

ASPECTOS CLÍNICOS, PRÉ-, PERI- E PÓS-NATAIS E GENÉTICA FAMILIAR EM HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO – RELATO DE CASO

CLINICAL, PRE-, PERI- AND POSTNATAL ASPECTS AND FAMILY GENETICS IN MOLAR INCISOR HYPOMINERALIZATION – A CASE REPORT

Kelly da Silva Rodrigues¹; Maysa Ferreira Veiga Sarmiento¹; Ana Luiza Meneguci Moreira Franco^{2,3}; Flávia Martinez de Carvalho²; Fernanda Mafei Felix da Silva⁴; Marcela Baraúna Magno^{4,5}

¹ Acadêmicos de Odontologia da Universidade Salgado de Oliveira, Campus Niterói. silva.ksr@gmail.com; maysamfvs@outlook.com

² Laboratório de Epidemiologia de Máformações Congênitas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Flaviamartinez2003@gmail.com

³ Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro. analuizameneguci@gmail.com

⁴ Pós doutoranda do departamento de Odontopediatria, Universidade Federal do Rio de Janeiro. fernanda.mafei@gmail.com

⁵ Professora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Veiga de Almeida. marcela.magno@hotmail.com

Autor correspondente:

Marcela Baraúna Magno

R. Ibituruna, 108 - Maracanã, Rio de Janeiro - RJ, 20271-020
(21) 2574-8888

macela.magno@hotmail.com

Fonte financiadora: Pesquisa parcialmente financiada pelo projeto Faperj E-202.036\2020, E- 26\202.334\2019 e CNPq :573993/2008-4.(INAGEMP).

Conflito de interesse: Os autores não apresentam conflito de interesse.

Transferência de direitos autorais: Todos os autores concordam com o fornecimento de todos os direitos autorais a Revista Ciência e Odontologia.

Contribuição dos autores: Cada autor listado no manuscrito avaliou e aprovou o envio desta versão e assume total responsabilidade pelo manuscrito. Todos os autores fizeram contribuições substanciais para o trabalho: KSR e MFVS trabalharam no atendimento clínico, coleta de material e redigiram o manuscrito inicial. FMFS, ALMMF e FMC colaboraram nas análises genéticas, MBM concebeu as ideias, orientação em clínica e revisou criticamente o manuscrito.

RESUMO

A Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) consiste num defeito qualitativo do esmalte dental caracterizado por lesões que variam de cor branca a marrom e que acomete, principalmente, os primeiros molares e incisivos permanentes. Sua etiologia está relacionada a fatores genéticos e ambientais. O método de estudo de associação em que se utiliza o polimorfismo como marcador para localização de genes candidatos a doenças tem sido comumente empregado na busca de evidências que relacionam a HMI a fatores genéticos. O objetivo deste trabalho é relatar aspectos clínicos, pré, peri e pós-natais de

uma paciente de 21 anos diagnosticada com HMI, além de realizar avaliação clínica e genética (polimorfismos no gene *ENAM*) familiar. Foi realizada avaliação clínica dos pais e coleta de material biológico (saliva) para avaliação e análise do DNA familiar. O pai foi diagnosticado com HMI enquanto a mãe não. As amostras coletadas foram analisadas em PCR em tempo real, sendo genotipado o polimorfismo rs7664896 (C>G) localizado no gene *ENAM*. A paciente apresentou genótipo CG com herança da condição pelo pai. A paciente apresentou genótipo CG com herança da condição pelo pai. Pode-se inferir a interação entre aspectos ambientais e genéticos na etiologia da HMI

da paciente do presente relato. Estudos com amostras maiores, de diferentes etnias e com avaliação de diferentes genes são estimulados para aumentar a robustez das evidências científicas.

Palavras-chave: Hipomineralização molar; Esmalte dental; Teste genético; Etiologia

ABSTRACT

Molar Incisor Hypomineralization (MIH) is a qualitative defect of dental enamel characterized by a white to brown defect that affects mainly the first permanent molars and incisors. Its etiology is related to genetic and environmental factors. The association association method in which polymorphism is used as a marker of candidate genes for diseases commonly found in the search for study to study that relate HMI to genetic

factors. This study aimed to report clinical, pre, and postnatal aspects of a 21-year-old patient diagnosed with HMI, in addition to performing a familial genetic evaluation (ENAM gene polymorphisms). Due to the collection of samples and analysis of a large amount of materials requested for evaluation and biological analysis. The samples were collected in real-time PCR, and the rs7664896 polymorphism located in the gene was genotyped. It was inferred that one patient had a CG genotype with inheritance of the condition by the father. It is possible to infer the interaction between environmental and genetic aspects in the genetics of the patient's HMI. Studies with major ethnicities, studies of different ethnicities and evaluation of different genes are for increasing and larger ethnicities, studies of scientific differences.

Keywords: Molar hypomineralization; dental enamel; Genetic testing; Etiology.

ENVIADO: 03/23
ACEITO: 06/23
REVISADO: 07/23

INTRODUÇÃO

O esmalte dental é o tecido mais mineralizado do corpo humano, seu processo de formação é considerado altamente complexo, ocorrendo em duas fases - secreção e maturação - por meio da atividade celular dos ameloblastos^{1, 1}. Durante a fase de secreção os ameloblastos sintetizam e secretam as proteínas da matriz do esmalte, enquanto na fase de maturação os ameloblastos tornam-se responsáveis pela degradação e mineralização dessa matriz. Distúrbios ocorridos durante a fase de secreção podem levar restrições nos prolongamentos dos cristais de esmalte e resultar em defeitos morfológicos quantitativos, caracterizados clinicamente como um esmalte de espessura fina ou hipoplásico, enquanto aqueles ocorridos durante a maturação podem gerar defeitos morfológicos qualitativos, caracterizados por opacidades ou hipomineralizações do esmalte^{1; 42 33}.

Dentre os defeitos de desenvolvimento

do esmalte, a Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) é classificada como um defeito de origem qualitativo do esmalte dental 9 e caracterizada por opacidades demarcadas bem definidas, com margens assimétricas e coloração que varia do branco/creme ao amarelo/marrom, alteração de translucidez e superfície porosa^{45,5}. Esta condição afeta de um a quatro primeiros molares permanentes, podendo ou não afetar os incisivos permanentes^{45,5}. Com menos frequência, pode ser identificada em outros dentes (caninos e pré-molares) e, quando afeta os segundos molares decíduos é denominada Hipomineralização Segundos Molares Decíduos (HSMD)⁸.

A etiologia da HMI é considerada multifatorial e seu estudo representa um grande desafio, tendo em vista a dificuldade na identificação dos fatores que podem sensibilizar os ameloblastos na fase de maturação. Fatores genéticos e sistêmicos, como complicações nos períodos pré, peri e pós-natal (doenças das vias respiratórias superiores, asma, otite, amigdalite,

doenças gastrointestinais, desnutrição, varicela, sarampo e rubéola) são associados a etiologia da HMI, no entanto, a existência de evidências científicas que comprovem e permitam um melhor entendimento desses fatores desencadeadores ainda são insuficientes^{6,1,27,28}.

Estudos genéticos são fundamentais para o avanço no conhecimento sobre a etiologia de determinadas doenças e, no contexto da HMI, surge como uma ferramenta importante uma vez que, de forma similar a outras estruturas ectodérmicas, a odontogênese é um processo regulado por uma interação tecidual ditada por mediadores genéticos e envolve mecanismos auto organizados e integrados^{32,39,23}. Um método muito empregado é o estudo de associação, em que se utiliza o polimorfismo como marcador para localização de genes candidatos a doenças. O polimorfismo genético pode ser definido como a existência de diferentes alelos de um gene em uma população humana como resultado de mutações no DNA. Muitas variantes são encontradas no genoma humano devido a variantes decorrentes de deleções, inserções, substituições 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 (em inglês, single nucleotide polymorphism - SNP)³⁵.

Recentemente, estudos relataram a associação entre a HMI e variantes genéticas localizada nos genes envolvidos nas fases da amelogênese (*ENAM*, *AMBN*, *KLK4*, *MMP20*,

AMTN, *AMELX*)^{20,23,3}. Dentre esses pode-se destacar: a enamelina (*ENAM*) localizada no cromossomo 4 (4q13.3) responsável pela organização da estrutura e mineralização do esmalte¹². O presente trabalho tem como objetivo relatar aspectos clínicos, pré, peri- e pós-natais de uma paciente com 20 dentes afetados com HMI, bem como avaliação clínica e genética (polimorfismos no gene *ENAM*) familiar (paciente, mãe e pai). O guia de reporte CARE foi utilizado na descrição do relato de caso¹³.

RELATO DE CASO

Paciente N.N.B do gênero feminino, brasileira, 21 anos de idade, foi atendida na clínica Odontológica da Universidade Salgado de Oliveira, Campus Niterói. A paciente procurou atendimento para consulta de rotina. Ao exame clínico foi observado mancha de coloração branca no terço incisal/oclusal da face vestibular e/ou palatina dos dentes 14, 15, 17, 23, 24, 25, 26, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44, 45, 47, manchas de coloração marrom na face vestibular e/ou oclusal dos dentes 16, 27, 46 fratura pós eruptiva em ponta de cúspide do dente 16 e restauração atípica no dente 46. A paciente apresentava higiene oral satisfatória, sem lesões de cárie e sem relato de hipersensibilidade dentinária. A Figura 1 mostra imagens clínicas e a figura 2 representa um odontograma dos achados clínicos da paciente N.N.B.

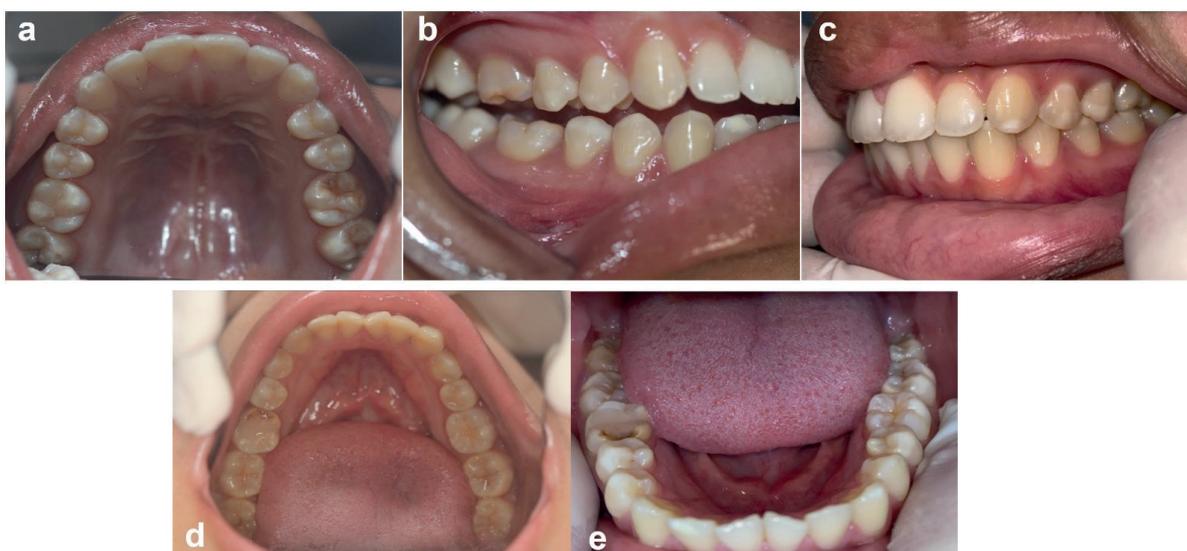


Figura 1. Aspecto clínico intraoral da paciente.

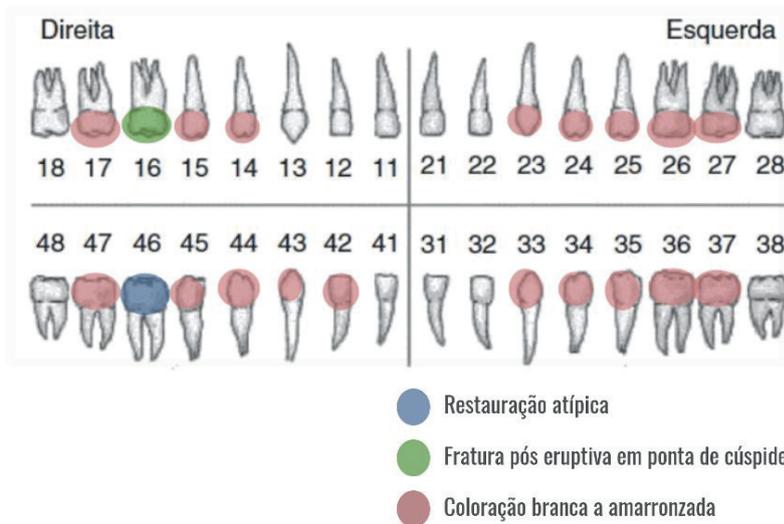


Figura 2. Odontograma da paciente.

Durante a anamnese, a mãe da paciente relatou ter tido complicações durante a gravidez (cerclagem uterina aos 4 [quatro] meses de gestação), além de apresentar quadro de hipertensão arterial). Quanto aos fatores perinatais, a mãe relata ter tido parto normal e não haver nenhum tipo de alteração em relação ao peso e altura da paciente ao nascer. Relatou ter realizado amamentação natural complementar até os 4 (quatro) anos de idade, e que esta apresentou quadros recorrentes de bronquite asmática, pneumonia, sinusite e rinite alérgica – iniciados aos 2 (dois) meses de idade e estendendo-se até os 15 (quinze) anos -, sendo medicada com: Amoxicilina®, Cefalexina®, Bactrim®, Decongex® e remédio para asma. Aos 13 anos foi diagnosticada com hipertireoidismo.

Foi proposto aplicação de infiltrante resinoso nos dentes afetados da paciente, entretanto esta não apresentava queixa estética e considerava as manchas 'chamosas'. Desta forma, o tratamento estético não foi realizado, somente a aplicação de selante resinoso fotopolimerizável nos molares.

Devido a grande quantidade de elementos dentários hipomineralizados, foi feita avaliação clínica do pai e mãe da paciente, onde foi diagnosticada HMI nos elementos 16 e 26 do pai (Figura 3) e ausência de hipomineralizações na mãe (Figura 4). Adicionalmente, foi solicitado a família que realizassem uma coleta de material biológico (saliva) para avaliação e análise do DNA. O termo de consentimento livre e esclarecido foi devidamente assinado pela paciente e pelos seus pais.



Figura 3. Aspecto clínico intraoral do pai.



Figura 4. Aspecto clínico intraoral da mãe.

Coleta do material biológico (saliva DNA)

Foi feita a coleta do material biológico (saliva) de todos os indivíduos, (paciente, pai e mãe) como fonte de DNA genômico. Os participantes foram orientados a estimular a saliva (bochecho) durante 1 minuto e em seguida expectorar em tubos falcon de 15ml. 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.

Seleção do gene e polimorfismo

Para seleção do gene e polimorfismo uma busca bibliográfica foi realizada entre os genes atuantes nas fases da amelogênese e associados com a HMI^{23,24} e o gene selecionado foi *ENAM* (rs7664896; C>G).

Extração, avaliação da quantidade e pureza do DNA

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

- Mistura por inversão o conteúdo de saliva no coletor por alguns segundos, incubação da mistura em incubadora aquática à temperatura de 50°C por no mínimo 1 hora, podendo deixar por overnight;
- Transferência de $500\mu\text{L}$ de saliva para um Eppendorf estéril de 1.5ml. O excedente da amostra foi congelado a -20°C ;
- Adição de $20\mu\text{L}$ da proteinase Oragene Purifier (OG-L2P) para cada $500\mu\text{L}$ de saliva e

mantido em vórtex por 5 segundos;

- Incubação das amostras em gelo por 10 minutos, centrifugação em temperatura ambiente por 5 minutos a 13,000 RPM (15,000 x g);
- Transferência do sobrenadante para um novo Eppendorf e adição de $500\mu\text{L}$ de etanol 100%, mistura por inversão e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos para completar a precipitação da molécula de DNA;
- Centrifugação por 2 minutos em 13,000rpm (15,000 x g), descarte do sobrenadante e centrifugação por mais 1 minuto a 13,000 rpm (15,000 x g) para precipitar o DNA;
- Os tubos foram deixados com as tampas abertas overnight (24 horas) na bancada;
- Adição de $100\mu\text{L}$ de TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA, pH 8.0) para dissolver o pellet e vortexação por 5 segundos;
- Por último, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas. As amostras foram estocadas em freezer a -20°C até as próximas etapas.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se $1\mu\text{L}$ do material extraído. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280nm foi usada para estimar a pureza do DNA a cima de 4ul. As amostras analisadas tiveram concentração de DNA acima^{1,7}.

Análises (genotipagem)

As amostras foram analisadas em PCR em tempo real em um termociclador 7900HT da Applied Biosystems. O método utilizado para as reações foi o TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)³¹, no qual foram utilizadas sondas específicas para a distinção alélica

(Sondas TaqMan). Todas as reações em PCR foram preparadas com um volume final de 5,0µL (2µL de DNA com a concentração de 4 ng/µL reação); 2,5µL TaqMan PCR máster mix; 0,13µL da sonda TaqMan de cada SNP incluído no estudo e 0,37µL 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 um controle negativo e dois controles positivos para o SNP (polimorfismo) selecionado.

Resultados da genotipagem (PCR em tempo real)

Foi genotipado o polimorfismo rs7664896 (C>G) localizado no gene *ENAM* em uma família composta por pai, mãe e probando (afetado por HMI) (Figura 5). Sendo assim foi possível identificar os genótipos do pai (GG) e da mãe (CC) e, dessa forma, que o probando é heterozigoto para esse locus, apresentando genótipo CG com herança da condição pelo pai.

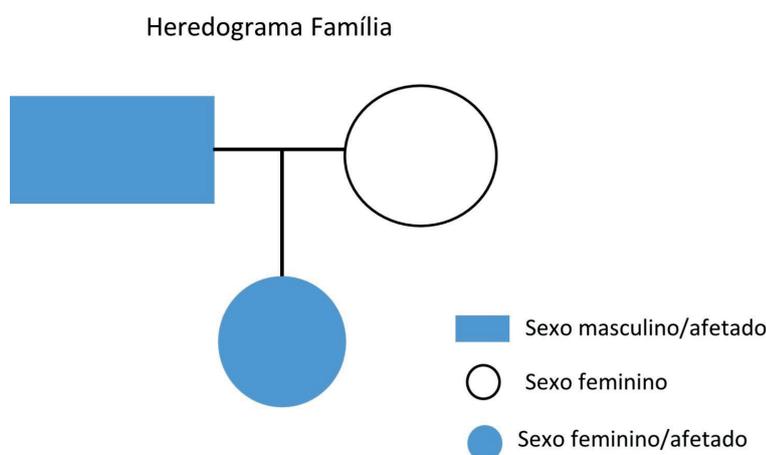


Figura 5. Heredograma familiar para o gene *ENAM*.

Aspectos éticos

Pai, mãe e probando assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para as análises e divulgação dos resultados.

DISCUSSÃO

No presente relato de caso 20 dentes são afetados com HMI, podendo-se observar áreas hipomineralizadas que variam do branco ao castanho, sendo os molares os dentes de descoloração mais severas. O diagnóstico do presente caso foi dado pelo exame clínico e os possíveis fatores etiológicos envolvidos foram pesquisados através de uma anamnese detalhada com dados pré-, peri- e pós-natais dos primeiros anos de vida da paciente, bem como análise genética familiar. O gene *ENAM* alterado, predisponente ao HMI, foi transmitido à paciente pelo pai e acredita-se que fatores ambientais corroboraram para a sua expressão e presença da hipomineralização.

Fatores genéticos têm sido associados ao HMI. Jeremias e colaboradores investigaram 21 genes relacionados à amelogênese revelando associação significativa com HMI e 11 SNPs, indicando associação entre HMI e o SNP rs3796704 no gene *ENAM*²³. Variações genéticas em alguns genes responsáveis pela formação do esmalte podem explicar, relativamente, à etiologia do HMI²⁵. Fatores ambientais que afetam crianças com 3 anos de idade ou menos também foram hipotetizados para desempenhar um papel na etiologia da doença, podendo influenciar a expressão desses genes e interferir na amelogênese. Pessoas com uma predisposição genética específica podem desenvolver HMI se expostas a níveis de fatores ambientais prejudiciais durante a amelogênese, corroborando com a ideia de natureza multifatorial da hipomineralização.

No presente caso, durante o período pré-natal a mãe apresentou quadro de hipertensão arterial, entretanto não há evidências substanciais que possam associar tal complicação à HMI¹⁴.

Durante a primeira infância a paciente teve infecções respiratórias recorrentes, fazendo uso constante de antibióticos. A associação entre a HMI e doenças da infância como sarampo infantil, infecção do trato urinário, bronquite, otite média, distúrbios gástricos, febre, doenças renais, pneumonia e asma é relatada em diversos estudos^{6,1,38,14}. Sugere-se que o uso de amoxicilina durante as fases de maturação do esmalte dental está associado a defeitos no seu desenvolvimento²¹, entretanto, não existem evidências suficientes para determinar uma relação de causa-efeito entre as doenças da infância e drogas utilizadas para tratá-las e a HMI^{45,46, 26,6,22,14}. Desta forma, mantém-se a hipótese de interação entre fatores genéticos e ambientais na etiologia do HMI.

Uma menor qualidade do esmalte dental aumenta o risco às lesões de cárie² e, quando associada a mecânica mastigatória, às fraturas pós eruptivas. Desta forma, restaurações atípicas podem ser encontradas em molares hipomineralizados¹⁸. O presente caso apresenta fratura pós eruptiva no dente 16 e restauração atípica no 46. Estes achados podem ser considerados, por dentistas, um indício para reconhecimento da patologia.

Os possíveis diagnósticos diferenciais da HMI são hipoplasia do esmalte, amelogênese imperfeita e cárie. Hipoplasias são alterações no esmalte que resultam em redução da espessura ou da quantidade deste. Os dentes com hipoplasias podem apresentar mudança na cor do esmalte para bege, marrom ou amarelo-escuro, sendo que fóssulas, fissuras ou perda maior de algumas áreas de esmalte podem ser observadas^{41,18}. É importante destacar que o HMI é um defeito qualitativo, e a perda de estrutura do dente ocorre após a sua erupção (devido lesão de cárie ou fratura). As fraturas em dentes com HMI apresentam bordas irregulares, quando comparadas a hipoplasias^{18,36}. Em relação a amelogênese imperfeita, os dentes podem apresentar alteração de forma e/ou cor evidentes, e sua principal diferença em relação ao HMI se dá pelo acometimento de todos os dentes da mesma dentição de forma igual³⁰. Por fim, as lesões de cárie se localizam em locais de acúmulo de biofilme, como na cervical de dentes anteriores e em dentes posteriores, paredes proximais e regiões de fóssulas e fissuras, e em atividade apresenta aparência opaca e rugosa¹⁹. Já na HMI, as manchas

em dentes anteriores localizam-se nos terços médio e incisal/oclusal dos dentes anteriores e posteriores, e pontas de cúspides na face oclusal dos dentes posteriores⁴⁵.

Segundo Chawala e colaboradores⁴ e Rodd e colaboradores³⁴ a HMI pode estar associada a hipersensibilidade dentinária e desconforto estético, podendo afetar a vida social e a autoestima dos pacientes²⁹. Entretanto, a paciente do presente relato de caso não apresentava queixas estéticas ou hipersensibilidade, definindo as opacidades como 'charmosas'. Acredita-se que a ausência de queixa estética se dá pelo fato que nenhum dos incisivos centrais e laterais superiores foram afetados, os dentes superiores afetados em sua face vestibular apresentavam opacidades brancas leves e, ao serem hidratados pela saliva, estas manchas se tornavam ainda menos evidentes. Desta forma, nenhum tratamento estético foi realizado e orientações relacionadas à higiene bucal e risco à cárie foram reforçadas, com a intenção de prevenção da doença e lesões de cárie, corroborando com a atual filosofia de odontologia de mínima intervenção e evitando sobre tratamento odontológico.

A maior parte dos estudos clínicos realizados sobre a etiologia da HMI são retrospectivos, ou seja, a obtenção de informações é realizada através de entrevistas ou questionários que dependem da memória dos pais, muitas vezes anos após o acontecimento do evento em questão, sendo um fator limitador pelo viés de memória^{6,38,1,27}. Esta limitação também está presente neste caso clínico, restringindo detalhes nas informações relacionadas a idade da paciente e medicamentos utilizados durante as complicações respiratórias. Adicionalmente, o presente caso avaliou apenas um gene e uma família. Estudos prospectivos, com amostras representativas, de diferentes etnias e avaliando diferentes genes são estimulados com a intenção de reduzir essas limitações e a coleta de informações robustas sobre a etiologia da HMI.

CONCLUSÃO

Pode-se inferir a interação entre aspectos ambientais (bronquite asmática, pneumonia, sinusite, rinite alérgica e uso recorrente de antibióticos na primeira infância) e genéticos (genótipo CG com herança da condição pelo

pai) na etiologia da HMI da paciente do presente relato. Faz-se necessário a realização de mais estudos com amostras maiores, de diferentes etnias e com avaliação de diferentes genes para aumentar a robustez das evidências científicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010 Apr;11(2):53-8.
2. Americano GC, Jacobsen PE, Soviero VM, Haubek D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. *Int J Paediatr Dent*. 2017 Jan;27(1):11-21
3. Bussaneli DG, Restrepo M, Fragelli CMB, Santos-Pinto L, Jeremias F, Cordeiro RCL, et al. Genes Regulating Immune Response and Amelogenesis Interact in Increasing the Susceptibility to Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res*. 2019;53(2):217-227.
4. Chawla N, Messer LB, Silva M. Clinical studies on molar-incisor-hypomineralisation part 2: development of a severity index. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2008 Dec;9(4):191-9.
5. Clarkson J. Review of terminology, classifications, and indices of developmental defects of enamel. *Adv Dent Res*. 1989 Sep;3(2):104-9.
6. Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent*. 2009 Mar;19(2):73-83.
7. Domingos PAS, Donato HA, Nonato CN, Souza EO, Silva VJ. Hipomineralização Molar- Incisivo: revisão de literatura. *J Res Dent*. 2019;7(1):8-12
8. Elfrink ME, Ghanim A, Manton DJ, Weerheijm KL. Standardised studies on Molar Incisor Hypomineralisation (MIH) and Hypomineralised Second Primary Molars (HSPM): a need. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2015 Jun;16(3):247-55
9. Farah RA, Swain MV, Drummond BK, Cook R, Atieh M. Mineral density of hypomineralised enamel. *J Dent*. 2010 Jan;38(1):50-8
10. Fernandes AS, Mesquita P, Vinhas L. Hipomineralização incisivo-molar: uma revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. Out 2012;53(4):258-62
11. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*. 1999 Jun 30;126(3):270-99
12. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int*. 1993 Oct;53(4):257-61
13. Gagnier JJ, Kienle G, Altman DG, Moher D, Sox H, Riley D; CARE Group*. The CARE Guidelines: Consensus-based Clinical Case Reporting Guideline Development. *Glob Adv Health Med*. 2013 Sep;2(5):38-43.
14. Garot E, Rouas P, Somani C, Taylor GD, Wong F, Lygidakis NA. An update of the aetiological factors involved in molar incisor hypomineralisation (MIH): a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2022 Feb;23(1):23-38
15. Garot E, Denis A, Delbos Y, Manton D, Silva M, Rouas P. Are hypomineralised lesions on second primary molars (HSPM) a predictive sign of molar incisor hypomineralisation (MIH)? A systematic review and a meta-analysis. *J Dent*. 2018 May; 72:8-13
16. Goldstein DB, Cavalleri GL. Genomics: understanding human diversity. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1241-2
17. Ghanim A, Morgan M, Mariño R, Bailey D, Manton D. Molar-incisor hypomineralisation: prevalence and defect characteristics in Iraqi children. *Int J Paediatr Dent*. 2011 Nov;21(6):413-21
18. Ghanim A, Elfrink M, Weerheijm K, Mariño R, Manton D. A practical method

- for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015 Jun;16(3):235-46.
19. Guedes-Pinto AC. *Odontopediatria.* 9a ed. São Paulo: Santos; 2016. 832 p.
20. Gutiérrez S, Torres D, Briceño I, Gómez AM, Baquero E. Clinical and molecular analysis of the enamelin gene ENAM in Colombian families with autosomal dominant amelogenesis imperfecta. *Genet Mol Biol* 2012;35:557-66
21. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005 Oct;159(10):943-8
22. Hubbard MJ, Mangum JE, Perez VA, Williams R. A Breakthrough in Understanding the Pathogenesis of Molar Hypomineralisation: The Mineralisation-Poisoning Model. *Front Physiol.* 2021 Dec 21;12:802833
23. Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, et al. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol.* 2013 Oct;58(10):1434-42.
24. 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
25. Jeremias F, Bussaneli DG, Restrepo M, Pierri RAG, Souza JF de, Fragelli CMB, et al. Inheritance pattern of molar-incisor hypomineralization. *Braz Oral Res* 2021;35
26. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2009 Feb;88(2):132-6
27. Lygidakis NA, Garot E, Somani C, Taylor GD, Rouas P, Wong FSL. Best clinical practice guidance for clinicians dealing with children presenting with molar-incisor-hypomineralisation (MIH): an updated European Academy of Paediatric Dentistry policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2022 Feb;23(1):3-21
28. Mast P, Rodrigueztapia MT, Daeniker L, Krejci I. Understanding MIH: definition, epidemiology, differential diagnosis and new treatment guidelines. *Eur J Paediatr Dent.* 2013 Sep;14(3):204-8.
29. Ozgöl 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 Winter;38(2):101-5.
30. Pinheiro SF, Cunha MJ, Amorim FC, Lopes MF, Pinheiro IV. Amelogenese imperfeita em paciente nefropata: relato de uma reabilitação oral conservadora. *Rev. Gauch. Odontol.* 2010;58(4):527-31.
31. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2001 Jul;11(7):1262-8.
32. Rauth RJ, Potter KS, Ngan AY, Saad DM, Mehr R, Luong VQ, et al. Dental enamel: genes define biomechanics. *J Calif Dent Assoc.* 2009 Dec;37(12):863-8
33. Robinson C. enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Front Physiol.* 2014 Oct 8; 5:388.
34. Rodd HD, Abdul-Karim A, Yesudian G, O'Mahony J, Marshman Z. Seeking children's perspectives in the management of visible enamel defects. *Int J Paediatr Dent.* 2011 Mar;21(2):89-95.
35. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000 Oct;58(4):250-64.
36. Silva CM, Zuanon AC, Jeremias F, Santos PL. Hipomineralização molar incisivo (HMI) e hipoplasia de esmalte: avaliação clínica e microscópica (MEV). *Rev. Odontol. UNESP.* 2008;37(2):97

37. Silva FM, Magno MB, Neves AB, Coqueiro RD, Costa MD, Maia LC, et al. Aesthetic perceptions and social judgments about different enamel opacities. *Braz. Oral Res.* 2020;34.

38. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar incisor hypomineralization - A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2016 Aug;44(4):342-53.

39. Smith MM, Coates MI. Evolutionary origins of the vertebrate dentition: phylogenetic patterns and developmental evolution. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:482-500.

40. Souza JB, Rodrigues PC, Lopes LG. enamel hipoplasia: aesthetic restorative treatment. *ROBRAC.* 2010;18(47):14-9

41. Spezzia S. Hipomineralização molar incisivo em odontopediatria: considerações gerais. *J. Oral Investig.* 2019;8(1):100-13.

42. Suga S. Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Adv Dent Res.* 1989 Sep;3(2):188-98.

43. Teixeira RJPB, Andrade NS, Queiroz LCC, Mendes FM, Moura MS, Moura LFAD, et al. Exploring the association between genetic and environmental factors and molar incisor hypomineralization: evidence from a twin study. *Int J Paediatr Dent.* 2018 Mar;28(2):198-206.

44. Vieira AR, Kup E. On the Etiology of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res.* 2016;50(2):166-9

45. Weerheijm KL, Jälevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Res.* 2001 Sep-Oct;35(5):390-1.

46. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update.* 2004 Jan-Feb;31(1):9-12