data collection

The health aspects were collected through a clinical record. The interview was done face-to-face with the parent, including the following information: demographic data (child's age, sex, place of birth, residence), mother health during pregnancy (medications used, severe infections and complications during childbirth), and children medical history (medications used, systemic diseases and severe infections).

Clinical Exam

The clinical examination was performed in the dental chair where the teeth were examined using artificial light, a mirror and a probe, after prophylaxis. The MIH diagnosis was based on the European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD) criteria⁵. The degree of MIH was considered mild when the tooth presented marked opacity, without loss of structure (Figure 1A and 1B). Teeth with a loss of structure that needed treatment or had atypical restorations were considered severe cases¹³ (Figure 1C).

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS version 21.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). Logistic regression was performed to assess the difference between

groups (MIH and without MIH) regarding environmental factors ($p < 0.05$). Chi-square was applied to disclose the associations between environmental factors and MIH and to assess degree of severity of MIH depending on environmental factors.

Results

All subjects were included in the study divided into children with MIH ($n=60$) and without MIH ($n=60$) average ages of 9.9 (± 1.9) and 9.7 (± 1.7) years, respectively (Table 1). A total of 283 teeth were affected by MIH, 30.74% of them ($n=87$) were first permanent maxillary molars, 28.26% ($n=80$) first permanent mandibular molars, 25.8% ($n=73$) permanent maxillary incisors, and 15.5% ($n=43$) permanent mandibular incisors.

Table 1 shows the interaction of environmental factors with the presence of MIH. There was an association between intercurrents during pregnancy and child taking medications with the presence of MIH ($p = 0.014$, OR = 3.55; 95% C.I = 1.35-10.57; $p = 0.019$, OR = 3.01; 95% C.I = 1.23- 7.95, respectively).

Table 2 shows the prevalence of severity of MIH and the risk factors. Most patients had teeth affected by mild MIH 58.3% ($n = 35$). However, there was no apparent influence of the variables tested on the degree of severity of MIH.

Discussion

A variety of aetiological factors is suggested to cause MIH but no conclusive results have been found to date. It is known that some environmental factors and genetic changes are associated with MIH (Jeremias et al., 2016; Whatling et al., 2008; Bussaneli et al., 2019). In addition the literature reports that medication use, systemic disease, and complication during pregnancy are potential aetiological factors of MIH (Alaluusua et al., 2010; Whatling et al., 2008; Kuscu et al., 2008).

Our results showed a positive association between the presence of MIH and complications during pregnancy, complications at birth, and medication used by children in the early childhood. Regarding the degree of severity of MIH in this study, mild MIH was predominant and there was no association of these risk factors with the degree of severity of

MIH. These results may provide some support for a genetic inheritance contribution to MIH, mainly in relation to clinical characteristics severity (Vieira et al., 2019).

Although recalling bias is an issue in the types of studies like ours, our study was mostly comprised of mothers, who typically are better in recalling information related to the early life of their children. However, the large gap between ages of children can make it difficult for mothers to answer many questions of the questionnaire. We suggest studies with children from 7 to 10 years old, allowing for a more accurate collection of information.

In summary, MIH is a multifactorial condition, more than one etiological factors can determine its occurrence, especially childbirth complications and medication use during the first years of children life, are associated with MIH. These results suggested that MHI may be influenced by environmental factors; however, the genetical effect cannot be underestimate. Longitudinal studies that evaluate enviromental and genetic impact in MHI should be realize.

Conclusion

The results of this study showed that environmental facts, especially childbirth complications and medication use during the first years of children life, are associated with MIH.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest.

References

1. Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralization: A systematic review. *European Archives of Paediatric Dentistry* 2010; 11 (2): 53-8.
2. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *International Dental Journal* 1997; 47(3):173–82.
3. Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-Mchernry T. Genome- wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008; 87(5):435-9.
4. Jälevik B. Prevalence and diagnosis of molar-incisor hypomineralisation (MIH): a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010; 11: 59-6.
5. Weerheieijm KL, Duggal M, Majáre I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens HC, 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: 110-3.

6. Hernandez M, Boj JR, Espasa E. Do We Really Know the Prevalence of MIH? *J ClinPediatrDent*. 2016;40(4):259-63.

7. Da Costa Silva CM, Jeremias F, Souza JF, Cordeiro RCL, Santos Pinto L, Zuanon ACC. Molar incisor hypomineralization: prevalence severity and clinical consequences in Brazilian children. *Int J PaediatrDent* 2010; 20(6): 426-34.

8. Meneghim MC, Kozlowski FC, AntonioC, Pereira A V. Assaf, Tagliaferro PS. Perception of dental fluorosis and other oral health disorders by 12-year-old Brazilian children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2007; 17: 205–210.

9. Chawla N, Messer LB, Silva M. Clinical studies on molar–incisor hypomineralisation part 2: development of a severity index. *Eur Arch Paediatr Dent* 2008; 9: 191–9.

10. Ozgül BM, Saat S, Sönmez H, Oz FT. Clinical evaluation of desensitizing treatment for incisor teeth affected by Molar-Incisor Hypomineralization. *J Clin Pediatr Dent* 2013; 38(2): 101-5.

11. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicilin may cause molar incisor hypomineralization. *Jdent Res*.2009; 88:132-6

12. Jeremias F, Ricardo AG, Pierre JF, Souza CMB, Fragelli MRLS, Finoti DG, Bussaneli RCL, Cordeiro RS. Maurer-Morelli VC, Scarel-Caminaga RM, Lourdes SP. Family-Based Genetic Association for Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res* 2016; 50:310–318.b

13. 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. *European archives of paediatric dentistry: official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*. 2010; 11(2):75-81.

14. Whatling R, Fearne JM. Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *Int J PaedDent*. 2008; 18:155-62

15. Kuscu OO, Caglar E, Sandalli N. The prevalence and aetiology of molar–incisor hypomineralisation in a group of children in Istanbul. *Eur J Paed Dent*. 2008;9 (3):139–44.

16. Kuscu OO, C, aglar E, Aslan S, et al. The prevalence of molar incisor hypomineralisation (MIH) in a group of children in a highly polluted urban region and a wind farm-green energy island. *IntJPaediatrDent*. 2009; 19 (3):176–85.

17. Bussaneli DG, Restrepo M, Fragelli CMB, Santos-Pinto L, Jeremias F, Cordeiro RCL, Bezamat M, Vieira AR, Scarel-Caminaga RM. Genes Regulating Immune Response and Amelogenesis Interact in Increasing the Susceptibility to Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res.* 2019;53(2):217-227. Doi : 10.1159 / 000491644. Epub 2018 Aug 21.

Table 1. Interaction between environments facts and Molar Incisor Hypomineralization (MIH)

		MIH		P*	(95% C.I)	P***
		NO (n = 60) n (%)	Yes (n=60) n (%)			
Degree of MIH severity	Mild		35 (58.3)	-	-	-
	Severe		25 (41.7)			
Sex	Female	30(50.0)	30 (50.0)	-	-	-
	Male	30(50.0)	30 (50.0)			
Mean Age (SD)		9.(±1.7)	9.(±1.5)	0.544**	1.05(0.86-1.29)	0.581
Intercurrences during pregnancy and complications in early childhood	Yes	14(23.3)	32 (53.3)	0.001	3.75 (1.74- 8.42)	0.001
	No	46(76.7)	28(46.7)			
Intercurrences during early childhood (medication and systemic complications)	Yes	8 (13.3)	19 (31.7)	0.029	3.01(1.23- 7.95)	0.019
	No	52(86.7)	41 (68.3)			
Use of medication during pregnancy	Yes	7 (11.7)	9 (15.0)	0.788	1.33 (0.46- 3.99)	0.592
	No	53(88.3)	51 (85.0)			
Intercurrences during pregnancy	Yes	6 (10.0)	17 (28.3)	0.020	3.55 (1.35-10.57)	0.014
	No	54 (90.0)	43 (71.7)			
Complications at child birth	Yes	5 (8.3)	14 (23.3)	0.045	3.348 (1.18-10.99)	0.030
	No	55 (97.7)	46 (76.7)			

* Chi Square ($p < 0.05$) ** Student's t-test ($p < 0.05$)

*** Logistic regression ($p < 0.05$) Logistic regression OR

Table 2: Relationship between MHI severity and environmental factors

		MIH		<i>P</i> *
		Mild n = 35 n (%)	Severe n = 25 n (%)	
Intercurrences during early childhood (medication use)	Yes	8 (42.1)	11 (57.9)	0.146
	No	27 (65.9)	14 (34.1)	
Intercurrences during pregnancy /complications in early childhood	Yes	17 (53.1)	15 (46.9)	0.540
	No	18 (64.3)	10 (35.7)	
Use of medication during pregnancy	Yes	6 (66.7)	3 (33.3)	0.722
	No	29 (56.9)	22 (43.1)	
Intercurrences during pregnancy	Yes	12 (70.6)	5 (29.4)	0.260
	No	23 (53.5)	20 (46.5)	
Complications at child birth	Yes	6 (42.9)	8 (57.1)	0.302
	No	29 (63)	17 (37)	

* Chi Square ($p < 0.05$)

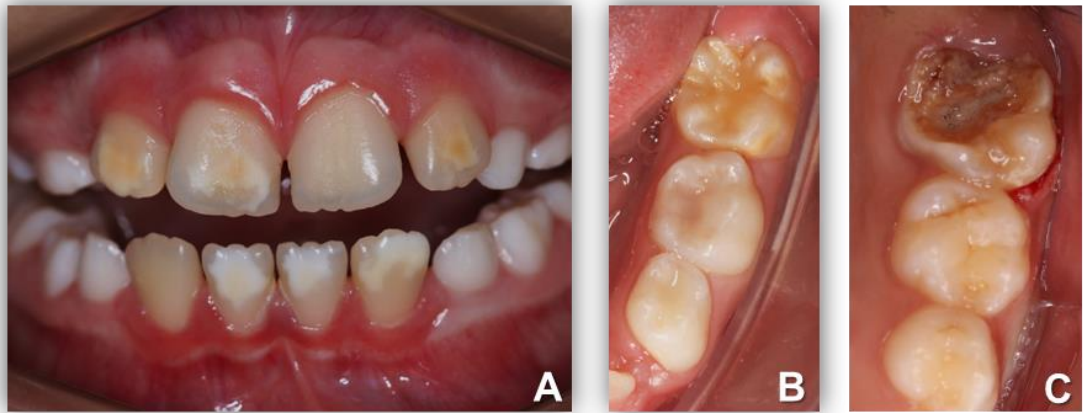


Figure 1: A) Incisors with mild degree of MIH; B) First permanent molar presenting opacity without loss of structure; C) First permanent molar with opacity and loss of structure. Image made from Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.3 Artigo 3: Association between genetic polymorphisms in genes acting in the amelogenesis with Molar Incisor Hypomineralization and caries experience

Fernanda Mafei Felix da Silva², Thais Rodrigues Campos Soares², Ana Luiza Franco³, Alexandre Rezende Vieira⁴, Flavia Martinez de Carvalho⁵, Andrea Fonseca-Gonçalves⁶
Marcelo de Castro Costa⁷

¹DDS, MSD, PhD student, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²DDS, MSD, PhD, Post doctoral Research, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Graduation student, Laboratory of Congenital Malformation Epidemiology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Professor, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh.

⁵DDS, MSD, PhD- Laboratory of Congenital Malformation Epidemiology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ECLAMC (Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations) at INAGEMP (National Institute of Population Medical Genetics), Rio de Janeiro, Brazil.

⁶DDS, MSD, PhD, Adjunct Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁷DDS, MSD, PhD, Associate Professor, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence Author – Marcelo de Castro Costa

Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rua Rodolpho Paulo Rocco, 325

CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ –Brazil

E-mail: pttpo2009@yahoo.com.br

Fax/phone: +5521 3938-2098

Abstract

Objectives: To determine the association of genes that acting in the amelogenesis with molar incisor hypomineralization (MIH) and dental caries. **Materials and Methods:** The sample was comprised of 118 patients, 54 with and 64 without MIH, at average ages of 10.1 (± 1.9) and 9.7 (± 1.4) years, respectively. MIH was measured using the European Academy of Paediatric Dentistry criteria of 2003. Caries experience was assessed by decayed, missing and filled teeth (DMFT) index. Genomic DNA was collected from saliva and genetic polymorphisms in *ameloblastin* (*AMBN*; rs 4694075), *enamelin* (*ENAM*; rs3796704, rs7664896) and kallikrein (*KLK4*; rs2235091) genes were analyzed by real time polymerase chain reaction analyses using TaqMan chemistry. Data were analyzed using the PLINK software package. Qui-square tests and Odds Ratio were used to compare allele and genotype distribution of all groups ($p < 0.05$). **Results:** Most patients were male ($n=70$) with a total of 277 teeth evaluated were affected by MIH, 30.3% of them were first permanent maxillary molars. Sixty-three (53.4%) children/adolescent presented caries lesion in at least one tooth, presenting DMFT=1.03(± 1.32). There was an association between the variant allele of polymorphism rs2235091 (A>G) in *KLK4* gene ($p < 0.01$) with the presence of MIH. The polymorphisms rs4694075 (C>T) in *AMBN* and *ENAM* rs 3796704 (G>A) was associated with dental caries ($p < 0.05$). **Conclusions:** There is an association between polymorphisms in genes that acting in enamel formation with MIH and dental caries. **Clinical Relevance:** Greater knowledge concerning the etiological factors of MIH are essential to allow its control and future prevention.

Keywords: Dental Caries, Dental enamel, Gene, Enamel defects, Polymorphirms

Introduction

Dental enamel is the mostly mineralization tissue in the human body and its formation is divided into four define stage: presecretory, secretory, maturation and mineralization [1,2]. These stages are controlled by ameloblasts, cells that are responsible to morphology and function of dental enamel [3]. Disturbances during the amelogenesis (genetics/environment facts) may leads to permanent developmental defects of enamel (DDE) [4,5]. The prevalence of DDE varies considerably and ranges from 6.7% to 67.1% [6,7].

Molar Incisor Hypomineralization (MIH) is an example of qualitative enamel defect, characterized by the appearance of white to brownish opacities [8]. MIH affects at least one of the first permanent molars and may be associated with permanent incisor [9]. In addition, these hypomineralization lesions have been associated with permanent canines and primary second molars [10,11]. One of the main characteristics of MIH is enamel porosity, which may cause the loss of tooth structure, resulting in functional disorder (pain, tooth sensitivity) [9,12].

Ever since the criteria for MIH were developed, there has a great discussion about its possible etiological factors. One of them is the genetic variation presents in genes that acting in the enamel formation [4]. Among these genes, we can highlight; ameloblastin (*AMBN*), enamelin (*ENAM*) and kallikrein (*KLK4*) that act in the phase of mineralization and maturation [1,2]. Genetic variations in polymorphisms (SNPs) located in these genes could contribute to structural defects and higher levels of mineral losses [2,3], which facilitate dental fractures, so favoring dental caries [13]. Thus, the aim of this study was to investigate the association between genetic polymorphisms in genes that acting in the amelogenesis with MIH and caries experience in Brazilians individuals from Rio de Janeiro.

Material and methods

Ethics

This study was conducted after approval of the local research ethics committee (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ – Number: 44598514.7.00005257). All subjects/guardians read and signed a written informed consent before their participation in the study.

Study Design

This cross-sectional study was conducted at the Paediatric Dental Clinics of the Universidade Federal do Rio de Janeiro between July 2015 and December 2016. A sample consisting of 118 individuals of both sexes between 7 and 14 (9.94 ± 1.67) years of age was recruited during this period.

The groups were divided into children with MIH ($n=54$) and children without MIH ($n=64$). The inclusion criteria for these study-included patients with full the first permanent erupted molars. The exclusion criteria for both groups were children with syndromes, enamel defects (except MIH, as hypoplastic lesions, fluorosis, amelogenesis imperfecta) and patients undergoing orthodontic treatment.

The outcomes consisted on observing possible association between genetic variations in the polymorphisms in *AMBN*, *ENAM* and *KLK4* genes with MIH and dental caries. This study followed the STROBE recommendation [14].

Training and calibration exercise

To assess the intra and inter examiner reliability for MIH and dental caries exams, a calibration exercise was carried out through two stage: theoretical and practical/clinical. The theoretical stage consisted of a discussion of the criteria for the diagnosis of MIH and dental caries. A professor of pediatric dentistry (MCC), the gold standard, coordinated this step, instructing the examiner on how to perform the clinical examination. The practical/clinical step was performed firstly with 20 clinical pictures of dental enamel with and without defects for MIH. Each dentist (the professor and the examiner) examined independently these pictures for inter examiner agreement evaluation. Two weeks after the first assessment, a new assessment of the pictures was carried out by the examiner for intra examiner agreement.

For DMFT reliability a clinical stage was performed with children/adolescents who did not compose the main sample. Each dentist (the professor and specialists) examined T.S previously selected patients aged up to 14 years old. Data analysis involved Cohen's Kappa coefficient on a picture-by-picture and tooth-by-tooth basis. Inter-examiner agreement was tested by comparing the examiner/specialists with the gold standard (Kappa = 0.90 for MIH and Kappa = 0.89 for dental caries). The intra examiner values were Kappa = 0.88 for MIH.

Clinical Exam

Clinical examinations were performed by pediatric dentists, with children sitting in chairs at the dental office under artificial light. Caries experience was assessed by the DMFT index (decayed, missing teeth due to caries, filled teeth) [15]. MIH were diagnostic using the European Academy of Pediatric Dentistry (EAPD) [16]. Mild MIH cases were considered when the tooth presented demarcated opacity $\geq 1.0\text{mm}$, without any loss of structure. While severe cases were defined by teeth affected with a lesion that required treatment, loss of structure, or presence of atypical restorations [17]. At the end of the clinical exam, each patient received oral hygiene instructions.

Sample Collection/Genotyping and Allele analyses

Biological sample was collected from saliva and the DNA extracted were done by the protocol for manual purification from 0.5 mL of DNA Oragene™. Before the collect, all patients were informed to not eating for up to 30 minutes and a saliva stimulation was performed for 1 minute. The amount of DNA concentration and the purity of each sample was determined by Spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, US). The DNA concentration was obtained by readings at 260 nm. In order to estimate the purity, the proportion used was 260 nm /280 nm. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes *AMNB*, *KLK4*, *ENAM* were included in that study (Table1).

Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR). All PCR reactions were prepared with a final volume of 3.0 μ l (1 μ l of DNA with a concentration of 1 ng / μ l reaction); 1.5 μ L master mix; 0.075 μ L of the Taqman of each SNP including in the study and 0.425 μ L of deionized water q.s.q.) Reaction were carried out using Taqman chemistry in total volumes of 3.0 μ L in an ABI PRISM Sequence Detection System 7900¹⁸. The genotyping results were analyzed using SDS software version 1.7 (Applied Biosystems). PCR reactions were repeated twice when necessary and allele frequencies were calculated.

Statistical Analyses

Data were analyzed using the PLINK software package [19]. Chi-square test and Odds Ratio (OR) were used to compare allele and genotype distribution based on MIH group (affect versus unaffected) and based on the presence of dental caries (caries free and experience of caries for both groups with MIH and without MIH). Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated using the Chi-square test within each polymorphism and the descriptive statistics was performed by SPSS version 20.0 (Statistical Package for Social

Sciences, SPSS Inc., Chicago, III). In order to account for multiple testing, Bonferroni correction was performed and p -values of 0.001 (0.05/4) or below were considered significant.

Results

All the subjects recruited were included in the study. The participants were divided into children with MIH (n=54) and without MIH (n=64), with average ages of 9.9 (\pm 1.9) and 9.7 (\pm 1.7) years, respectively. In addition, most of the sample was composed of males n=70 (59.3%).

Two hundred and seventy seven teeth were affected by MIH lesion, 30.3 % (n=84) of them were first permanent maxillary molars, 27.8% (n= 77) were first permanent mandibular molars, 23.8% (n=66) were permanent maxillary incisors, and 18.1% (n=50) were permanent mandibular incisors. Most children presented mild MIH lesions (60.6%; n = 32), followed by severe MIH lesion (39.4%; n = 22). A total of 63 (53.4%) individuals presented dental caries (DMFT=1.03(\pm 1.32) and most of them were in MIH group (52.4%; n=33), followed by without MIH (47.6%; n=30).

Both rs3796704 SNP in *ENAM* (Table 2) and rs4694075 in *AMNB* (Table 3) showed an association with dental caries ($p \leq 0.05$), while rs2235091 SNP in *KLK4* is not association with dental caries ($p \leq 0.05$). Regarding the presence of MIH, there was a statistical evidence with the polymorphisms rs2235091 (A>G) in the *KLK4* ($p \leq 0.01$, OR = 3.75; 95% C.I= 1.84-7.62) (Tables 4 and 5).

Discussion

Several different etiological factors have been identified as causing to enamel defects [4,20,21]. In this study, we evaluated whether possible association between the polymorphisms located in the genes that are associated with development enamel with MIH and dental caries. All genes included has important functions in the stages of maturation and mineralization of amelogenesis [2,3] (Table 1).

Although the *AMBN* and *ENAM* genes present strong association in the literature with the presence of MIH [5,22], in our study this evidence was not found. The only SNP that found an association in with MIH was rs2235091 in *KLK4* gene. This contrasts with a previously study that observed no evidence with *KLK4 gene and MIH* [23]. It is may be

associated with different demographic and socio-economic characteristics, since Brazilian population is considered genetically heterogeneous [24] and the studies were done in a different region. Another aspect to be considered is the influence of environmental factors, since MIH can be defined as a multifactorial condition [21,25,26].

Another significant variable in our study was the association between polymorphisms rs3796704 in *ENAM* and rs4694075 in *AMNB* with dental caries. Some reports in the literature demonstrated that genes involved in enamel development have a susceptibility to dental caries [27,28, 13]. Vasconcelos et al. [29] demonstrated an association between the *MMP13* genes with caries experience and development enamel defects (DDE). In addition, the same study pointed out the importance of collected some environmental information as dietary habits and oral hygiene to possible performing gene-environment analysis [29].

Among the limitations that we have faced in this study are the sample size that may not have the expected effect. In contrast, the strengths of this study include the well-characterized phenotype, determined by experienced dentists and these increase the confidence in the results obtained. Another limitation was that we were unable to obtain data collected from some environmental information such as used the medication, in the early childhood, during in the pregnancy period and diary habits.

Future studies can investigate the gene-environment interaction since these conditions are classified as multifactorial diseases. It is important to explore this condition from different demographic and socioeconomic characteristics. We suggest other studies with different populations, thus characterizing the importance of multicenter studies.

Conclusion

The polymorphism rs2235091 located *KLK4* had an association with the presence of MIH and the results showed an association between polymorphisms rs3796704 in *ENAM* and rs4694075 in *AMBN* (MIH group) with dental caries.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior Brasil- (CAPES) – Finance code 001, CNPq (159961/2018-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ process E-26/201.745/2019. This study is part of the PhD thesis of the first author.

References

1. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP (2002). Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol* 47(4):281-291.
2. Bartlett JD (2013). Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent*. <https://doi.org/10.1155/2013/684607>
3. Robinson C, Kirkham J, Weatherell JA, Richards A, Josephsen K, Fejerskov O (1988). Mineral and protein concentrations in enamel of the developing permanent porcine dentition. *Caries Research* 22(6):321–326
4. Alaluusua S (2010). Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralization: A systematic review. *European Archives of Paediatric Dentistry* 11: 53-8.
5. Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC et al (2013). Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol* 58(10):1434-1442.
6. Wogelius P, Haubek D, Poulsen S (2008). Prevalence and distribution of demarcated opacities in permanent 1st molars and incisors in 6 to 8-year-old Danish children. *Acta Odontol Scand*. Feb; 66 (1):58-64
7. Robles MJ, Ruiz M, Bravo-Perez M, González E, Peñalver MA (2013). Prevalence of enamel defects in primary and permanent teeth in a group of schoolchildren from Granada (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 18 (2):e187-93.
8. Garg N, Jain AK, Saha S, Singh J (2012). Essentiality of early diagnosis of molar incisor hypomineralization in children and review of its clinical presentation, etiology and management. *Int J Clin Pediatr Dent* 5(3):190-196.
9. Weerheijm KL (2003). Molar incisor hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent* 4(3):11.
10. Schmalfluss A, Stenhagen KR, Tveit AB, Crossner CG, Espelid I (2016). Canines are affected in 16-year-olds with molar-incisor hypomineralisation (MIH): an epidemiological study based on the Tromsø study: "Fit Futures". *Eur Arch Paediatr Dent*. 17(2):107-13.
11. Elfrink ME, Ten Cate JM, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Veerkamp JS (2012). Deciduous molar hypomineralization and molar incisor hypomineralization. *J Dent Res*. 91(6):551-5.
12. Özgül BM, Saat S, Sönmez H, Öz FT (2013). Clinical evaluation of desensitizing treatment for incisor teeth affected by molar-incisor hypomineralization. *J Clin Pediatr Dent* 38:101-5.
13. Shuler CF (2001). Inherited risks for susceptibility to dental caries. *J Dent Educ*. 65(10): 1038–45.

14. Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol.* 2008 Apr; 61 (4):344-9.
15. WHO. Oral Health Survey. Basics Methods. 3rd edn. Geneva: World Health Organization, 1987.
16. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I et al (2003). Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *European journal of paediatric dentistry: official journal of European Academy of Paediatric Dentistry.* 4(3):110-3.
17. Lygidakis N, Wong F, Jälevik B, Vierrou AM, Alaluusua S, Espelid I (2010). Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor- Hypomineralisation (MIH): An EAPD Policy Document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 11(2):75-81.
18. Ranade K, Chang MS, Ting CT, et al (2001). High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 11(7):1262-1268.
19. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3):559-575.
20. Vieira AR, Kup E (2016). On the etiology of molar-incisor hypomineralization. *Caries Res* 50 (2):166-169.
21. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N (2016). Etiology of molar incisor hypomineralization - A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 44(4):342-353.
23. Jeremias F, Ricardo AG, Pierre JF, et al (2016). Family-Based Genetic Association for Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res* 50:310–318.
24. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, et al (2000). The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444–46.
25. Jedeon K, Loiodice S, Marciano C, et al (2014). Estrogen and bisphenol A affect male rat enamel formation and promote ameloblast proliferation. *Endocrinology.* 155(9):3365–3375.
26. Jedeon K, Houari S, Loiodice S, et al (2016). Chronic Exposure to Bisphenol A Exacerbates Dental Fluorosis in Growing Rats. *J Bone Miner Res.* 31(11):1955–1966.
27. Nibali L, Di Iorio A, Tu YK, Vieira AR (2017). Host genetics role in the pathogenesis of periodontal disease and caries. *J Clin Periodontol.* 44 Suppl 18:S52–78.
28. Tannure PN, Kuchler EC, Lips A, et al (2012). Genetic variation in MMP20 contributes to higher caries experience. *J Dent.* 40(5): 381–6.
29. Vasconcelos KR, Arid J, Evangelista S, et al (2019). MMP13 Contributes to Dental Caries Associated with Developmental Defects of Enamel. *Caries Res.* 53 (4):441-446.

30. Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, et al (2019). Are mTOR and endoplasmic reticulum stress pathway genes associated with oral and bone diseases? *Caries Res* 53(3):235-241.

Table 1 Genetic polymorphism characteristics in this study

<i>Gene</i>	SNPs	<i>Locus</i>	Base change	Consequence
<i>Ameloblastin (AMBN)</i>	rs4694075	<i>4q21</i>	C>T	Intron variant
<i>Enamelin (ENAM)</i>	rs3796704	<i>4q13.3</i>	G>A	Intron variant
	rs7664896	<i>4q13.3</i>	G>C	3'UTR
<i>Kallikrein (KLK4)</i>	rs2235091	<i>19q13.3/q13.4</i>	A>G	Intron variant

Information source: dbSNP from <https://www.ncbi.nlm.nih>

Table 2. Caries experience genotype and Allele frequency.

Gene/ Polimorfismo	Patients total (n=118) Caries free n= 55 Caries experience n= 63	Genotype, n (%)				Allele n (%)		*p
<i>KLK4</i> rs2235091	Caries Experience	GG	AG	AA	Undetermined	A	G	0.68
		12(19)	19(30.2)	13(20.6)	19(30.2)	45(51.1)	43(48.9)	
	Caries free	GG	AG	AA	Undetermined	A	G	
		6(11)	11(20)	11(20)	27(49)	33(59)	23(41)	
<i>ENAM</i> rs 3796704	Caries Experience	GG	GA	AA	Undetermined	G	A	0.04
		29(46)	12(19)	-----	22(35)	70(85.4)	12(14.6)	
	Caries free	GG	GA	AA	Undetermined	G	A	
		21(38.2)	2(3.6)	-----	32(58.2)	44(95.7)	2(4.3)	
<i>ENAM</i> rs7664896	Caries Experience	GG	CG	CC	Undetermined	G	C	0.42
		3(20.6)	12(19)	23(36.5)	25(39.7)	18(23.7)	58(76.3)	
	Caries free	GG	CG	CC	Undetermined	G	C	
		4(7.2)	10(18.2)	7(12.7)	34(61.9)	12(26)	34(74)	
<i>AMNB</i> rs4694075	Caries Experience	TT	CT	CC	Undetermined	C	T	0.16
		11(17.4)	19(30.1)	2(3.1)	31(49.2)	23(36)	41(64)	
	Caries free	TT	CT	CC	Undetermined	C	T	
		4(7.2)	10(18.1)	7(12.7)	34(61.8)	24(57.1)	18(42.9)	

Statically significant ($p \leq 0.05$)

*p = Chi-square or Fisher's test

Table 3. Genotype and Allele frequency comparisons related to caries experience in MIH group

Gene/ Polimorfismo	MIH Group (n=54) Caries free n= 22 Caries experience n= 32	Genotype, n (%)				Allele n (%)		*p
<i>KLK4</i> rs2235091	caries free	GG 5(21.7)	AG 3(13)	AA 3(13)	Undetermined 11(52.1)	A 9(41)	G 13(59)	0.34
	caries experience	GG 8(24.3)	AG 6(18.2)	AA 1(3)	Undetermined 17(54.5)	A 8(26.7)	G 22(73.3)	
<i>ENAM</i> rs 3796704	caries free	GG 5(21.7)	GA 1(4.3)	AA -----	Undetermined 16(74)	G 12(92.4)	A 1(7.6)	0.39
	caries experience	GG 14(42.4)	GA 6(18.2)	AA -----	Undetermined 12(39.3)	G 34(85)	A 6(15)	
<i>ENAM</i> rs7664896	caries free	GG 2(8.7)	CG 3(13)	CC 2(8.7)	Undetermined 15(69.7)	G 7(50)	C 7(50)	0.28
	caries experience	GG 2(6)	CG 8(24.2)	CC 13(39.39)	Undetermined 9(30.3)	G 12(26)	C 34(74)	
<i>AMNB</i> rs4694075	caries free	TT 5(21.7)	CT 1(4.3)	CC 5(21.7)	Undetermined 11(52.2)	C 12(50)	T 12(50)	0.04
	caries experience	TT 5 (15.1)	CT 6 (18.1)	CC 1(3)	Undetermined 21(63.6)	C 8(33.3)	T 16(66.7)	
Statically significant ($p \leq 0.05$)								
*p = Chi-square or Fisher's test								

Table 4. Genotype and Allele frequency in the groups MIH/without MIH

Gene/ Polimorfismo	Patients total (n=118) MIH= 54 Without MIH= 64	Genotype, n (%)				Allele n (%)		*p
<i>KLK4</i> rs2235091	MIH group	GG 14(25.9)	AG 8(14.8)	AA 5(9.3)	Undetermined 27(50)	A 18 (33.3)	G 36 (66.7)	0.01
	Without MIH group	GG 6(9.4)	AG 22(34.4)	AA 19(29.7)	Undetermined 17(26.6)	A 33(59)	G 23(41)	
<i>ENAM</i> rs 3796704	MIH group	GG 19(35.2)	GA 6(11.1)	AA -----	Undetermined 29(53.7)	G 44(68.7)	A 6(9.3)	0.27
	Without MIH group	GG 29(45.3)	GA 10(15.6)	AA -----	Undetermined 25(39.1)	G 68(84.4)	A 10(15.6)	
<i>ENAM</i> rs7664896	MIH group	GG 3(20.6)	CG 12(19)	CC 23(36.5)	Undetermined 25(39.7)	G 18(23.7)	C 58(76.3)	0.57
	Without MIH group	GG 4(7.2)	CG 9(14.1)	CC 27(42.2)	Undetermined 25(39.1)	G 12(26)	C 34(74)	
<i>AMNB</i> rs4694075	MIH group	TT 11(17.4)	CT 19(30.1)	CC 2(3.1)	Undetermined 30(55.6)	C 23(36)	T 41(64)	0.31
	Without MIH group	TT 17(26.6)	CT 10(15.6)	CC 10(15.6)	Undetermined 27(42.2)	C 50(78.1)	T 44(21.9)	

Statically significant ($p \geq 0.05$)

p*Test Chi-square or Fisher's test

Table 5. Summary of the Allelic association with MIH

GENE	SNP	WT	OR(95%C.I) *	**p value
<i>AMBN</i>	rs4694075	C	0.724 (0.352-1.487)	0.378
<i>ENAM</i>	rs3796704	A	0.981 (0.333-2.88)	0.973
<i>ENAM</i>	rs7664896	G	1.831 (0.821- 4.07)	0.136
<i>KLK4</i>	rs2235091	G	3.75 (1.84- 7.62)	0.001

**Statically significant ($p \leq 0.05$)

WT= Wild type

Note: *OR (95%CI) = Odds ration; 95% confidence intervals

4.4 Artigo 4: Medication Gene Interaction in Molar Incisor Hypomineralization

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

¹Department of Oral Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

²Department of Stomatology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

³Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Graduate Program of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

⁵Graduate Program of Dentistry, Positivo University, Curitiba, PA, Brazil

⁶Department of Genetics, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁷Graduate Program of Applied Biotechnology to Child and Adolescent Health, Pequeno Príncipe College, Curitiba, PA, Brazil

⁸Department of Pedodontics, Istanbul University, Istanbul, Turkey

⁹Department of Pedodontics, Medipol Istanbul University, Istanbul, Turkey

¹⁰Craniofacial Anomalies Research Center and Department of Orthodontics, College of Dentistry, The University of Iowa, Iowa City, IA, USA

¹¹Department of Diagnostic and Biomedical Sciences, and Center for Craniofacial Research, UTHealth School of Dentistry at Houston, Houston, TX, USA

¹²Department of Pediatric Dentistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

Corresponding Author – Alexandre Rezende Vieira

University of Pittsburgh

335 Sutherland Dr. Pittsburgh, PA 15261

Phone (412) 383-8972

FAX (412) 624-3080

E-mail: arv11@pitt.edu/ alexandre_vieira@pitt.edu

Abstract

Molar incisor hypomineralization (MIH) is an enamel disorder characterized by white to brownish lesions presenting rapid caries progression, and mainly affecting permanent first molars and incisors. These enamel defects usually occur when there are disturbances during the mineralization or maturation stage of amelogenesis. Both genetics and environmental factors have been suggested to play a role in its development, but no conclusive risk factors explained the disease source. During the head and neck development, the interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene is a key element for normal oral and maxillofacial structure formation whereas the transforming growth factor alpha (*TGFA*) is an essential cell regulator, acting during proliferation, differentiation, migration and apoptosis. In this present study, we hypothesized that these genes interact and contribute to predisposition of MIH. Environmental factors affecting children that were 3 years of age or older were also hypothesized to play a role in the disease etiology. A total of 1,065 salivary samples from four different cohorts were obtained, DNA was extracted from each sample and nine single nucleotide polymorphisms genotyped. Association tests and logistic regression implemented in PLINK were used for analyses. No significant associations were identified other than a potential interaction between *TGFA* rs930655 with all the markers tested in the Turkish population. These interactions were not identified in the remaining cohorts. Associations ($p < 0.05$) between the use of medications after three years of age and MIH were also found, suggesting that infections at the age children starts to socialize contribute to the development of MIH.

Keywords: Enamel defects, Gene, Molar, Hipomineralization

Introduction

The hardest biological material in the human body is the tooth enamel, composed by both mineral and organic phases (Cuy et al. 2002). Disturbances during amelogenesis will impact maturation or mineralization stages, and can lead to defects in the enamel translucence, also called enamel hypomineralization (Jeremias et al. 2013). Molar-incisor hypomineralization (MIH) is an example of an enamel disorder characterized by the appearance of white to brownish lesions presenting rapid caries progression and hypersensitivity (Garg et al. 2012). These asymmetrical lesions affect first permanent molars associated or not with permanent incisors (Raposo et al. 2019) and more recently MIH has been reported to also affect canines (Vieira and Kup 2016). Prevalence of MIH varies but has been consistently reported to range between 1% and 35% in all parts of the world, with most reported frequencies range around 12% (Hussain et al. 2018; Koruyucu et al. 2018b; Saitoh et al. 2018; Zhao et al. 2018; Ahmad et al. 2019; Davenport et al. 2019; Glodkowska and Emerich 2019; Gorbatoeva et al. 2019; Goswami et al. 2019; Kilinc et al. 2019; Mejia et al. 2019; Rai et al. 2019; Villanueva-Gutierrez et al. 2019; Hartsock et al. 2020; Silva et al. 2020). Nevertheless, different systematic reviews concluded that none of the previously studied environmental factors that were believed to be risk factors for MIH fully explained the disease etiology (Silva et al., 2016; Vieira and Kup 2016; Fatturi et al., 2019). In contrast, etiological factors associated with enamel forming genes (Jeremias et al., 2013) or in immune response-related genes (Bussaneli et al., 2019) have been reported to play a role in the disease onset.

Over the past few years, our group has focused on studying different phenotypes that may be present in the same individual with the hypothesis that they may be influenced by the same underlying genetic variation (Bezamat et al. 2019). Conditions such as cleft lip and palate, for example, have shown an increased frequency of abnormal tooth sizes and morphology (Walker et al., 2009); we have shown that the frequency of dental anomalies as a consequence of disturbances in dental development was much higher in individuals born with clefts, indicating that dental phenotypes should be considered an extended phenotype of oral clefts (Letra et al., 2007). More recently, we have shown that some genetic associations for MIH can be identified when studied in combination with cleft lip and palate (Koruyucu et al. 2018a). Since we showed that the interaction of *IRF6* and *TGFA* appeared to contribute to oral clefts (Letra et al. 2012), we aimed to test if this interaction contributed to MIH as well.

Methods

The study population consisted of 1,065 individuals from four populations including three Brazilian cohorts and a Turkish cohort. Saliva sample collection and DNA extractions were described previously (Trevilatto and Line 2000). Two groups were from Curitiba, Brazil; the first group consisted of 356 subjects (169 females and 187 males) and the study protocol was approved by the Municipal Department of Education and the Committee for Ethics in Research in Human Health Sciences of the Federal University of Paraná (UFPR; approval no. 1.613.829 / 2016). The second group from Curitiba consisted of 200 individuals (108 females and 92 males) and the project was approved by the Ethics and Research Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná, under the protocol number 1.971.986. The third cohort was from Rio de Janeiro, Brazil, consisted of 174 individuals (73 females and 101 males), and the study protocol was approved by the local Ethics Committee for Research (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ – approval protocol number 4598514.7.00005257). Finally, the Turkish population consisted of 335 subjects (164 females and 171 males) and the study was approved by the Istanbul University (approval protocol number 2006/2508) Institutional Review Board. Further oversight was obtained at the University of Pittsburgh Institutional Review Board (IRB approval protocol numbers PRO0710045 and PRO12080056). All subjects/guardians read and signed a written informed consent before their participation in the study. All four cohorts are described in detail below and a breakdown of the populations used in the study is described in Table 1.

Cohort from Curitiba, Brazil (Federal University of Paraná):

Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

For this case-control study, the sample enrolled 356 school children, which were randomly selected from a representative population (Portella et al. 2019). This previous cross-sectional study involved 731 school children from public schools from the city of Curitiba. To ensure the representativeness, two-stage cluster sampling was performed. First, two schools from each administrative district was randomly selected. Second, two or three classrooms from each selected school were randomly selected. The random method consisted of using simple raffles using the website www.randomizer.org. To generate the random sequence, a numerical sequence for schools and classrooms was used. School

children aged 8 years old, with four first molars erupted in the oral cavity were included. School children who had orthodontic braces, syndromes, or amelogenesis imperfecta were excluded from the study. The affected group was composed of children with at least one tooth affected by MIH or hypomineralization (demarcated opacity) of second primary molars. The comparison group consisted of children who had no teeth with hypomineralization (demarcated opacity).

A structured questionnaire was completed by the children's caregivers to collect socioeconomic data from the population. Prior to the study, the questionnaire was pilot-tested in one school from Curitiba. No modification of the questionnaire was necessary to improve comprehension. Four examiners were previously trained and calibrated to diagnose developmental defects of enamel (DDE), MIH, and dental caries. Molar-incisor hypomineralization was diagnosed based on EAPD criteria (2003) (Weerheijm et al. 2003), and DDE was diagnosed using the modified DDE index (Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. FDI Working Group 1992). For initial training 30 intraoral photographs of DDE and MIH were selected, and the clinical conditions that were associated with this differential diagnosis were defined. Afterward, 60 photographs of different clinical scenarios that involved various manifestations of DDE and MIH were analyzed independently by the examiners. After one week, the examiners independently analyzed the same photographs in a different order (duplicate examination). The clinical examination was then performed in a school environment using artificial light, a dental mirror, a dental probe with a blunt tip, and sterile gauze. Data collection was performed from November 2016 to September 2017.

Cohort from Curitiba, Brazil (Pontifical Catholic University of Paraná):

Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

The sample consisted of 200 individuals affected and non-affected by MIH, enrolled in municipal schools, in Curitiba, in 2018. Of these, 100 cases and 100 controls and a total of 108 females and 92 males were included. This cohort was recruited independently from the cohort recruited by investigators at Federal University of Paraná, however there is a possibility some individuals participated in both studies and data from both groups were always analyzed separately. The inclusion criteria were children between 6 and 10 years of age, affected by MIH in completely erupted teeth. As for exclusion criteria, individuals

undergoing orthodontics treatment or scoring 3, 4, 5 and 6 of ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) were excluded from the study population. Two interviewers were calibrated on MIH diagnosis using photographs according to a previously published criterion (Ghanim et al. 2017).

Cohort from Rio de Janeiro, Brazil:

Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

This sample consisted of 174 males and females, from 7 to 14 (10.13 ± 1.9) years of age, treated at the Paediatric Dentistry Clinic of the Federal University of Rio de Janeiro, who were recruited from July 2015 to April 2017. Individuals were divided into children with MIH (n=78) and without MIH (n=96). The eligibility criteria for this study included patients having all the first permanent molars erupted. The exclusion criteria consisted of children affected by congenital syndromes, enamel defects (hypoplastic lesions, fluorosis, amelogenesis imperfecta or tetracycline stain) and patients undergoing orthodontic treatment.

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

The health aspects were collected through an anamnesis record including the demographic data (child's age, sex, place of birth, residence, parent's education and income), mother health during pregnancy (medications used, severe infections and complications during childbirth), and child medical history (medications, systemic diseases, high fever, malnutrition, asthma, bronchitis, epilepsy, and severe infections). The clinical examination was performed by the calibrated dentist (F.M.F.S).

Examination was carried out using a mirror and a probe, at the dental chair and using artificial light. MIH was evaluated using the European Academy of Pediatric Dentistry (EAPD). Mild MIH cases were considered when the tooth presented demarcated opacity ≥ 1.0 mm, without any loss of structure. Severe cases were defined by teeth affected with a lesion that required treatment, loss of structure, or presence of atypical restorations.

Cohort from Istanbul, Turkey:

Eligibility criteria, calibration of the examiners and data collection

Eligible individuals were enrolled in the Pedodontics Clinics of Istanbul University, Turkey (n = 335, ages ranging from 6 to 12 years). The exclusion criteria included having evidence of a syndrome, fluorosis, or use of a fixed appliance. MIH diagnosis was performed according to the EAPD (European Association of Paediatric Dentistry) criteria. Cases were defined as a subject with MIH phenotype, while controls were defined as subjects with no evidence of MIH (including no evidence of fluorosis).

Calibrated examiners carried out the clinical examination, with the coauthor F.S. having calibrated M.B. and M.K. Exam calibrations were performed according to the following protocol: First, the calibrator presented to the examiner the criteria for MIH detection, showing pictures of several situations to be observed in the exam and discussing each of these situations in a session that lasted one to two hours. Next, the calibrator and examiner(s) examined 10–20 subjects and discussed each case. M.K. pre-screened subjects, and M.B. performed the full exam. This cohort and methodology have been reported before (Jeremias *et al.*, 2013).

Clinical examinations were done with the use of a flashlight and intra-oral mirror. Gauze was used to dry and clean teeth prior to exam. Artificial light and a dental operatory were used for all evaluations. An explorer was gently used for assessing the smoothness of tooth surfaces. White spot lesions were distinguished from developmental enamel defects simply on clinical grounds based on the association of the lesions with areas of mature plaque and location on the tooth (i.e., white lesion appearing to be slightly supragingival, either associated with slight gingival inflammation or healthy gingival tissue, combined with the aspect of the lesion when dry (white chalk looking versus dry). No radiographs were available. Drinking water in the Istanbul region is not artificially fluoridated.

Single marker analysis

The amount of DNA and the purity of each sample was determined by spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, US). The DNA concentration was obtained by readings at 260 nm. In order to estimate the purity, the proportion used was 260 nm / 280 nm. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IRF6* (rs2073487, rs2013162, rs17015215, rs861019, rs642961) and four in *TGFA* were

genotyped (**Table 2**). PCR reactions were carried out using Taqman chemistry (Ranade et al. 2001) in 3.0 μ l reaction volumes in an ABI PRISM Sequence Detection System 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping calls were analyzed using SDS software version 1.7 (Applied Biosystems). PCR reactions were repeated twice when necessary and allele frequencies were calculated.

All SNPs in all samples were tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium using chi-square. Association analyses were performed comparing genotypes to phenotype between affected individuals and their respective comparison group as implemented in the PLINK software (Purcell et al. 2007). Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated. In order to account for multiple testing, Bonferroni correction was performed and *p*-values of 0.001 (0.05/36) or below were considered significant.

Gene-gene interactions

Gene-gene interaction analyses were performed using logistic regression as implemented in PLINK, considering the SNPs as independent variables and MIH a dependent variable seeking for evidence of interaction between *IRF6* and *TGFA*. *P*-values below 0.0004 (0.05/108) were considered statistically significant.

Immunofluorescence

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

Gene-environment interactions

We have tested for potential associations between MIH and factors that affected the children of 5 years of age or older in the cohorts from Curitiba (Federal University of Paraná) and Rio de Janeiro. The variables included respiratory issues, nutrition, intolerance, infection and medications, and were part of the questionnaires obtained for both MIH affected and unaffected children. Analyses were performed using logistic regression as implemented in PLINK. We have complied with the STROBE guidelines in this study.

Results

All markers were in Hardy-Weinberg equilibrium (PLINK threshold p-value below 0.001), with the exception of rs930655 in the sample from Curitiba (Federal University of Paraná) and this SNP was excluded from further analysis (Table 2). We also excluded rs2073487, rs642961 and rs2902345 in the sample from Rio de Janeiro, and rs1523305 and rs2902345 in the sample from Curitiba (Pontifical Catholic University of Paraná). The numbers in bold in Table 2 highlight the distribution of the genotypes deviating from Hardy-Weinberg equilibrium.

Single marker analysis

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

Gene-gene interaction analyses

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

Gene Expression Analysis

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

Environmental factors

No significant associations were identified other than between MIH and medications taken after three years of age (**Table 4**). In the Curitiba cohort (Federal University of Paraná), out of 191 individuals who reported having taken medications, 52 were affected by MIH and 139 were not. In contrast, out of 166 individuals who reported not taking any medications, 36 were affected with MIH and 130 were not. In the cohort from Rio de Janeiro, 35 individuals reported having taken medications and are affected by MIH, 15 reported having taken medications and are not affected by MIH, 43 did not take any medications and are affected with MIH and 81 did not take medications and are not affected by MIH. In both groups we found statistical evidence for an interaction of *IRF6* and *TGFA* genotypes and medication intake at 3 years of age (**Table 4**).

Discussion

We previously suggested that *interferon regulatory factor 6 (IRF6)* and *transforming growth factor alpha (TGFA)* interact in the formation of cleft lip and palate (30) and we hypothesized this interaction might be relevant on the etiology of Molar Incisor Hypomineralization as well, since these two defects apparently may be genetically linked (Letra *et al.*, 2012). We found evidence that this interaction may be relevant only in the cohort from Turkey, which may indicate genetic factors contributing to the formation of MIH may vary depending on geographic origin. This idea is supported by the evidence that MIH frequency vary across the world (Hussain *et al.* 2018; Koruyucu *et al.* 2018b; Saitoh *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2018; Ahmad *et al.* 2019; Davenport *et al.* 2019; Glodkowska and Emerich 2019; Gorbatova *et al.* 2019; Goswami *et al.* 2019; Kilinc *et al.* 2019; Mejia *et al.* 2019; Rai *et al.* 2019; Villanueva-Gutierrez *et al.* 2019; Hartsock *et al.* 2020; Silva *et al.*, 2020). Both MIH and clefts apparently have higher frequencies in the north of Europe and this frequency declines as we travel towards the Mediterranean (Vieira 2006; 2019).

We previously reported an interaction of *TGFBR1* and childhood pneumonia as a possible gene-environment mechanism that increases the chance of occurrence of MIH. Similarly, we reported statistical evidence of potential interaction between genes related to tooth development and immune response (Bussaneli *et al.* 2019). Here we report evidence for both gene-gene (*IRF6-TGFA*) and gene-environment (*IRF6*-medications taken and *TGFA*-medications taken), which supports our hypothesis that MIH is a complex genetic condition (Vieira and Kup 2016). Previous work suggested that MIH is associated with

medication intake although others (reviewed by Silva *et al.* 2016) did not confirm this finding. The use of medications, which is a surrogate for illness, apparently can lead to MIH depending on genetic variation in *IRF6* and *TGFA*. To properly test this hypothesis, the establishment of a cohort of pregnant women that can be prospectively followed from birth to the establishment of the permanent dentition will allow to minimize issues of recall bias and to provide more definitive answers that the currently published literature that used more convenient study designs could not to.

The possible involvement of *IRF6* and *TGFA* with MIH also supports the idea that MIH and cleft lip and palate are linked. We believe isolated cleft lip and palate is actually is a syndrome that involves disturbances of the dentition (Koruyucu *et al.* 2018a) and one line of investigation is to test if genetic variants associated with oral clefts also associate with MIH. We have proposed this approach for isolated tooth agenesis as well (Vieira 2003), and it provided a tool for gene discovery (Vieira *et al.* 2008a; 2008b). *TGFA* and *IRF6* did not show the same pattern of expression in teeth and the mechanism of how they may interact to lead to MIH is yet to be determined.

Among the limitations that we have experienced in this present study are the sample size that may not have allowed the detection of small effect sizes, and that not always we had detailed information about the type of medication the patients took since those were self-reported. In contrast, the strengths of this study include the well characterized phenotype studied here, determined by experienced dentists, and the diverse geographic populations studied. These factors combined increase the confidence in the results obtained. Additional studies to test potential gene-gene interactions in diverse populations are warranted and study designs should aim to obtain a more detailed information about what specific medications are involved in the development of MIH.

In summary, we provided evidence that *IRF6* and *TGFA* are involved with MIH and this effect may become more likely apparent when children have to make use of medications around the age of three years.

Acknowledgements

The authors have no conflict to declare. F.M.F.S. was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro– FAPERJ process E-26/201.745/2019. CAPES supported E.G.C; A.R. was supported by the University of Pittsburgh School of Dental Medicine Dean’s Summer Research program. The work was supported in part by a

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

M.Bezamat, F.M.F.S., E.G.C. and A.R prepared and genotyped the samples. M.Bezamat, B.M.H. performed statistical, and data analyses. B.A. and Y.Y.S. performed the immunohistochemistry. M.Bezamat, A.L., D.S.P., F.S., R.I.W. and A.R.V. participated in the study design. J.F.S., A.L.F., J.A.B., F.M.C., T.C., M.Bayram, L.B. and C.M.S. performed DNA processing and genotyping. M.Bezamat. and A.R.V. wrote the first draft of the manuscript. M.C.C, A.M. and A.R.V. supervised the research. All authors approved the manuscript.

References

Ahmad SH, Petrou MA, Alhumrani A, Hashim R, Splieth C. 2019. Prevalence of molar-incisor hypomineralisation in an emerging community, and a possible correlation with caries, fluorosis and socioeconomic status. *Oral Health Prev Dent.* 17(4):323-327.

Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, Letra A, Scariot R, Silva RM, Weber ML, Bussaneli DG, Trevilatto PC, Almarza AJ et al. 2019. Are mtor and endoplasmic reticulum stress pathway genes associated with oral and bone diseases? *Caries Res.* 53(3):235-241.

Bussaneli DG, Restrepo M, Fragelli CMB, Santos-Pinto L, Jeremias F, Cordeiro RCL, Bezamat M, Vieira AR, Scarel-Caminaga RM. 2019. Genes regulating immune response and amelogenesis interact in increasing the susceptibility to molar-incisor hypomineralization. *Caries Res.* 53(2):217-227.

Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. 1992. A review of the developmental defects of enamel index (dde index). *Int Dent J.* 42(6):411-426.

Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. 2002. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 47(4):281-291.

Davenport M, Welles AD, Angelopoulou MV, Gonzalez C, Okunseri C, Barbeau L, Bansal NK, Vergotine RJ, Hodgson BD. 2019. Prevalence of molar-incisor hypomineralization in milwaukee, wisconsin, USA: A pilot study. *Clin Cosmet Investig Dent.* 11:109-117.

Fatturi AL, Wambier LM, Chibinski AC, Assuncao L, Brancher JA, Reis A, Souza JF. 2019. A systematic review and meta-analysis of systemic exposure associated with molar incisor hypomineralization. *Community Dent Oral Epidemiol.* 47(5):407-415.

Garg N, Jain AK, Saha S, Singh J. 2012. Essentiality of early diagnosis of molar incisor hypomineralization in children and review of its clinical presentation, etiology and management. *Int J Clin Pediatr Dent.* 5(3):190-196.

Ghanim A, Silva MJ, Elfrink MEC, Lygidakis NA, Marino RJ, Weerheijm KL, Manton DJ. 2017. Molar incisor hypomineralisation (mih) training manual for clinical field surveys and practice. *Eur Arch Paediatr Dent.* 18(4):225-242.

Glodkowska N, Emerich K. 2019. Molar incisor hypomineralization: Prevalence and severity among children from northern Poland. *Eur J Paediatr Dent.* 20(1):59-66.

Gorbatova MA, Utkina EI, Zinchenko GA, Grijbovski AM, Popova DA, Popov VA, Gorbatova LN. 2019. [molar-incisor hypomineralization among 12-years old children in arkhangel'sk region]. *Stomatologiya (Mosk).* 98(2):64-66.

Goswami M, Bhushan U, Pandiyan R, Sharma S. 2019. Molar incisor hypomineralization-an emerging burden: A short study on prevalence and clinical characteristics in central Delhi, India. *Int J Clin Pediatr Dent.* 12(3):211-214.

Hartsock LA, Burnheimer J, Modesto A, Vieira AR. 2020. A snapshot of the prevalence of molar incisor hypomineralization and fluorosis in Pittsburgh, Pa., USA. *Ped Dent.* 2020;42(1):3-7.

Hussain G, Al-Halabi M, Kowash M, Hassan A. 2018. The prevalence and severity of molar incisor hypomineralization and molar hypomineralization in Dubai, UAE. *J Dent Child (Chic).* 85(3):102-107.

Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, Pierri RA, Souza JF, Fragelli CM, Paschoal MA et al. 2013. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol.* 58(10):1434-1442.

Kilinc G, Cetin M, Kose B, Ellidokuz H. 2019. Prevalence, aetiology, and treatment of molar incisor hypomineralization in children living in Izmir city (Turkey). *Int J Paediatr Dent.* 29(6):775-782.

Koruyucu M, Kasimoglu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergoz N, Tuna EB, Gencay K, Deeley K, Bussaneli D et al. 2018a. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 125(4):307-312.

Koruyucu M, Ozel S, Tuna EB. 2018b. Prevalence and etiology of molar-incisor hypomineralization (mih) in the city of Istanbul. *J Dent Sci.* 13(4):318-328.

Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, McHenry TG, Lidral AC, Moreno L, Murray JC et al. 2012. Interaction between *IRF6* and *TGFA* genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One.* 7(9):e45441.

Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. 2007. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res.* 86(10):986-991.

Mejia JD, Restrepo M, Gonzalez S, Alvarez LG, Santos-Pinto L, Escobar A. 2019. Molar incisor hypomineralization in colombia: Prevalence, severity and associated risk factors. *J Clin Pediatr Dent.* 43(3):185-189.

Portella PD, Menoncin BLV, de Souza JF, de Menezes J, Fraiz FC, Assuncao L. 2019. Impact of molar incisor hypomineralization on quality of life in children with early mixed dentition: A hierarchical approach. *Int J Paediatr Dent.* 29(4):496-506.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ et al. 2007. Plink: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 81(3):559-575.

Rai PM, Jain J, Raju AS, Nair RA, Shashidhar K, Dsouza S. 2019. Prevalence of molar incisor hypomineralization among school children aged 9 to 12 years in virajpet, karnataka, india. *Open Access Maced J Med Sci.* 7(6):1042-1046.

Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ et al. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 11(7):1262-1268.

Raposo F, de Carvalho Rodrigues AC, Lia EN, Leal SC. 2019. Prevalence of hypersensitivity in teeth affected by molar-incisor hypomineralization (mih). *Caries Res.* 1-7.

Saitoh M, Nakamura Y, Hanasaki M, Saitoh I, Murai Y, Kurashige Y, Fukumoto S, Asaka Y, Yamada M, Sekine M et al. 2018. Prevalence of molar incisor hypomineralization and regional differences throughout japan. *Environ Health Prev Med.* 23(1):55.

Silva FMF, Zhou Y, Vieira FGF, Carvalho FM, Costa MC, Vieira AR. 2020. Defining the prevalence of molar incisor hypomineralization in Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 20:e5146.

Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. 2016. Etiology of molar incisor hypomineralization - a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol.* 44(4):342-353.

Trevilatto PC, Line SR. 2000. Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 18(1):6-9.

Vieira AR. 2003. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 82(3):162-165.

Vieira AR. 2006. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: A huge review. *Am J Epidemiol.* 163(9):790-810.

Vieira AR. 2019. Prevalence of molar incisor hypomineralisation has a north-south gradient between europe and north africa. *Eur Arch Paediatr Dent.* 20(5):501-502.

Vieira AR, Kup E. 2016. On the etiology of molar-incisor hypomineralization. *Caries Res.* 50(2):166-169.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. 2008a. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med.* 10(9):668-674.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. 2008b. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 146A(11):1406-1413.

Villanueva-Gutierrez T, Irigoyen-Camacho ME, Castano-Seiquier A, Zepeda-Zepeda MA, Sanchez-Perez L, Frechero NM. 2019. Prevalence and severity of molar-incisor hypomineralization, maternal education, and dental caries: A cross-sectional study of mexican schoolchildren with low socioeconomic status. *J Int Soc Prev Community Dent.* 9(5):513-521.

Walker SC, Mattick CR, Hobson RS, Steen IN. 2009. Abnormal tooth size and morphology in subjects with cleft lip and/or palate in the north of england. *Eur J Orthod.* 31(1):68-75.

Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, Hallonsten AL. 2003. 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.* 4(3):110-113.

Zhao D, Dong B, Yu D, Ren Q, Sun Y. 2018. The prevalence of molar incisor hypomineralization: Evidence from 70 studies. *Int J Paediatr Dent.* 28(2):170-179.

Table 1. Breakdown of populations used in the study

Population	Total Sample	MIH Affected	MIH Unaffected	Sex	
				Male	Female
Curitiba Federal University of Paraná	356	87	269	187	169
Curitiba Pontifical Catholic University of Paraná	200	100	100	92	108
Rio de Janeiro Universidade Federal do Rio de Janeiro	174	78	96	101	73
Istanbul	355	163	172	171	164
Total	1.065	428	637	551	514

Table 2. Characteristics of the selected variants and genotypic results.

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

Table 3. Summary results of gene-gene interaction analysis between TGFA rs930655 and the other IRF6 markers in the samples from Istanbul.

SN	Allel	Odds Rati	p-value
rs17015215	T	33.94	2.603e-016
rs2013162	A	25.24	2.992e-019
rs861019	A	33.92	1.379e-016
rs2073487	C	24.87	8.509e-019
rs642961	A	39.7	1.842e-015

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

Sample from Curitiba (Federal University of Paraná)					
Gene	SNP	Allele	Odds Ratio	p-value with the genetic influence	p-value of medications and MIH only
<i>IRF6</i>	rs17015215	T	2.49	0.028	0.22
	rs2013162	A	2.33	0.04	
	rs861019	G	2.5	0.026	
	rs2073487	C	2.34	0.04	
	rs642961	A	2.36	0.037	
<i>TGFA</i>	rs2166975	A	2.43	0.032	0.0002
	rs1523305	C	2.3	0.044	
	rs2902345	T	2.4	0.038	
Sample from Rio de Janeiro					
Gene	SNP	A1	Odds Ratio	p-value with the genetic influence	p-value of medications and MIH only
<i>IRF6</i>	rs17015215	T	4.11	0.0009	0.0002
	rs2013162	A	5.16	0.0002	
	rs861019	G	6.86	0.0004	
	rs2073487	T	5.74	1.9e-005	
	rs642961	A	4.72	3.041e-005	
<i>TGFA</i>	rs1523305	C	4.94	5.909e-005	0.0004
	rs2902345	C	3.91	0.0004	

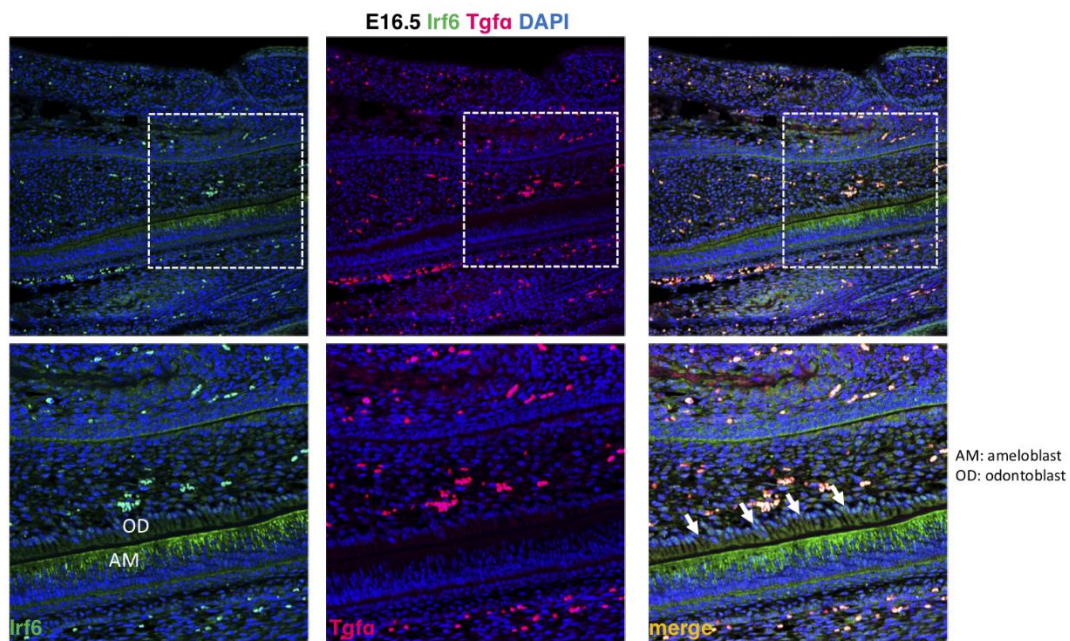


Figure 1. Expression of *Irf6* and *Tgfa* in sagittal sections of E16.5 wild type murine embryos. *Irf6* is expressed in ameloblasts (AM) but not odontoblasts (Raposo et al. 2019), whereas *Tgfa* expression was not detected.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os defeitos no esmalte dentário vem ganhando atenção nos últimos anos e a Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) foi a alteração que mais destacou-se neste cenário. Estudos em relação a prevalência, características clínicas e principalmente sobre os fatores etiológicos têm sido investigados exaustivamente.

O primeiro estudo desta tese buscou avaliar a prevalência da HMI em diferentes regiões do Brasil, através da meta análise com o objetivo de comparar frequência da doença na amostra estudada. O resultado da meta análise mostrou uma alta heterogeneidade dos estudos, isto pode estar associado com os diferentes critérios de diagnóstico, métodos de calibração do examinador e local de coleta. É fundamental conhecer a frequência de uma doença e padronizar os estudos epidemiológicos quanto aos meios de diagnóstico e calibração dos examinadores, fornecendo assim dados mais homogêneos para a população. Os resultados do primeiro estudo foram fundamentais para formular as estratégias e caracterização da amostra para os estudos seguintes.

No segundo estudo avaliamos a interação dos fatores ambientais com a HMI. Foi observada uma associação positiva entre os seguintes fatores: complicações durante a gravidez, complicações no nascimento e uso de medicamentos por crianças nos primeiros anos de vida, o que corrobora a literatura (LAISIS et al., 2009; WHATLING et al., 2008). No entanto, estudos recentes concluíram que nenhum desses fatores ambientais, previamente estudados, explicavam completamente a etiologia desta condição (Silva et al., 2019; Fatturi et al., 2019). Isso pode ser justificado pelo fato da maior parte dos questionários terem sido aplicados anos depois da gestação, o que aumenta as chances de subregistros por viés de memória, e leva a supor que outros fatores etiológicos podem estar associados à HMI.

No terceiro estudo verificamos as possíveis associações dos polimorfismos ligados aos genes ameloblastina (*AMBN*), enamelina (*ENAM*) e calecreína (*KLK4*) com a HMI e a cárie dentária. No que se refere à cárie dentária e HMI, houve associação estatisticamente significativa com o gene *AMBN rs4694075 C>T* no grupo com a HMI e experiência de cárie, o que nos levar a supor que esses pacientes são mais suscetíveis à cárie dentária, não apenas por suas características clínicas, mas também pelas possíveis variações genéticas que os genes relacionados à esta condição podem gerar no indivíduo. Assim, vale ressaltar que, mesmo os pacientes com HMI e baixa experiência de cárie devem ser monitorados

frequentemente devido às mutações nesse gene investigadas. Foi encontrada associação entre HMI e o polimorfismo rs2235091 no gene *KLK4*. Porém, um estudo realizado anteriormente na população brasileira não mostrou associação entre polimorfismos localizados no *KLK4* com a HMI (JEREMIAS et al., 2016). A divergência entre os resultados pode estar associada às características étnicas das amostras, uma vez que a população brasileira é considerada geneticamente heterogênea e esses estudos foram realizados em diferentes cidades no Brasil.

Apesar de existirem dados na literatura de associações entre os polimorfismos localizados nos genes (*AMBN e ENAM*) e a HMI (JEREMIAS et al., 2013), neste estudo não foi observado esta associação. Possivelmente o tamanho amostral não foi suficiente para alcançar resultados estatisticamente significativos, porém, por outro lado, achamos uma forte associação com o gene *KLK4*.

Após uma busca bibliográfica a respeito dos fatores etiológicos da HMI, verificou-se a presença desta condição em pacientes com fissuras labiopalatina (ALLAM et al., 2018; LETRA et al., 2016). Esse fato motivou o estudo de associação entre genes relacionados com fendas orais que apresentavam associação com a HMI (KORUYUCU et al., 2018).

No quarto estudo foi realizado um estudo multicêntrico com amostra brasileira em duas diferentes cidades e em uma amostra turca. Neste estudo foi observada a associação de genes (*IRF6 e TGF α*) ligados a fendas orais com HMI. Além disso, verificamos a influência do uso de medicamentos (nos primeiros anos de vida), potencializando o efeito das variações genéticas no genes investigados. Sendo assim, a HMI pode ser considerada uma condição multifatorial, influenciada tanto por genes quanto por fatores ambientais (gene-ambiente, gene-gene). Esses resultados sugerem que outros genes e/ou alterações bucais podem estar relacionados com a presença de HMI e que estudos em diferentes populações são de extrema importância para a etiologia da Hipomineralização Molar Incisivo.

6. CONCLUSÃO

- A prevalência de HMI na população brasileira foi de 13,48%.
- Fatores ambientais; como complicações durante a gestação e o uso de medicamentos durante os primeiros anos de vida, apresentaram associação com HMI;
- Houve associação dos fatores ambientais tais com o uso de medicamentos, infecções graves e complicações sistêmicas durante o período gestacional e nos primeiros anos de vida na presença de HMI;
- Não houve a influência desses fatores em relação a gravidade da HMI;
- O polimorfismo localizado no gene *KLK4* apresentou associação com a presença de HMI;
- Em relação à experiência de cárie, ocorreu uma tendência estatística nos polimorfismos localizados nos genes *ENAM* e *AMBN*;
- Os polimorfismos localizados nos genes *IRF6* e *TGF α* estão relacionados com o desenvolvimento da HMI;
- Fatores ambientais tais como o uso de medicamentos nos primeiros anos de vida interagiram com os genes *IRF6* e *TGF α* na amostra brasileira nas cidades de Curitiba e Rio de Janeiro, aumentando o risco para o desenvolvimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralization: A systematic review. *European Archives of Paediatric Dentistry* 2010; 11 (2): 53-8.

Allam E, Ghoneima A, Tholpady SS, et al. Enamel hypomineralization in children with clefts and the relationship to treatment: a cross-sectional retrospective study. *Ann Plast Surg.* 2018;81:544–547.

Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, Letra A, Scariot R, Silva RM, Weber ML, Bussaneli DG, Trevilatto PC, Almarza AJ, Ouyang H, Vieira AR. Are mTOR and endoplasmic reticulum stress pathway genes associated with oral and bone diseases? *Caries Res* 2019;53(3):235-241.

Bussaneli DG, Restrepo M, Fragelli CMB, Santos-Pinto L, Jeremias F, Cordeiro RCL, Bezamat M, Vieira AR, Scarel-Caminaga RM. Genes regulating immune response and amelogenesis interact in increasing the susceptibility to molar-incisor hypomineralization. *Caries Res* 2019;53(2):217-227.

Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent* 2009;19(2):73-83.

da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro RC, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *Int J Paediatr Dent.* 2010 Nov;20 (6):426-34. [https:// doi.org/ 10.1111/j.1365-263X.2010.01097.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2010.01097.x).

Da Silva FMF, Zhou Y, Vieira FGF, Carvalho FM, Costa MC, Vieira AR. 2020. Defining the prevalence of molar incisor hypomineralization in Brazil. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 20:e5146.

Elfrink ME, Ten Cate JM, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Veerkamp JS. Deciduous molar hypomineralization and molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2012 Jun; 91(6):551-5.

Fatturi AL, Wambier LM, Chibinski AC, Assunção LRS, Brancher JA, Reis A, Souza JF. A systematic review and meta-analysis of systemic exposure associated with molar incisor hypomineralization. *Community Dent Oral Epidemiol* 2019;47(5):407-415.

Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int.* 1993;53(4):257–261. doi:10.1007/bf01320911.

Ghanim A, Silva MJ, Elfrink MEC, Lygidakis NA, Marino RJ, Weerheijm KL, Manton DJ. 2017. Molar incisor hypomineralisation (mih) training manual for clinical field surveys and practice. *Eur Arch Paediatr Dent.* 18(4):225-242.

Gutierrez S, Torres D, Bricenõ I, Gomez AM, Baquero. Clinical E. molecular analysis of the enamel gene ENAM in Colombian families with autosomal dominant amelogenesis imperfecta. *Genetics and Molecular Biology* 2012; 35(3):557–66.

Hanan SA, de Oliveira Alves Filho A, Medina PO, Cordeiro RdCsL, Santos-Pinto L, Zuanon ÂCC. Molar-Incisor Hypomineralization in Schoolchildren of Manaus, Brazil. *Pesqui. bras. odontopediatria clín. Integr.* 2015 Oct; 15(1):309-317.

Jälevik B. Pre Valence and diagnosis os molar-incisor-hypomineralition (MHI): A SYSTEMACTIC REVIEW. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010; 11:59-64.

Jedeeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol.* 2013;183(1):108–118. doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.004

Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler CE, Bayram. M, Tuna BE, Deeley K, Pierri A Souza J, Fragelli MB, Paschoal AB, Koray GF, Seymen, MS, Caminaga LP, Vieira AR. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Archives of oral biology* 2013; 58:1434–1442.a

Jeremias F, Ricardo AG, Pierre JF, Souza CMB, Fragelli MRLS, Finoti DG, Bussaneli RCL, Cordeiro RS. Maurer-Morelli VC, Scarel-Caminaga RM, Lourdes SP. Family-Based Genetic Association for Molar-Incisor Hypomineralization . *Caries Res* 2016; 50:310–318.b

Koch G, Hallonsten AL, Ludvigsson N, Hansson BO, Holst A, Ullbro C. Epidemiologic study of idiopathic enamel hypomineralition in permanent teeth of Swedish children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1987; 15 (5):279-85.

Koruyucu M, Kasimoğlu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergöz N, Tuna EB, Gencay G, Deeley K, Bussaneli D, Modesto A, Vieira AR. Rethinking isolated

cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018; 125(4):307-312.

Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicilin may cause molar incisor hypomineralization. *Jdent Res.*2009; 88:132-6.

Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res* 2007;86(10):986-991.

Loos BG, John RP, Laine ML Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6): 159-79.

Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou AM, Alaluusua S, Espelid I. Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor- Hypomineralisation (MIH): An EAPD Policy Document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010; 11(2):75-81.

Ozgül BM, Saat S, Sönmez H, Oz FT. Clinical evaluation of desensitizing treatment for incisor teeth affected by molar-incisor hypomineralization. *J Clin Pediatr Dent* 2013; 38 :101-5.

Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, Dey R, Cho MII. The amyloid protein Apin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur. J. Oral Sci., Copenhagen*, v. 115, no. 2, p. 153-160, Apr. 2007.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559-575.

Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ et al. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 11(7):1262-1268.

Schmalfluss A, Stenhagen KR, Tveit AB, Crossner CG, Espelid I. Canines are affected in 16-year-olds with molar-incisor hypomineralisation (MIH): an epidemiological study based on the Tromsø study: "Fit Futures". *Eur Arch Paediatr Dent.* 2016 Apr; 17(2):107-13.

Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000; 58(4):250–264. doi:10.1034/j.1399 0004.2000.580402.x

Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *International Dental Journal* 1997; 47(3):173–82.

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):342-353.

Soviero V, Haubek D, Trindade C, Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their squeals in permanent first molars and incisor in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand.* 2009 Jan; 67: 170-175.

Tourino LF, Correa-Faria P, Ferreira RC, Bendo CB, Zarzar PM, Vale MP. Association between Molar Incisor Hypomineralization in Schoolchildren and Both Prenatal and Postnatal Factors: A Population-Based Study. *PLoS One.* 2016 Jun 9;11 (6):e0156332. [https://doi/ 10.1371/journal.pone.0156333](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156333).

Trevilatto PC, Line SR. 2000. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 18(1):6-9.

Vieira AR, Kup E. On the etiology of molar-incisor hypomineralization. *Caries Res* 2016;50(2):166-169.

Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-Mchernry T. Genome- wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008; 87(5):435-9.

Walker SC, Mattick CR, Hobson RS, Steen IN. Abnormal tooth size and morphology in subjects with cleft lip and/or palate in the north of England. *Eur J Orthod* 2009;31(1):68-75.

Weerheijm KL, Duggal M, Majáre I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens HC, 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: 110-3.

Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update.* 2004; 31:9-12.

Werheijm KL, Jälevik B, Alaluusua S. Molar –Incisor Hypomineralisation. *Caries Res.* 2001; 35(5):390-1.

Whatling R, Fearn JM. Molar incisor hypomineralization : a study of aetiological factors in a group of UK children . *Int J PaedDent.* 2008; 18:155-62.

Wogelius P, Poulsen S, Sørensen HT. Prevalence of dental anxiety and behavior management problems among six to eight years old Danish children. *Acta Odontol Scand.* 2003 Jun;61(3):178-83.

8. ANEXO

Anexo A - Comitê de ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERCEPÇÃO ESTÉTICA DAS ALTERAÇÕES DE OPACIDADE DO ESMALTE DENTÁRIO E SUA SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

Pesquisador: Fernanda Mafei Felix da Silva

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 2

CAAE: 44598514.7.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.130.443

Data da Relatoria: 02/07/2015

Apresentação do Projeto:

Protocolo 116-15. Respostas recebidas em 19.6.2015.

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer substanciado no 1.088.096, exarado em 31/05/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer substanciado no 1.088.096, exarado em 31/05/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer substanciado no 1.088.096, exarado em 31/05/2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver parecer substanciado no 1.088.096, exarado em 31/05/2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sobre o TCLE:

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 21.941-913	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO		
Telefone: (21)3938-2480	Fax: (21)3938-2481	E-mail: cep@hucff.ufrj.br	

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 1.130.443

1) No arquivo intitulado TCLE - Termo Consentimento Livre e Esclarecido (responsável participante da pesquisa).doc anexado em 24/4/2015, consta o horário errado de funcionamento do CEP (8 às 16 h). Solicita-se adequação.

Resposta: Foi corrigido o horário de funcionamento do Comitê de Ética para o horário de 08:00 as 16:00 horas. Além disso foi corrigido nos termos consentimento e assentimento no projeto detalhado.

Análise: Pendência atendida.

2) No arquivo intitulado TCLE - Termo Consentimento Livre e Esclarecido (responsável participante da pesquisa).doc anexado em 24/4/2015, O texto é de difícil compreensão e os termos "alteração genética", "fluorose dentária" e "gene", devem ser revistos, a fim de facilitar a compreensão dos sujeitos. Solicita-se adequação.

Resposta: Os termos alteração genética foi removido e colocado transmissão de pais para filhos , Fluorose dentária modificada para um defeito de cor e forma do dente devido a ingestão de pasta de dente com flúor na infância e a palavra genes foi removido. Essas alterações foram realizados nos 1, 2 e 3 parágrafos. Também foi realizado as modificações nos termos de consentimento e assentimento presente no projeto detalhado.

Análise: Pendência atendida.

Termo de Assentimento:

1) No arquivo intitulado Tale Termo de Assentimento.doc anexado em 24/4/2015, no item Pesquisa, o pesquisador relata que "Durante o atendimento do seu filho....", "Posteriormente seu filho irá responder o mesmo...", etc. Sugere-se trocar para "Durante o seu atendimento....", "Posteriormente você irá responder o mesmo...", já que o termo é direcionado para a própria criança/adolescente. Solicita-se adequação.

Resposta: No arquivo intitulado Tale Termo de Assentimento.doc anexado, foi feitos as correções foi realizadas colocando paciente com primeira pessoa. O texto foi direcionado para criança / adolescente.

Análise: Pendência atendida.

2) No arquivo intitulado Tale Termo de Assentimento.doc anexado em 24/4/2015, consta o horário errado de funcionamento do CEP (8 às 16 h). Solicita-se adequação.

Resposta: Foi corrigido o horário de funcionamento do Comitê de Ética para o horário de 08:00 as

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 1.130.443

16:00 horas. Além disso foi corrigido nos termos consentimento e assentimento no projeto detalhado.
Análise: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos.
2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

RIO DE JANEIRO, 30 de Junho de 2015

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

ANEXO B

PROTOCOLO PARA A EXTRACAO DE DNA

1. Colocar as amostras na incubadora a 50°C por no mínimo 1 hora (podendo ficar overnight).
2. Transferir 500µL de saliva para um tubo de micro centrífuga esterelizado de 1.5mL (Eppendorf). O excedente da amostra congelar a -20°C
3. Adicionado para cada 500µL de saliva 20µL da proteinase Oragene Purifier (OG-L2P) e deixar no vortex por 5 segundos;
4. Deixar as amostras incubadas no gelo por 10 minutos e em seguida, centrifugar em temperatura ambiente por 5 minutos a 13,000 RPM (15,000 x g);
5. Transferir o sobrenadante para um novo eppendorf, e adicionado 500µL de etanol a 95 - 100%, misturar 10 vezes por inversão e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos para completar a precipitação da molécula de DNA
6. Colocar o tubo na centrifuga por 2 minutos em 13,000rpm e descartar o sobrenadante.
7. Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm e deixar por 30 minutos com a tampa aberta na bancada com proteção de vidro.
8. Adicionar 100 µL de TE (10mm tris-hcl + 1mm edta, ph 8.0) para dissolver o pellet (dna).
9. Deixar no vortex por 5 segundos.
10. Deixar em temperatura ambiente overnight tampado na bancada com proteção de vidro no suporte.
11. No dia seguinte estocar no freezer

9. APÊNDICE

Apêndice A



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Odontologia
Departamento Odontopediatria e Ortodontia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCLE (Autorização do menor para participar da pesquisa)

Título da pesquisa: Percepção estética das alterações de opacidade do esmalte dentário e a sua susceptibilidade genética. ” (Percepção estética das alterações de cor e forma do dente e a sua probabilidade genética) **Prezado Senhor (ª):** Seu filho está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre percepção estética dos dentes afetados ou não com hipomineralização molar e incisivo e fluorose dentária e verifica as possíveis causas.

Objetivo: Existem estudos que mostram que alteração genética pode estar relacionada com defeitos na cor e forma dos dentes. Um desses defeitos é conhecido como fluorose dentária e hipomineralização molar incisivo (HMI) (manchamento nos dentes), essas alterações são irreversíveis. Nosso estudo pretende verificar se algum gene responsável pela formação do esmalte dentário (dente) poderia aumentar probabilidade à fluorose e à hipomineralização molar incisivo, além disso, observar o nível de satisfação estética das crianças (seus filhos) e seus responsáveis (pais) com aparência dos dentes das crianças.

Pesquisa: O estudo será realizado na Clínica de Odontopediatria do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Durante o atendimento do seu filho nesta pesquisa, nenhum procedimento (atitudes dos dentistas durante o atendimento) novo será realizado, pois todos eles estão baseados na literatura já existente, reconhecido na odontologia. Além dos exames de costume (exame clínico) que será realizado apenas no seu filho, será realizada coleta de saliva (você e seu filho irão cuspir em um potinho) e preenchimento de um questionário com dados sócios econômicos, conhecimentos sobre a saúde bucal, produtos higiene bucal e sobre o nível de satisfação com a aparência dental de seu filho que será preenchido por você. Posteriormente seu filho irá responder o mesmo questionário sobre nível de satisfação estética do dente dele (cor e forma). Para participação desse estudo seu filho deverá ter entre 07 a 14 anos com ou/ sem fluorose e hipomineralização molar incisivo.

Toda a documentação (ficha clínica da criança e os respectivos questionários) será analisada e fará parte de uma ficha clínica da criança, sendo futuramente arquivada no Departamento Ortodontia e Odontopediatria. A saliva coletada (seu cuspe e do seu filho que foi obtido e colocado no potinho para guarda-lo) após a análise será jogada fora.

Riscos: Os riscos envolvidos na pesquisa são todos aqueles relacionados à obtenção dos dados, tais como desconfortos durante a entrevista ou durante as avaliações e exames clínicos do paciente da criança (desconforto pela luz do equipamento, pela manipulação da boca e suas partes, desconforto devido ao uso de jato de água e ar, desconforto com o uso do instrumental (espelho e sonda) e o constrangimento de cuspir em um recipiente

Benefícios: Um melhor entendimento dos fatores que podem estar relacionados com as alterações de cor e forma do dente (fluorose e hipomineralização molar e incisivo). Você e seu filho irão receber instruções sobre higiene oral. O paciente (seu filho) será submetido à aplicação de flúor. Aqueles pacientes (crianças (seu filho) que apresentar necessidade de tratamento odontológico) serão encaminhados para clínica de odontopediatria da Faculdade de Odontologia/UFRJ. Este é um projeto de pesquisa e não uma forma de tratamento.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso a pesquisadora responsável, Fernanda Mafei Felix da Silva pelos telefones (21)981712812 ou (21)37382098, (21)39382101, ou no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco 325 1 andar departamento de Ortodontia e Odontopediatria Faculdade de Odontologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: Você e seu filho não são obrigados(as) a participar deste projeto e este consentimento pode ser retirado a qualquer momento, sem penalidade. Assim, se quiser desistir, basta comunicar a pesquisadora e, então, você e seu filho continuarão tendo as instruções de higiene oral e em caso do seu filho (criança) precisar de tratamento ou estiver em tratamento, terá continuidade.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: As informações obtidas durante a pesquisa serão apenas utilizadas por membros da equipe do projeto, mantendo-se em caráter confidencial e de total sigilo. Os dados obtidos serão utilizados apenas para elaborar artigos científicos. Cada participante somente poderá ter acesso aos próprios resultados.

Despesas e compensações: Todos os procedimentos serão gratuitos, sem nenhum custo ao paciente. As despesas, assim por ventura ocorrer, serão de responsabilidade do pesquisador da pesquisa. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação. **Dúvidas e questionamentos:** A qualquer momento você poderá requerer mais

informações da pesquisa. Em casos de dúvidas entre em contato com responsável da pesquisa Dra. Fernanda Mafei Felix da Silva, pelo telefone (21) 39382098, (21) 981712812 ou no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 1 andar departamento de Odontopediatria - cidade Universitária Faculdade de Odontologia- Rio de Janeiro. Diante de qualquer dúvida a respeito dos direitos e deveres como participante da pesquisa ou caso tenha alguma dificuldade em entrar em contato com o pesquisador ou sobre a ética da pesquisa o participante pode entrar em contato com Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho /HUCFF/UFRJ, pelo telefone (21) 39382480, Fax (21) 39382481 pelo e-mail CEP@hucff.ufrj.br ,ou endereço Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco , 255 1 andar Cidade Universitária- Ilha do Fundão , Rio de Janeiro / RJ , horário de funcionamento de segunda à sexta , das 8h às 15h. Informamos que este termo de consentimento livre e esclarecido deve ser redigido e assinado pelo participante da pesquisa e representante legal da criança/adolescentes, pelo pesquisador responsável da pesquisa. Um registro de sua participação nesta pesquisa será mantido, mas de forma confidencial, através do uso de códigos numéricos e arquivos fechados. Todos os resultados serão publicados em literatura científica especializada.

Consentimento

Eu, _____
 acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, autorizo e estou ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Rio de Janeiro, _____ / _____ / _____

Nome

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Apêndice B



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Odontologia
Departamento Odontopediatria e Ortodontia

Termo de Assentimento

TALE (Consentimento do menor)

Título da pesquisa: Percepção estética das alterações de opacidade do esmalte dentário e a sua susceptibilidade genética. ” (Percepção estética das alterações de cor e forma do dente e a sua probabilidade genética). **Você** (ª) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre percepção estética dos dentes afetados ou não com hipomineralização molar - incisivo e fluorose dentária e verifica as possíveis causas.

Objetivo: Existem estudos que mostram que alteração genética pode estar relacionada com defeitos na cor e forma dos dentes. Um desses defeitos é conhecido como fluorose dentária e hipomineralização molar incisivo (HMI) (manchamento nos dentes), essas alterações são irreversíveis. Nosso estudo pretende verificar se algum gene responsável pela formação do esmalte dentário (dente) poderia aumentar probabilidade à fluorose e hipomineralização molar incisivo, além disso observar o nível de satisfação estética das crianças (seus filhos) e seus responsáveis (pais) com aparência dos dentes das crianças.

Pesquisa: O estudo será realizado na Clínica de Odontopediatria do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Durante o seu atendimento nesta pesquisa, nenhum procedimento (atitudes dos dentistas durante o atendimento) novo será realizado, pois todos eles estão baseados na literatura já existente, reconhecido na odontologia. Além dos exames de costume (exame clínico), será realizada coleta de saliva (você e seu pai/ mãe irão cuspir em um potinho) e preenchimento de um questionário com dados sócios econômicos, conhecimentos sobre a saúde bucal, produtos higiene bucal e sobre o nível de satisfação com a aparência dental de seu filho que será preenchido por você. Posteriormente, seu filho irá responder o mesmo questionário sobre nível de satisfação estética do dente dele (cor e forma). Para participação desse estudo seu filho deverá ter entre 07 a 14 anos com ou/ sem fluorose e hipomineralização molar incisivo.

Toda a documentação (ficha clínica da criança e questionários seu e dos seus filhos) será analisada e fará parte de uma ficha clínica da criança, sendo futuramente arquivada no Departamento Ortodontia e Odontopediatria. Menos a saliva coletada (seu cuspe e do seu filho que foi obtido e colocado no potinho para guardar o cuspe) após a análise será jogada fora. **Riscos:** Os riscos envolvidos na pesquisa são todos aqueles relacionados à obtenção dos dados, tais como desconfortos durante a entrevista ou durante as avaliações e exames clínicos do paciente da criança (desconforto pela luz do equipamento, pela manipulação da boca e suas partes, desconforto devido ao uso de jato de água e ar, desconforto com o uso do instrumental (espelho e sonda) e o constrangimento de cuspir em um recipiente

Benefícios: Um melhor entendimento dos fatores que podem estar relacionados com as alterações de cor e forma do dente (fluorose e hipomineralização molar e incisivo). Você e seu responsável irão receber instruções sobre higiene oral. O paciente (seu filho) será submetido à aplicação de flúor. Aqueles pacientes (crianças (seu filho) que apresentarem necessidade de tratamento odontológico) serão encaminhados para clínica de odontopediatria da Faculdade de Odontologia/UFRJ. Este é um projeto de pesquisa e não uma forma de tratamento.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso a pesquisadora responsável, Fernanda Mafei Felix da Silva pelos telefones (21)981712812 ou (21)37382098, (21) 39382101, ou no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco 325 1 andar departamento de Ortodontia e odontopediatria Faculdade de Odontologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: Você e seu filho não são obrigados (a) a participar deste projeto e este consentimento pode ser retirado a qualquer momento, sem penalidade. Assim, se quiser desistir, basta comunicar a pesquisadora e você e seu filho continuarão recebendo as instruções de higiene oral e em caso do seu filho (criança) precisar de tratamento ou estiver em tratamento, terá continuidade. **Direito de confidencialidade e acessibilidade:** As informações obtidas durante a pesquisa serão apenas utilizadas por membros da equipe do projeto, mantendo-se em caráter confidencial e de total sigilo. Os dados obtidos serão utilizados apenas para elaborar artigos científicos. Cada participante somente poderá ter acesso aos próprios resultados. **Despesas e compensações:** Todos os procedimentos serão gratuitos, sem nenhum custo ao paciente. As despesas, assim por ventura ocorrer, serão de responsabilidade do pesquisador da pesquisa. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.

Dúvidas e questionamentos: A qualquer momento você poderá requerer mais informações da pesquisa. Em casos de dúvidas entre em contato com responsável da pesquisa Dra. Fernanda Mafei Felix da Silva, pelo telefone (21) 39382098, (21) 981712812 ou no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 1 andar departamento de odontopediatria - cidade Universitária Faculdade de Odontologia- Rio de Janeiro. Diante de qualquer dúvida a respeito dos direitos e deveres como participante da pesquisa ou caso tenha alguma dificuldade em entrar em contato com o pesquisador ou sobre a ética da pesquisa, o participante pode entrar em contato com Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho /HUCFF/UFRJ, pelo telefone (21) 39382480, Fax (21) 39382481 pelo e-mail CEP@hucff.ufrj.br, ou endereço Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, 255 1 andar Cidade Universitária- Ilha do Fundão, Rio de Janeiro/RJ, horário de funcionamento de segunda a sexta, das 8h as 15h. Informamos que este termo de consentimento livre e esclarecido deve ser redigido e assinado pelo participante, pelo representante legal da criança/adolescente e pelo pesquisador responsável da pesquisa. Um registro da participação da criança/adolescente nesta pesquisa será mantido, mas de forma confidencial, através do uso de códigos numéricos e arquivos fechados. Todos os resultados serão publicados em literatura científica especializada

Consentimento

Eu, _____ acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, autorizo e estou ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Rio de Janeiro, _____ / _____ / _____

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador

Apêndice C**Ficha de anamnese**

Faculdade Federal do Rio de Janeiro
 Faculdade de Odontologia
 Departamento Odontopediatria e Ortodontia

Prontuário N^o: _____

Nome do paciente: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone (contato): _____ Telefone celular _____

Data de nascimento: _____ Etnia branco () Pardo () Negro ()

Nome do pai: _____ Idade: ____ Profissão _____

Nome da mãe: _____ Idade: ____ Profissão: _____

HISTÓRIA MÉDICA

1) O paciente é portador de alguma síndrome? () Sim () Não

Sim, qual? _____

2) Apresentou alguma alteração durante a gravidez? () Sim () Não Qual? _____

3) Fez uso de alguma medicação () Sim () Não _____

4) Alguma intercorrência durante o parto? () Sim () Não Qual?

5) Seu filho já foi hospitalizado? () Sim () Não

Por quê? _____ Quando? _____

6) Seu filho é prematuro? () Sim () Não Quando tempo na incubadora? _____

7) Utilizou algum medicamento durante a primeira infância diariamente? () Sim () Não.

Qual? _____

8) Possui alguma das desordens abaixo? _____

Diabetes Sim () Não () Alergia Sim () Não () Insuficiência hepática Sim () Não ()

Cardiopatia Sim () Não () Epilepsia Sim () Não () Febre reumática Sim () Não ()

Insuficiência renal Sim () Não () Câncer Sim () Não () Asma/Bronquite Sim () Não

()

ANEXO D**Ficha de exame Clínico****Identificação do paciente**

Nome: _____

Telefone: _____

Sexo: _____

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Diag																
Diag																
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
				85	84	83	82	81	71	72	73	74	75			

Condição Dental Permanente e Decíduo

0= hígido

2= restaurado com cárie

4= perdido por cárie

6= selante

8=erupcionado

1= cariado

3= restaurado sem cárie

5= perdido por outras razões

9= Trauma

10= Apinhamento anterior

Ficha para Diagnostico Hipomineralização Molar Incisivo (HMI)

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Diag																
Diag																
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Classificação nível gravidade

Leve = L; sem fratura de esmalte, opacidades demarcadas (branca ao amarelo)

Grave= G; com fratura de esmalte, presença de restauração, necessidade de tratamento