

ANDRÉ MYLLER BARBOSA SILVA

ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

André Myller Barbosa Silva

ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte
2019

Ficha Catalográfica

S586a Silva, André Myller Barbosa.
2019 Análise do perfil metabólico do ameloblastoma / André
D Myller Barbosa Silva. -- 2019.

50 f. : il.

Orientador: Felipe Paiva Fonseca.

Coorientador: Ricardo Santiago Gomez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Ameloblastoma. 2. Proteínas proto-oncogênicas B-raf. 3. Espectrometria de massas. 4. Metabólica. 5. Tumores odontogênicos. I. Fonseca, Felipe Paiva. II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



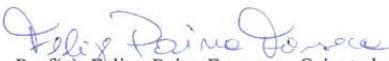
FOLHA DE APROVAÇÃO

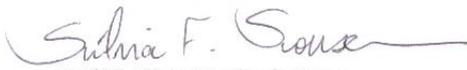
Análise do perfil metabólico do ameloblastoma

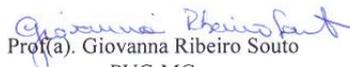
ANDRÉ MYLLER BARBOSA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Patologia Bucal.

Aprovada em 25 de junho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Felipe Paiva Fonseca - Orientador
FO-UFMG


Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa
FO-UFMG


Prof(a). Giovanna Ribeiro Souto
PUC-MG

Belo Horizonte, 25 de junho de 2019.

Dedico este trabalho ao progresso da
Ciência.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, fonte de todo o meu sustento.

Também à minha família por todo o suporte, incentivo, compreensão e por se orgulharem tanto de mim. Mãe, pai, Magno, Dane, Kia, Juliana, Carlos, Matheus e Bela: amo vocês! Obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca, por todo o aprendizado. Por sua humanidade, generosidade, compreensão, disposição em ajudar e por conseguir exercer e repassar todo o seu profundo conhecimento de uma forma tão simples e didática, concebendo paixão pela ciência aos seus alunos.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Ricardo Santiago Gomez, pela colaboração *sine qua non* e pelo conhecimento transmitido a cada instante de convívio.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFMG, Profa. Dra. Cláudia Borges Brasileiro, Profa. Dra. Janine Mayra da Silva, Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar, Profa. Dra. Patrícia Carlos Caldeira, Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita, Profa. Dra. Sílvia Ferreira de Souza, Profa. Dra. Tânia Mara Pimenta Amaral, Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva e Prof. Dr. Wagner Henriques de Castro pela colaboração e gentileza ao compartilhar seus vastos conhecimentos.

Às professoras Dra. Carolina Cavaliéri Gomes e Dra. Marina Gonçalves Diniz, pela indispensável colaboração.

Aos professores Ana Paula Fernandes, Juliano Simões de Toledo e Leiliane Coelho André, da Faculdade de Farmácia da UFMG e Gisele André Baptista Canuto, do Instituto de Química da UFBA, pela gentil colaboração.

Aos doutorandos Mariana Saturnino de Noronha, Sara Ferreira dos Santos Costa, Filipe Fideles Duarte Andrade e Jéssica Gardone Vitória, por todo auxílio, dedicação, paciência e ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial: Daniella Rocha Kem, Domênico Romano Romani e Mara Quintela Maia e do Serviço de Radiologia:

Diogo Assunção Gonçalves, Elisson Rodrigo de Oliveira Teixeira, Luciana Cristina Gomes e Tânia Regina Alves Silva de Pinho, pela transmissão de seus conhecimentos e por toda ajuda concedida de forma gentil e respeitosa.

Aos grandes amigos que ganhei no mestrado, em especial Eduardo Morato Oliveira, Maria Fernanda Lopes Fonseca, Priscila Thaís Rodrigues de Abreu e Sicília Rezende Oliveira, não somente pelas colaborações e ensinamentos, mas pelo convívio, risadas e por ajudarem a tornar mais leve esta árdua jornada.

Aos colegas Dra. Aline Fernanda Cruz, Dr. Júlio César Tanos de Lacerda e Dra. Renata Gonçalves Rezende por colaborarem desde o início deste projeto.

Aos amigos da Estação Ensino e da PBH, em especial Rosângela Silva, Isabela de Aguiar Melo Cardoso e Marcelo Bisinoto Tamietti, por todo o suporte e por não medirem esforços para me ajudar a concretizar este sonho.

Finalmente, agradeço a todos os demais que colaboraram de maneira direta, indireta ou que torceram por mim.

Muito obrigado!

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.”

Roger Von Oech

RESUMO

O ameloblastoma é um tumor benigno que se origina do epitélio odontogênico. A patogênese não é completamente compreendida e envolve alterações genéticas como a mutação do gene *BRAF*. Uma vez que a lesão apresenta comportamento localmente infiltrativo e alta tendência a recidivas locais, o tratamento usualmente requer excisão cirúrgica total da lesão, resultando em deformidade facial, grande morbidade e, conseqüentemente, um impacto importante na vida do paciente acometido. A metabolômica representa o estudo do conjunto de metabólitos de um sistema biológico e fornece, assim, informações finais, mais intimamente relacionadas ao fenótipo estudado, a respeito das interações envolvendo alterações genéticas, atividade enzimática e reações metabólicas. O uso de amostras fixadas em formol e preservadas em parafina tem se mostrado conveniente em experimentos metabolômicos por representar uma fonte abundante de material biológico para pesquisa e por demonstrar confiabilidade no seu uso. Desta maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil metabolômico do ameloblastoma e identificar vias metabólicas possivelmente envolvidas na patogênese e progressão da lesão, assim como relacionar estes achados com a presença da mutação V600E do gene *BRAF*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob CAAE número 97428718.5.0000.5149. Foram utilizadas 14 amostras tumorais fixadas em formol e embebidas em parafina e 6 amostras de epitélio odontogênico morfológicamente normal obtidos de folículos dentários. Identificou-se os metabólitos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e a presença da mutação *BRAF-V600E* foi avaliada através de PCR em tempo real. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas univariadas e multivariadas. Onze metabólitos foram encontrados significativamente mais elevados no ameloblastoma em relação aos folículos dentais, incluindo aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, ácidos inorgânicos e compostos organo-heterocíclicos. A presença da mutação *BRAF-V600E* nas amostras foi relacionada à diminuição dos níveis de glicerol em comparação com tumores portadores apenas de alelos do tipo selvagem deste gene. Não foram observadas diferenças metabólicas entre ameloblastomas recidivantes e ameloblastomas primários. Conclui-se que o ameloblastoma apresenta um perfil metabolômico diferente do tecido odontogênico morfológicamente normal e que a mutação *BRAF-V600E* pode contribuir para algumas alterações metabólicas presentes no ameloblastoma, o que pode estar relacionado com a patogênese deste tumor.

Palavras-chave: Ameloblastoma. Proteínas proto-oncogênicas B-raf. Espectrometria de massas. Metabolômica. Tumores odontogênicos.

ABSTRACT

Analysis of ameloblastoma metabolomic profile

Ameloblastoma is a benign tumor that originates from the odontogenic epithelium. The pathogenesis is not completely understood and involves genetic alterations such as the mutation of the BRAF gene. Since the lesion presents locally infiltrative behavior and a high potential to local recurrences, the treatment usually requires total surgical excision of the lesion, resulting in facial deformity, great morbidity and, consequently, a significant impact on the life of the affected patient. The metabolomics represents the study of the metabolites set of a biological system. It provides final information more closely related to the studied phenotype regarding the interactions involving genetic alterations, enzymatic activity and metabolic reactions. The use of formalin-fixed and paraffin-embedded samples has been shown to be convenient in metabolomics experiments because it represents an abundant source of biological material for research and for demonstrating reliability in its use. Thus, the aim of this study was to evaluate the metabolic profile of ameloblastoma and to identify metabolic pathways possibly involved in the pathogenesis and progression of this lesion, as well as to correlate these findings to the presence of *BRAF-V600E* mutation. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais under CAAE number 97428718.5.0000.5149. Fourteen formalin-fixed and paraffin-embedded tumor samples and 6 samples of morphologically normal odontogenic epithelium obtained from dental follicles were used. Metabolites were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry and the presence of the *BRAF-V600E* mutation was assessed by real-time PCR. The data was submitted to univariate and multivariate statistical analyses. Eleven metabolites were found to be significantly higher in ameloblastoma compared to dental follicles, including amino acids, fatty acids, carbohydrates, inorganic acids and organoheterocyclic compounds. The presence of the *BRAF-V600E* mutation in the samples was related to decreased levels of glycerol compared to tumors bearing only wild-type alleles of this gene. No metabolic differences were observed between recurrent ameloblastomas and primary ameloblastomas. It is concluded that ameloblastoma presents a different metabolomic profile of morphologically normal odontogenic tissue and that the *BRAF-V600E* mutation may contribute to some metabolic alterations present in the ameloblastoma, which may be related to the pathogenesis of this tumor.

Keywords: Ameloblastoma. *BRAF*. Mass spectrometry. Metabolomics. Odontogenic tumor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFBA	Universidade Federal da Bahia
OMS	Organização Mundial da Saúde
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
FFPE	Formalin-Fixed Parafin-Embedded
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
QCs	Controles de Qualidade
MS	Mass Spectrometry
UV	Unit Variance
PCA	Principal Component Analysis
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
OPLS-DA	Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis
DNA	Deoxyribonucleic Acid

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	12
1.1	Ameloblastoma.....	12
1.1.1	Aspectos epidemiológicos, clínicos e radiográficos.....	12
1.1.2	Aspectos histopatológicos.....	12
1.1.3	Tratamento.....	13
1.1.4	Mutação BRAF-V600E.....	13
1.2	Metabolômica.....	14
1.2.1	Utilização da metabolômica na saúde.....	14
1.2.2	Fluxo de trabalho em metabolômica.....	14
1.2.3	Amostras biológicas em trabalhos metabolômicos.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	METODOLOGIA EXPANDIDA.....	18
3.1	Aspectos éticos.....	18
3.2	Coleta e inclusão das amostras.....	18
3.3	Extração de metabólitos.....	19
3.4	Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	20
3.5	Análise dos dados.....	21
3.6	Análise estatística.....	21
3.7	Extração do DNA e avaliação da mutação BRAF-V600E.....	21
4	ARTIGO.....	23
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP.....	39

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido – paciente..	43
ANEXO C - Termo de assentimento livre e esclarecido.....	45
ANEXO D - Termo de consentimento livre e esclarecido para o responsável.....	47
ANEXO E – Termo de constituição de biorrespositório.....	49

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Ameloblastoma

O ameloblastoma é o tumor odontogênico mais frequente após os odontomas (BRIERLEY; SPEIGHT; JORDAN, 2017). Origina-se do epitélio odontogênico e, apesar de ainda não estar totalmente esclarecida, a patogênese envolve alterações genéticas, como a mutação do gene BRAF (DINIZ *et al.*, 2015). Embora seja um evento raro, o ameloblastoma tem o potencial de sofrer transformação maligna (BRIERLEY; SPEIGHT; JORDAN, 2017).

1.1.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e radiográficos

O ameloblastoma afeta principalmente a região posterior e o ângulo da mandíbula de pacientes em uma ampla faixa etária, com pico de idade ao redor de 35 anos, apresentando-se como uma tumefação indolor e de crescimento lento, que ao exame radiográfico revela uma imagem radiolúcida multiloculada ou uniloculada (BRIERLEY; SPEIGHT; JORDAN, 2017).

De acordo com os critérios atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS), o ameloblastoma é classificado em três subtipos clinicopatológicos, a) ameloblastoma, b) ameloblastoma unicístico e c) ameloblastoma periférico (WRIGHT; VERED, 2017).

1.1.2 Aspectos histopatológicos

Microscopicamente, o ameloblastoma é formado por ilhas e cordões de células epiteliais sendo que na periferia destas estruturas as células neoplásicas apresentam-se colunares e dispostas em paliçada, exibindo polarização invertida do seu núcleo, assemelhando-se a pré-ameloblastos, enquanto que a região central das ilhas neoplásicas exibem células estreladas dispostas frouxamente lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte. Focos de degeneração cística são comumente observados ao longo dos diferentes casos (BRIERLEY; SPEIGHT; JORDAN, 2017). As variantes histopatológicas do ameloblastoma incluem os

padrões folicular, plexiforme, acantomatoso, granular, basaloide e desmoplásico. O padrão folicular é o mais frequente, seguido pela variante plexiforme. Apesar de apresentar múltiplas formas microscópicas, essas variações não estão relacionadas a diferentes prognósticos da lesão (WRIGHT; VERED, 2017).

1.1.3 Tratamento

O tratamento do ameloblastoma normalmente é realizado por meio da excisão cirúrgica total da lesão, incluindo margens de segurança, uma vez que a lesão apresenta comportamento localmente infiltrativo e alta tendência a recidivas (PEACOCK, 2017). Quando a lesão afeta a maxila, o tratamento torna-se ainda mais desafiador devido à complexidade anatômica deste osso e de sua relação com as estruturas vizinhas (BRIERLEY; SPEIGHT; JORDAN, 2017). Dessa maneira, a terapia cirúrgica traz um impacto importante na vida do paciente acometido, uma vez que resulta em deformidade facial e grande morbidade (BROWN; BETZ, 2015). Entretanto, apesar desta agressividade local exibida pela neoplasia, alguns autores propõem a utilização de intervenções cirúrgicas mais conservadoras, favorecendo a reabilitação dos pacientes, apesar de exigir um minucioso acompanhamento clínico e radiográfico para identificação precoce de eventuais recidivas. A escolha por uma destas abordagens terapêuticas impactará diretamente no índice de recidivas da lesão, que se apresenta mais elevado quando tratamentos mais conservadores são executados (MCCLARY *et al.*, 2016).

1.1.4 Mutação BRAF-V600E

As mutações em componentes da via da proteíno-quinase ativada por mitógenos (MAPK) são frequentes no ameloblastoma, sendo a mais comum aquela que envolve o gene BRAF, em que uma valina é substituída por glutamato no códon 600 (V600E). Nesse sentido, discute-se a possibilidade de realização de terapias quimioterápicas personalizadas para o tratamento desta lesão, através de fármacos que têm como alvo os componentes mutados desta via de sinalização molecular (BROWN; BETZ, 2015). Fatores como o microambiente tumoral e a heterogeneidade intratumoral podem influenciar nas respostas individuais a terapias não invasivas

com alvos genéticos (GOMES; DINIZ; GOMEZ, 2014). Sendo assim, uma melhor compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na patogênese do ameloblastoma é de fundamental interesse.

1.2 Metabolômica

A metabolômica é uma linha de estudos que objetiva analisar o metaboloma, ou seja, o conjunto de metabólitos, de um determinado sistema biológico. Os metabólitos são pequenas moléculas de intermediários e produtos do metabolismo (KOEK *et al.*, 2011). Envolve diferentes classes e propriedades químicas, podendo ser encontradas em organismos, tecidos, células ou compartimentos celulares (KOEK *et al.*, 2011) e representam a última parte do fluxo de informações do organismo humano que se inicia com os genes, sendo também a resposta final de um organismo a agentes externos ou ambientais (KLUPCZYNSKA; DEREZINSKI; KOKOT, 2015). Dessa maneira, os níveis de metabólitos de uma amostra biológica estão mais intimamente relacionados ao fenótipo do indivíduo quando se compara outros produtos “ômicos” como genes ou proteínas, por exemplo. Assim, avaliar o perfil metabólico de uma amostra pode fornecer informações a respeito de alterações genéticas, atividades enzimáticas e reações metabólicas (KLUPCZYNSKA; DEREZINSKI; KOKOT, 2015).

1.2.1 Utilização da metabolômica na saúde

A metabolômica representa uma valiosa ferramenta para a realização de estudos como a descoberta de biomarcadores, a seleção de terapias-alvo, a avaliação da resposta de um indivíduo a determinada terapêutica (CACCIATORE *et al.*, 2017) e o uso em oncologia, uma vez conhecido que o câncer causa alterações no metabolismo celular (KLUPCZYNSKA; DEREZINSKI; KOKOT, 2015).

1.2.2 Fluxo de trabalho em metabolômica

O fluxo de trabalho utilizando a metabolômica envolve uma série de passos. Após o delineamento do estudo e a aquisição do material biológico a ser analisado,

os metabólitos devem ser extraídos e submetidos a reações químicas de acordo com protocolos e o método de detecção que será utilizado. Em seguida, as amostras devem ser analisadas na plataforma analítica escolhida e os dados obtidos devem ser processados e submetidos a análises estatísticas utilizando-se *softwares* de bioinformática (KOEK *et al.*, 2011). A análise final das informações permite a avaliação do perfil metabólico da amostra, a possível identificação de biomarcadores ou a formulação de novas hipóteses (KLUPCZYNSKA; DEREZINSKI; KOKOT, 2015).

Fatores dificultadores da técnica incluem a padronização na terminologia metabolômica e nos materiais de referência sobre o tema, que ainda são escassos principalmente devido à complexidade do metaboloma humano, que pode conter mais de 100.000 metabólitos diferentes. De acordo com o objetivo de cada estudo, diferentes metodologias são necessárias e a associação destas pode levar a uma identificação mais completa dos metabólitos (KOEK *et al.*, 2011).

Na metabolômica *untarget*, a principal metodologia utilizada, detecta-se e quantifica-se (de maneira relativa, comparando-se a um padrão interno) o perfil metabólico global de uma amostra (KOEK *et al.*, 2011). Utiliza-se para tanto a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), o método mais tradicional de análise de metabólitos, sendo considerado o padrão-ouro (FIEHN, 2016). É apropriado para uma abordagem holística do metaboloma, uma vez que combina a separação de compostos e detecções de suas massas, através da ionização de elétrons (KOEK *et al.*, 2011). A amostragem para GC-MS envolve o processo de derivatização, que transforma compostos não voláteis em voláteis (FIEHN, 2016). Este procedimento aumenta o intervalo de detecção do método e na maioria das vezes envolve as reações de siliilação, acompanhada ou não de reações de oximação (KOEK *et al.*, 2011).

1.2.3 Amostras biológicas em trabalhos metabolômicos

Um dos desafios enfrentados pela metabolômica é a dificuldade em se utilizar tecidos frescos para análise, que caracteristicamente apresentam maior conservação dos metabólitos, mas apresentam, em contrapartida, disponibilidade escassa em arquivos de centros de assistência à saúde. Alternativamente, amostras fixadas em formol e preservadas em parafina (FFPE – Formalin-fixed parafin-

embedded) podem ser usadas para este fim e representam uma fonte abundante de materiais para pesquisa, o que é extremamente conveniente para a realização de estudos retrospectivos. Embora a confiabilidade do uso de amostras de FFPE para análises metabolômicas seja controversa, Cacciatore *et al.* (2017) encontraram viabilidade e utilidade ao usar esse tipo de material para detectar o perfil metabolômico e distinguir tipos de neoplasias de próstata, comparando-o com dados obtidos de amostras congeladas. Concluíram que as secções de tecidos parafinados podem preservar os metabólitos de uma maneira satisfatória, permitindo a sua utilização para análises metabolômicas (CACCIATORE *et al.*, 2017). Corroborando esses resultados, Wojakowska *et al.* (2015) conseguiram discriminar e caracterizar, também de maneira satisfatória, tecidos neoplásico e normal, assim como maligno e benigno usando tecidos parafinados de biopsias de tireoide (WOJAKOWSKA *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil metabolômico do ameloblastoma.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar quais as vias metabólicas potencialmente envolvidas no ameloblastoma.
- Identificar quais os metabólitos mais abundantes no ameloblastoma.
- Identificar alterações nas vias metabólicas e nos metabólitos produzidos pelo ameloblastoma se comparado com aqueles produzidos por tecido odontogênico morfológicamente normal.
- Avaliar a relação entre a presença da mutação *BRAF-V600E* e as alterações metabólicas presentes nas amostras de ameloblastoma.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob parecer número 3.059.929 (ANEXO A).

Quando o contato com os pacientes foi possível de ser realizado, àqueles voluntários maiores de 18 anos foi apresentado um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B). Já aos participantes menores de 18 anos, apresentou-se um termo de assentimento livre e esclarecido (ANEXO C) e aos seus responsáveis, um termo de consentimento livre e esclarecido para responsáveis (ANEXO D), conforme a resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. Além disso, foi criado um biorrepositório, conforme a resolução nº 441/11 e a Portaria nº 2201/11 do Conselho Nacional de Saúde, para adequada operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG) (ANEXO E).

3.2 Coleta e inclusão das amostras

Para avaliar o perfil metabolômico nos ameloblastomas foram utilizadas 14 amostras tumorais obtidas de blocos de parafina arquivados no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da FO-UFMG. Uma das amostras foi excluída do estudo por se tratar de um caso recidivante de um paciente que já havia sido incluído.

Além disso, foram utilizadas 6 amostras de tecido odontogênico morfológicamente normal obtidos de casos diagnosticados como capuz pericoronário também arquivados no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da FO-UFMG.

Os diagnósticos de ameloblastoma e capuz pericoronário foram confirmados por meio da revisão de novos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina por dois patologistas orais experientes de acordo com os critérios presentes na última classificação de tumores odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (WRIGHT; VERED, 2017). Como critérios de inclusão foram selecionados pacientes com ameloblastoma que apresentaram confirmação do diagnóstico histopatológico e

que possuíam tecido parafinado disponível para os ensaios laboratoriais. Critérios de exclusão envolviam a baixa quantidade de material no bloco de parafina e a alta quantidade de estroma tumoral em detrimento da quantidade de parênquima.

Apesar do número de casos de ameloblastoma nos arquivos ser alto, os critérios de inclusão / exclusão, a logística e o financiamento envolvidos na análise metabolômica limitou o uso de uma quantidade maior de amostras.

3.3 Extração de metabólitos

Para a extração dos metabólitos foram coletadas duas secções teciduais com área de $0,3\text{cm}^2$ e $10\mu\text{m}$ de espessura para cada amostra de ameloblastoma e de capuz pericoronário. Uma amostra de parafina sem tecido foi utilizada como controle negativo. A extração dos metabólitos foi realizada por meio de solventes de acordo com protocolo validado na literatura (WOJAKOWSKA *et al.*, 2015).

Para desparafinização o material foi submetido a duas lavagens com 1mL de xilol seguidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos sob 4°C . A secagem das amostras utilizou *SpeedVac*, à temperatura de 30°C , por aproximadamente 1 hora.

A extração dos metabólitos polares foi realizada adicionando-se $250\mu\text{L}$ de MeOH:H₂O (1:1). Em seguida, a solução foi submetida ao vortex por 5 minutos, banho ultrassônico por 10 minutos e a mistura resultante foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm e 4°C . O sobrenadante foi coletado em um tubo eppendorf e então foi submetido a centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto para gerar a fração polar.

A extração dos metabólitos apolares foi realizada adicionando-se $250\mu\text{L}$ de CH₂CL₂:MeOH (3:1). Em seguida, a solução foi submetida ao processo já descrito acima para gerar a fração não polar. Posteriormente, ambas as frações (polar e não polar) foram combinadas e transferidas para um novo tubo eppendorf e submetidas a evaporação em *SpeedVac*.

Controles de qualidade (QCs) foram preparados misturando-se o mesmo volume de todas as amostras.

A derivatização é uma reação utilizada para tornar voláteis os metabólitos que não o são, requisito necessário para que sejam detectados por GC-MS. Foi

realizada adicionando-se 450 μ L do extrato ao inserto de vidro. A amostra foi evaporada utilizando-se *SpeedVac*. Assegurou-se que todo o conteúdo foi evaporado, pois a presença de água interfere com a derivatização e pode resultar em baixo rendimento.

A reação de metoximação, uma das etapas da derivatização utilizada para aumentar a estabilidade das moléculas e diminuir a quantidade de produtos resultantes de isômeros, foi realizada adicionando-se 10 μ L de metoxiamina (15ppm, 15mg/mL) em piridina. Realizou-se três ciclos em vortex por 5 minutos e incubação *overnight* à temperatura ambiente em local protegido da luz. Para siliilação, 10 μ L de BSTFA+TMS (99:1) foram adicionados aos vials descapsulados. Em seguida, os tubos foram recapsulados, colocados em vortex por 5 minutos e incubados a 70°C por 1 hora. As amostras foram então descapsuladas e 100 μ L de heptano contendo 10 ppm de C18:0 metil-éster foram adicionados. As amostras foram hermeticamente encapsuladas e colocadas em vortex por 2 minutos previamente à injeção.

3.4 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Os metabólitos foram analisados por meio de GC/MS disponível no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os parâmetros de injeção foram otimizados previamente por Garcia e Barbas (2011). Brevemente, 2 μ L da amostra derivatizada foram injetados em modo Split no cromatógrafo gasoso (CG - Agilent 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (MS) com detector de eixo triplo (Agilent 5975C). Para separação, foi utilizada uma pré-coluna J&W de 10m, acoplada a uma coluna DB-5MS com 30m de comprimento, 0.25mm de diâmetro interno e contendo um filme de 25 μ m, composto por 95% de dimetilpolisiloxano e 5% de difenil. A entrada do injetor foi mantida a uma temperatura de 250°C. O hélio foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1.0mL/minuto. O gradiente de temperatura ocorreu da seguinte forma: a temperatura inicial da coluna foi de 60°C por um minuto após a injeção, seguido por um aumento gradativo da temperatura a uma taxa de 10°C/min até ser atingida a temperatura final de 325°C. Posteriormente à análise, a coluna foi resfriada para a temperatura de 60°C, para que se pudesse dar início à injeção da próxima amostra da fila. O injetor, linha de transferência, fonte do filamento e

quadropólo foram mantidos às temperaturas de 250°C, 280°C, 230°C e 150°C, respectivamente. O controle do processo foi realizado pelo programa Chemstation. A fonte de ionização foi operada a -70eV. A detecção pelo espectrômetro de massas foi realizada no modo full scan, considerando o intervalo de 50-600 m/z em uma taxa de 2.7 varreduras/segundo.

3.5 Análise dos dados

O processamento dos dados envolveu a identificação dos compostos com base na biblioteca de Fiehn RTL. A deconvolução dos dados com base no índice de retenção e no tempo de retenção foi feita no software AMDIS, para que os compostos co-eluídos pudessem ser identificados. O alinhamento e a filtragem dos dados foram realizadas no Mass Profile Professional.

3.6 Análise estatística

Previamente às análises multivariadas, os dados foram escalonados em Pareto ou UV. Para construção de PCA e PLS-DA, assim como a avaliação dos dados por Análise Discriminante de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente (OPLS-DA), usando a ferramenta Jack Knife, foram realizadas no software estatístico SIMCA 14.1. O heatmap foi construído no programa MetaboAnalyst disponível online (<http://www.metaboanalyst.ca/>) versão 3.5. Análises univariadas foram realizadas no Matlab, para verificação dos dados quanto à sua normalidade, sendo que as variáveis que apresentarem distribuição normal foram ainda submetidas a testes paramétricos e ao teste t de Student considerando um valor $p < 0.05$.

3.7 Extração do DNA e avaliação da mutação *BRAF-V600E*

Doze amostras de ameloblastoma foram analisadas quanto à presença da mutação *BRAF-V600E*. O DNA genômico foi extraído das mesmas utilizando-se o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e a presença da alteração genética em questão foi avaliada por meio de PCR em tempo real específico de alelo competitivo utilizando a sonda

TaqMan (BRAF_476_mu) (Life Technologies, CA, EUA), conforme descrito anteriormente (PEREIRA *et al.*, 2016).

4 ARTIGO

Received: 1 February 2019 | Accepted: 5 February 2019

DOI: 10.1111/jop.12839

ORIGINAL ARTICLE

WILEY 

The importance of *BRAF-V600E* mutation to ameloblastoma metabolism

Filipe Fideles Duarte-Andrade¹ | André Myller Barbosa Silva¹ | Jéssica Gardone Vitória¹ | Gisele André Baptista Canuto² | Sara Ferreira Santos Costa¹ | Marina Gonçalves Diniz¹ | Ana Paula Fernandes³ | Juliano Simões de Toledo³ | Leiliane Coelho André³ | Carolina Cavaliéri Gomes¹ | Ricardo Santiago Gomez¹  | Felipe Paiva Fonseca¹ 

¹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

²Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

³Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Felipe Paiva Fonseca, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
Email: felipepfonseca@hotmail.com

Funding information

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—[Finance Code 001]. Financial support was also provided by Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and F.F.D.A. and S.F.S.C. receive CAPES scholarship and J.G.V. receive CNPq scholarship. RSG, CCG and FPF are research fellows at CNPq.

Background: Ameloblastoma is a locally infiltrative, aggressive epithelial odontogenic neoplasm. *BRAF-V600E* mutation is frequently found in this tumor and has a pivotal role in its pathogenesis, but the consequences of this alteration need to be addressed. An untargeted metabolomics approach was applied to verify whether metabolic disturbances are related to tumor biology and whether *BRAF-V600E* mutation contributes to these alterations.

Methods: Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens from thirteen ameloblastoma and six dental follicles were included in this study. *BRAF* mutational status was determined by competitive allele-specific real-time PCR. Metabolite extracts were analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Univariate and multivariate statistical methods were employed to compare the metabolic profiles of the samples.

Results: The abundance of eleven metabolites was significantly higher in ameloblastoma in relation to dental follicles, including amino acids, fatty acids, carbohydrates, inorganic acids, and organoheterocyclic compounds. The presence of *BRAF-V600E* mutations in ameloblastoma was related to decreased levels of glycerol in comparison with tumors carrying only wild-type alleles of this gene. No metabolic differences were observed between recurrent and primary manifestations of ameloblastoma.

Conclusions: Ameloblastoma exhibits a distinct metabolic profile from normal odontogenic epithelium. *BRAF-V600E* may contribute to metabolic alterations in ameloblastoma. Collectively, our findings suggest that metabolic alterations might play a role in tumor pathogenesis.

KEYWORDS

Ameloblastoma, *BRAF*, mass spectrometry, metabolomics, odontogenic tumor

1 | INTRODUCTION

Ameloblastoma is a benign odontogenic neoplasm, most commonly arising in the posterior region of the mandible.¹ The tumor has a

slow-growing development, but presents a locally aggressive behavior.^{2,3} According to the latest World Health Organization (WHO) classification of odontogenic tumors published in 2017, ameloblastoma was subdivided into three clinicopathological variants, that is,

Filipe Fideles Duarte-Andrade, André Myller Barbosa Silva and Jéssica Gardone Vitória contributed equally to this work.

ameloblastoma, unicystic ameloblastoma, and extrasosseous/peripheral type.⁴ Microscopic examination of ameloblastoma specimens reveals structures that resemble tooth development apparatus, composed of islands or follicles of epithelial cells presenting peripherally columnar ameloblasts-like cells surrounding loosely arranged stellate cells. Treatment options range from conservative approaches (enucleation/curettage) to radical excision, though the former demonstrates a high recurrence rate,³ and both cause significant morbidity and facial deformity. Although rare, malignant transformation of ameloblastomas into ameloblastic carcinoma is also well known.^{5,6}

Although the molecular pathogenesis of ameloblastoma is not well understood, recent reports have suggested a prominent role of mitogen-activated protein kinase pathway dysregulation by recurrent activating mutations in *BRAF*.³ As metabolic disturbances have been shown to play a role in tumorigenesis,⁷ metabolomics represents a valuable tool to identify novel alterations that can be used for diagnosis and therapeutic purposes. However, there seems to be no study reporting the metabolic changes in ameloblastoma. Therefore, in the present study, a comparative untargeted metabolomics analysis using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of ameloblastoma and dental follicles to identify relevant metabolites and metabolic pathways potentially dysregulated in the pathogenesis of this aggressive tumor and to verify whether *BRAF-V600E* mutation contributes to these alterations.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Samples and subjects

The study was conducted in accordance with ethical standards and was approved by the local institutional review board and the Ethics Committee (CAAE: 97428718.5.0000.5149). A total of 19 FFPE tissue samples were retrieved from the files of the Oral Pathology Service at Universidade Federal de Minas Gerais, comprising of 13 ameloblastomas and six dental follicles obtained from healthy patients submitted to extractions of impacted third molars. Microscopic aspects of all cases were reviewed by two oral pathologists to confirm their diagnoses following current WHO guidelines.

2.2 | Metabolomics on FFPE tissue samples

2.2.1 | Sample preparation

The extraction of metabolites was performed according to modifications on the protocol described by Wojakowska et al.⁸ Tissue regions of interest were pre-defined during microscopic examination of hematoxylin-eosin-stained sections. The first and second 10- μ m-thick slices were discarded, and subsequently, three tissue sections with 10 μ m thick and 0.3 cm² of area were collected into microtubes. Technical triplicates were produced for each sample. Tissues were deparaffinized by washing twice with 1 mL of xylene (Merck, Darmstadt, Germany) followed by centrifugation at 4°C,

13 250 g for 10 minutes. The residual solvent was evaporated in a thermoblock. Polar metabolites were extracted with 250 μ L of methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): water 1:1 (v/v), followed by 5 minutes of vortexing and sonication for 10 minutes in an ultrasonic bath. The resulting mixture was centrifuged for 15 minutes, 4°C at 13 250 g, and the supernatant was collected into another tube. To the pellet, 250 μ L of dichloromethane: methanol 3:1 (v/v) (Sigma-Aldrich) were added in order to obtain apolar metabolites and were also subjected to 5 minutes of vortexing and 10 minutes of sonication in an ultrasonic bath. The supernatant was collected by centrifugation (13 250 g, 15 minutes, 4°C) and combined with the polar fraction. Subsequently, 250 μ L of the resulting mixture was transferred to a glass insert and were completely evaporated in speedvac concentrator at 30°C.

Methoximation was performed by the addition of 30 μ L of methoxyamine (Sigma-Aldrich) in pyridine (Sigma-Aldrich) [15 mg/mL]. The vials were vortexed for 5 minutes, and the reaction was carried out for 2 hour at 60°C. For silylation, 30 μ L of MSTFA (Sigma-Aldrich) was added and the reaction was carried out for 1 hour at 60°C. Finally, 1 μ L of C18:0 methyl stearate (Sigma-Aldrich) [1000 ppm] and 59 μ L of heptane (Sigma-Aldrich) were added to each sample. Quality controls (QCs) were prepared by pooling the same amount from each sample and were analyzed throughout the run, after every five samples. A blank sample was included in the study and was obtained from sections of a paraffin block prepared without tissues, following the same extraction and derivatization procedures applied to the samples.

2.2.2 | GC-MS system

Analyses were performed with Gas Chromatography system 7890 C coupled with a quadrupole Mass Detector 5975 A (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA) equipped with automatic injector combiPAL autosampler. The samples (2 μ L each) were injected in split mode (ratio 1:10) in capillary column DB-5MS (30 m length, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μ m thickness film) from Agilent Technologies®. Ultrapure helium (99.9999%) was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The injector temperature was maintained at 250°C. The oven temperature was programmed at 60°C (1.0 minutes) with gradual increase at a rate of 10°C/min up to 325°C. The mass detector was operated in electron impact ionization at 70 eV and in full-scan mode at the range 50-600 m/z.

2.2.3 | GC-MS data processing

Data processing was performed in XCMS software package (version 1.24.1)⁹ running at R platform (version 3.2.2). Data extraction was performed by matched filter method. The parameters were as follows: (a) peak width (fwhm) = 4; (b) signal-to-noise ratio (sn-thresh) = 1.5; and (c) maximum number of peaks per extracted ion chromatogram (max) = 40. Peak grouping was based on bandwidth correction (bw) = 5 and two for the first and second grouping, respectively, the width of the overlapped bands of *m/z* (mzwid) = 0.25, and the minimum fraction of samples necessary in at least one group to be

valid (minfrac) was set at 0.1. The "fillPeaks" tool was used to remove missing values, and default "retcor" method was applied with non-linear alignment and degree of smoothing for local polynomial regression fitting (span) = 0.5 to correct the retention time. Annotation of metabolites using AMDIS (version 2.71) was searched against Fiehn GC/MS RLT Library for identification of co-eluted compounds based on the retention index.¹⁰ The data set was normalized by the C18:0 methyl stearate internal standard before statistical analyses.

2.3 | DNA extraction and BRAF-V600E mutation assessment

Genomic DNA was extracted from the samples using QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The presence of BRAF-V600E mutation was evaluated by competitive allele-specific real-time PCR using TaqMan probe (BRAF_476_mu) (Life Technologies, CA, USA), as previously described.¹¹

2.4 | Statistical analysis

Data were Pareto scaled and \log_2 transformed before multivariate statistical analyses. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were conducted in SIMCA 14.1. Pairwise comparisons using either Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test for independent data were performed on Statistica version 10, depending on the normality distribution assessment (Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Shapiro-Wilk tests). A *P*-value <0.05 was used as the threshold for significance. Pathway analyses were performed on MBrole 2.0 and Metaboanalyst 4.0.¹²

3 | RESULTS

3.1 | Clinicopathological features

Ameloblastoma cases included in the study were comprised of eight men and five women, with age ranging from 13 to 81 years old, and the mean age was 35 years old. Eleven cases affected the mandible and two cases affected the maxilla. Nine cases were primary tumors, three were recurrences and one was unknown. Dental follicles were collected from four males and two female patients with a mean age of 16 years old (ranged from 9 to 21 years). Ameloblastoma samples were comprised of multiple histopathological types. In seven cases, plexiform type prevailed, with one of them showing expressive additional areas of acanthomatous pattern. In the other six cases, the most abundant type was follicular, with three cases demonstrating expressive additional areas of acanthomatous or granular pattern.

3.2 | BRAF mutational status of the samples

Real-time PCR was performed to evaluate the presence of BRAF-V600E mutation in twelve ameloblastoma cases with functional

DNA available. Nine of 12 analyzed ameloblastomas (82%) showed the BRAF-V600E mutation.

3.3 | Analysis of the metabolic profile of FFPE specimens

PCA and total ion chromatogram (TIC) overlay were applied to overview the quality of the system. A tight clustering of QCs in a well-defined area of the plot (Figure S1a) and a proper overlay of the chromatograms (Figure S1b) was observed, confirming the robustness and stability of the procedures.

Mass spectrometry analysis of sample extracts allowed the identification of 26 metabolites. The list of the compounds along with their respective biochemical and physical properties are shown in Table 1. Most of the identified metabolites were classified as amino acids, peptides, and conjugates, accounting for 23.08% of the total, and all the classes of the identified compounds are represented in Figure S2.

3.4 | Detecting metabolic differences between ameloblastoma and dental follicles

In order to pinpoint the metabolic differences and similarities between ameloblastoma and dental follicles, comparisons were performed using a PLS-DA built with the identified metabolites. Tumor specimens were shown to cluster apart from normal tissue. The quality parameter, Q^2 , which was 0.708, indicated a good fit and prediction ability of the model (Figure 1A). A CV-ANOVA was done to evaluate the statistical significance of the analysis, and a *P*-value of 0.005 was obtained, indicating a significant separation of the groups (Figure 1B). To avoid model overfitting, a permutation test with 100 interactions was used. The intercepts of R^2 and Q^2 were, respectively, 0.448 and -0.295, demonstrating a valid PLS-DA model.

An unsupervised hierarchical clustering analysis was performed using the mean ionic abundance of the identified metabolites in each patient. A result similar to the observed in PLS-DA was obtained (Figure 1C). Dental follicles formed a separate cluster containing almost all normal samples, except for one case. In contrast, all tumor specimens were grouped together in the same cluster.

To identify the metabolites that contributed most to the discrimination of groups within the PLS-DA model, metabolites with variable importance in projection (VIP) above 1.0 and/or a *P*-value below 0.05 calculated by univariate analysis, including Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test, were identified. In total, 11 metabolites showed significant differences in abundance between ameloblastoma and dental follicles (Table 2). All of these compounds were increased in tumor specimens, with fold changes ranging from 1.03 to 5.04.

3.5 | Alterations in metabolic pathways in ameloblastoma

To determine the biological pathways that are altered in ameloblastoma in comparison with follicles, a metabolic pathway enrichment

TABLE 1 Metabolites detected by GC-MS and their respective chemical and physical properties

Metabolite	Molecular formula	Biochemical classification	Monoisotopic mass	FC
2-butyne-1,4-diol	C ₄ H ₆ O ₂	Organooxygen compounds	86.037	1.005
2-hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	Organic acids and derivatives	104.047	1.017
2-hydroxypyridine	C ₅ H ₅ NO	Organoheterocyclic compounds	95.037	1.040
3,7-dimethyl-1-octanol	C ₁₀ H ₂₂ O	Lipids and sterols	158.167	1.021
Benzene-1,2,4-triol	C ₆ H ₆ O ₃	Benzenoids	126.032	0.995
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	Organic acids and derivatives	122.037	0.996
Caprylic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fatty acids and conjugates	144.115	1.199
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	Amino acids, peptides and conjugates	75.032	1.149
Glycolic acid	C ₂ H ₄ O ₃	Organic acids and derivatives	76.016	1.043
Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Fatty acids and conjugates	270.256	1.005
L-(+) lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	Organic acids and derivatives	90.032	0.998
L-glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	Amino acids, peptides and conjugates	147.053	5.042
L-homoserine	C ₄ H ₉ NO ₃	Amino acids, peptides and conjugates	119.058	1.016
L-serine	C ₃ H ₇ NO ₃	Amino acids, peptides and conjugates	105.043	1.481
Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Fatty acids and conjugates	228.209	1.029
O-glycosyl compound (D-(+) trehalose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates	342.116	1.089
O-glycosyl compound (sucrose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates	342.116	0.963
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Fatty acids and conjugates	282.256	1.064
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Fatty acids and conjugates	256.240	1.013
Phosphoric acid	H ₃ O ₄ P	Inorganic acids and derivatives	97.977	1.096
Porphine	C ₂₀ H ₁₄ N ₄	Organoheterocyclic compounds	310.122	1.015
Sugar alcohol (glycerol)	C ₃ H ₈ O ₃	Carbohydrates	92.047	1.033
Sugar alcohol (mannitol/sorbitol ^a)	C ₆ H ₁₄ O ₆	Carbohydrates	182.079	0.993
Urea	CH ₄ N ₂ O	Nitrogenous compounds and polyamines	60.032	1.040
β-cyano-L-alanine	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	Amino acids, peptides and conjugates	114.043	1.104
β-alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	Amino acids, peptides and conjugates	89.048	1.022

Fold changes were determined by dividing the mean ionic abundance of ameloblastoma samples to those of dental follicles. FC, fold change.

^aIt is not possible to discriminate isomers with close retention time using GC-MS.

analysis was performed using the metabolites that differed significantly in abundance between these samples (Table 3). Only pathways enriched with at least three metabolites from the input and a *P*-value <0.05 were selected. Metabolic pathways involved in aminoacyl-tRNA biosynthesis, cyanoamino acid metabolism, and ABC transporters were found to distinguish tumor and normal tissue.

3.6 | Comparative evaluation of the metabolic profile of primary and recurrent manifestations

As ameloblastoma is an odontogenic tumor with high recurrence risk,³ we compared the metabolic profile of primary and recurrent tumors to verify whether these manifestations could present different profiles in metabolism. However, no metabolic signature of recurrence could be defined in the present study, according to multivariate and univariate statistical analyses.

3.7 | Relationship between BRAF-V600E and metabolic profile

In order to verify whether the BRAF-V600E mutation contributes to the alterations detected in ameloblastoma, the metabolic profiles of ameloblastoma samples with and without this mutation were compared. In univariate analysis, glycerol (*P* = 0.02) levels were significantly higher in tumors with wild-type alleles. However, no significant difference was observed in PLS-DA and CV-ANOVA.

4 | DISCUSSION

Ameloblastoma is associated with high local morbidity, and a better understanding of its molecular alterations may provide useful information for the identification of biomarkers with prognostic potential and new drugs for the treatment of more aggressive tumors. In this

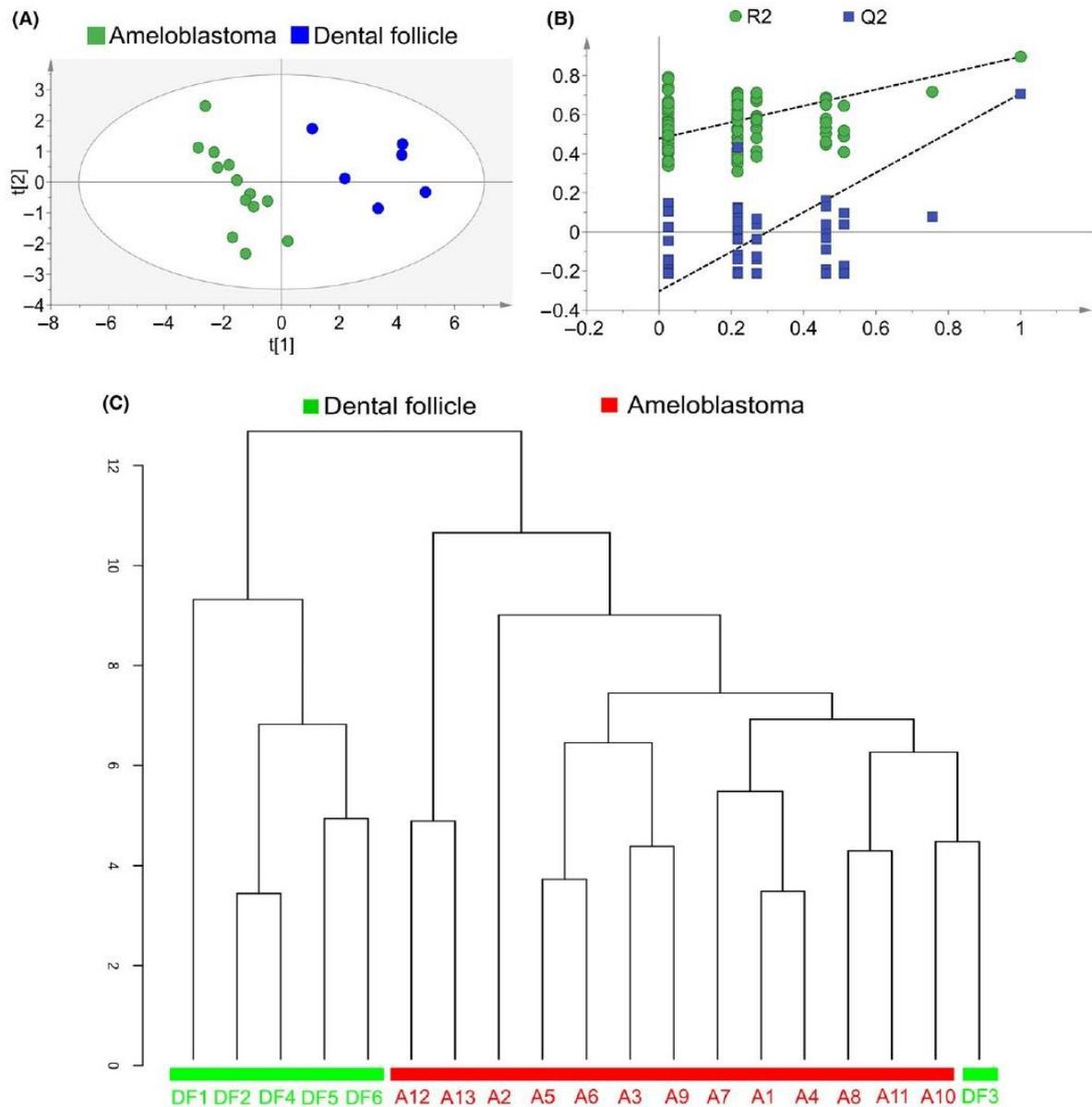


FIGURE 1 PLS-DA score plot and hierarchical clustering discriminate control and ameloblastoma patients. A, The PLS-DA model was built with identified metabolites using their mean abundance in each case. Green circles indicate tumor specimens and control specimens are indicated in blue. Quality parameters of the model: two components, explained variance $R^2Y = 0.896$, predicted variance $Q^2 = 0.708$ and P -value = 0.005. B, Validation of the model by permutation test with 100 iterations generated from ameloblastoma samples. Intercepts $R^2 = (0.0, 0.448)$ and $Q^2 = (0.0, -0.295)$. C, The hierarchical cluster was built with the mean ionic abundance of identified metabolites in each case, using the following parameters for construction: distance measure = Euclidean; clustering algorithm = complete-linkage. A, ameloblastoma; DF, dental follicles

study, we investigated the metabolic profile of ameloblastoma in comparison with normal odontogenic tissue. Since metabolite levels reflect the interaction between environmental factor, genetic background, enzymatic function, and metabolic processes,¹³ metabolomics is a valuable tool to provide new insights into the molecular pathogenesis of diverse neoplasias. FFPE samples were used in this

study, considering their wide availability and that are frequently accompanied by corresponding patient clinical history.

Although formalin fixation with paraffin embedding causes a global depletion of metabolites in comparison with fresh frozen tissues, tissue-based metabolomics on FFPE samples is still feasible and useful for the identification of novel metabolic biomarkers, to predict

and discriminate biological states and to study relevant metabolic pathways.¹⁴ In the present study, we were able to distinguish ameloblastoma specimens from dental follicles using FFPE samples, pointing out metabolic pathways that are potentially altered in this tumor.

One key finding of this study was the identification of 11 metabolites that were upregulated in ameloblastoma in comparison with normal odontogenic tissue. The use of these metabolites in pathway analysis enabled the identification of the metabolic pathways of aminoacyl-tRNA biosynthesis, cyanoamino acid metabolism, and ABC transporters as metabolic processes potentially upregulated in this odontogenic tumor.

Changes in the mechanisms involved in translation have been described in cancer, and the overexpression of tRNAs is one of the main processes associated with a high translational activity of tumor cells.^{15,16} In breast cancer, the higher expression of the tRNA^{Arg}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Ser}, and tRNA^{Tyr} is required to support the protein production that is necessary for tumor growth.¹⁷ In ameloblastoma, the aminoacyl-tRNA biosynthesis was found to be upregulated, suggesting an increased translational activity needed for tumor development.

The reprogramming of cell metabolism is frequently observed in cancer, with an intense breakdown of glucose for lactate production, despite sufficient oxygen levels for tumor growth and survival,

a phenomenon known as Warburg effect.¹⁸ The glycolysis-diverting pathways contributes to sustain the anabolic phenotype of cancer cells.¹⁹ The serine/glycine biosynthesis is a component of this pathway and has a pivotal role in tumor biology, contributing to the synthesis of biomolecules, that is, nucleic acids, proteins, and lipids.²⁰ The metabolite 3-phosphoglycerate, arising from the glycolytic pathway, is oxidized to serine by phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), and then, serine is converted to glycine. In previous studies, the overexpression of PHGDH was observed in melanoma,²¹ thyroid cancer types,²⁰ and colorectal cancer.²² In the present study, serine and glycine were found to have a higher abundance in ameloblastoma in comparison with dental follicles. Consistently, the levels of PHGDH were found to be significantly increased in ameloblastoma in comparison with dental follicles by proteomic analysis (data not published). The increase of these compounds suggests a potential upregulation of serine/glycine biosynthesis in ameloblastoma, providing the building blocks necessary for tumor growth.

The *BRAF-V600E* mutation is present in high frequency in ameloblastoma, ranging from 46% to 82% of the cases.³ In agreement, this mutation was observed in 82% of the samples included in the present study. Since *BRAF-V600E* mutations have been implicated as important regulators of metabolic processes in other neoplasms,²³ we hypothesized that this could also take place in ameloblastomas. Our results demonstrated significantly decreased levels of glycerol in tumor samples with this mutation in comparison with those carrying only wild-type allele of *BRAF*. The decreased levels of glycerol in ameloblastomas with *BRAF-V600E* might result from increased glycolysis rate. Glycerol can be incorporated into this glycolytic pathway after its conversion to dihydroxyacetone phosphate. Addiction to glycolysis was observed in melanoma,²⁴ colorectal,²⁵ and thyroid cancers cell models with mutated *BRAF*.²⁶ Although our results suggest that *BRAF-V600E* may contribute to some of the metabolic alterations found in ameloblastoma and are in agreement with previous studies on malignant diseases harboring this mutation, it is also known that the effects of *BRAF* mutations are dependent on the genetic context;²³ therefore, the metabolic disturbances associated with this mutation in the ameloblastoma context need to be further addressed using a larger set of patients and different analytical platforms.

Ameloblastoma exhibits a higher membrane and cytoplasmic GLUT-1 expression, the most important transmembrane glucose transporter protein associated with energy production through the glycolytic pathway, in relation to dental germ. However, the levels

TABLE 2 Statistically significant differences in the abundance of metabolites between ameloblastoma and dental follicles

Metabolite	FC	VIP score	P-value
2-hydroxypyridine	1.04		0.0088
β-cyano-L-alanine	1.10	1.10	8.8E-04
Caprylic acid	1.20	1.34	1.7E-04
Glycerol	1.03		0.0148
Glycine	1.15	1.42	2.0E-06
L-glutamic acid	5.04	3.42	1.0E-07
L-serine	1.48	1.49	9.8E-04
Myristic acid	1.03		0.0036
Phosphoric acid	1.10	1.01	0.0142
D-(+) trehalose	1.09	1.02	0.0410
Glycolic acid	1.04		0.0405

FC, fold change; VIP, variable importance in projection. Fold changes were determined by dividing the mean ionic abundance of ameloblastoma samples to those of dental follicles.

Metabolic pathways	P-value	FDR correction	Metabolites in pathway (n)
ABC transporters	1.04E-06	3.9E-05	5
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6.74E-04	1.4E-02	3
Cyanoamino acid metabolism	3.85E-05	3.0E-03	3

P-value and FDR demonstrate the significance of pathway analysis ($P < 0.05$).

TABLE 3 Metabolic pathways enriched from metabolites significantly differing between ameloblastoma and dental follicle samples

of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), which is a transcription factor involved in the adaptation of stressful condition such as hypoxia, were shown to be altered in 27.3% of 57 cases investigated by Sánchez-Romero et al.,²⁷ with only one case displaying nuclear positivity. These findings suggested that mechanisms other than hypoxia might be involved in the differential expression of GLUT-1 in ameloblastoma.²⁷ Interestingly, colorectal cancer cells with *BRAF-V600E* mutation show increased levels of GLUT-1 irrespective of HIF-1 α regulation.²⁵ In addition, the analysis of glucose metabolism in ameloblastoma using ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG) and FDG positron emission tomography demonstrated active uptake of FDG in tumor tissues,²⁸ further corroborating an important role of glucose metabolism in ameloblastoma pathophysiology. Therefore, the comprehensive evaluation of the glycolytic process in this disease, as well as its association with *BRAF* mutational status, is issues that still need to be resolved in ameloblastoma.

Despite the evidences obtained in this study demonstrating the metabolic disturbances in ameloblastomas, these metabolic alterations identified here lack functional validation, although many of the results are in agreement with the literature. Moreover, GC-MS is a robust platform with high accuracy and reliability in the identification of compounds; however, it presents the drawback that only a few compounds can be volatilized and analyzed.²⁹ Therefore, to get a wider view of the alterations in ameloblastoma metabolic profile and to identify a recurrence metabolic signature, other analytical platforms should be employed to complement our results.

In conclusion, ameloblastoma shows a different metabolic profile from dental follicles, presenting a higher abundance of most metabolites. There was no difference in the molecular signature between primary and recurrent tumors. The *BRAF-V600E* mutation is associated with metabolic changes in ameloblastoma. Although this study presents novel aspects related to ameloblastoma metabolism, further studies are necessary to clarify their role in tumor origin and progression.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ORCID

Ricardo Santiago Gomez  <https://orcid.org/0000-0001-8770-8009>

Felipe Paiva Fonseca  <https://orcid.org/0000-0002-6657-4547>

REFERENCES

- McClary AC, West RB, McClary AC, et al. Ameloblastoma: a clinical review and trends in management. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol*. 2016;273(7):1649-1661.
- Fregnani ER, Perez DEC, Almeida OP, et al. *BRAF-V600E* expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. *Histopathology*. 2017;70(3):473-484.
- Brown NA, Betz BL. Ameloblastoma: a review of recent molecular pathogenetic discoveries. *Biomark Cancer*. 2015;7:19-24.
- Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumors. *Head Neck Pathol*. 2017;11(1):68-77.
- Fonseca FP, de Almeida P, Vargas A, Gonçalves F, Corrêa S. Ameloblastic carcinoma (secondary type) with extensive squamous differentiation areas and dedifferentiated regions. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121(6):e154-e161.
- Loyola AM, Cardoso SV, de Faria PR, et al. Ameloblastic carcinoma: a Brazilian collaborative study of 17 cases. *Histopathology*. 2016;69(4):687-701.
- Yang M, Soga T, Pollard PJ, Yang M, Soga T, Pollard PJ. Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3652-3658.
- Wojakowska A, Chekan M, Marczak Ł, et al. Detection of metabolites discriminating subtypes of thyroid cancer: molecular profiling of FFPE samples using the GC/MS approach. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;417:149-157.
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779-787.
- Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib - mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(24):10038-10048.
- Pereira NB, Pereira KMA, Coura BP, et al. *BRAF-V600E* mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. *Oral Pathol Med*. 2016;45(10):780-785.
- Chong J, Soufan O, Li C, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W486-W494.
- Buck A, Ly A, Balluff B, et al. High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples. *J Pathol*. 2015;237(1):123-132.
- Cacciatore S, Zadra G, Bango C, et al. Metabolic profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded prostate cancer tissues. *Mol Cancer Res*. 2017;15(4):439-447.
- Zhou Y, Goodenbour JM, Godley LA, Wickrema A, Pan T. High levels of tRNA abundance and alteration of tRNA charging by bortezomib in multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(2):160-164.
- Grewal SS. Why should cancer biologists care about tRNAs? tRNA synthesis, mRNA translation and the control of growth. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(7):898-907.
- Pavon-eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(21):7268-7280.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033.
- Deberardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200.
- Sun WY, Kim HM, Jung WH, Koo JS. Expression of serine/glycine metabolism-related proteins is different according to the thyroid cancer subtype. *J Transl Med*. 2016;14(1):168.
- Mullarky E, Mattaini KR, Vander Heiden MG, Cantley LC, Locasale JW. PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(6):1112-1115.

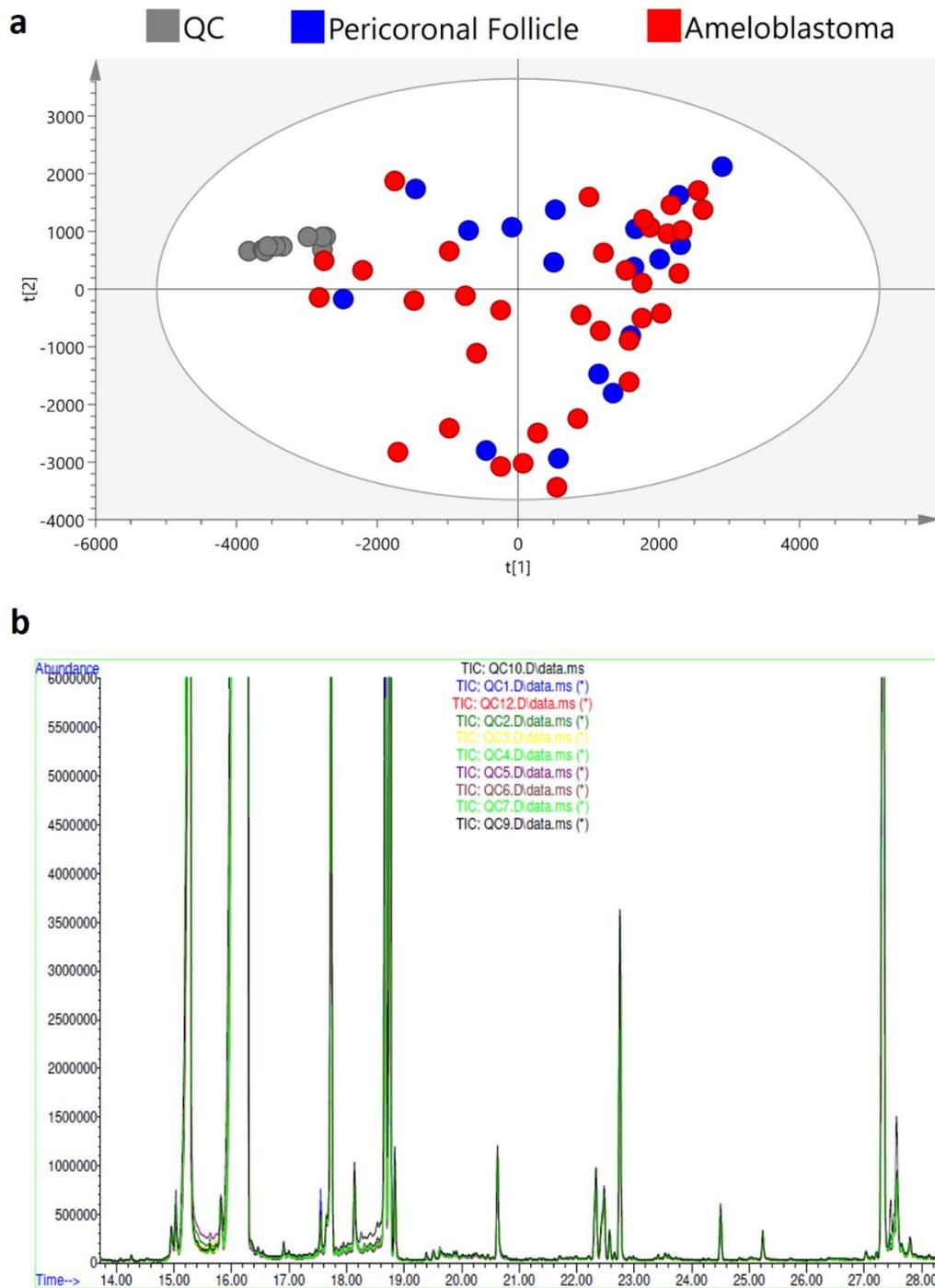
22. Jia X, Zhang S, Zhu H, et al. Increased expression of PHGDH and prognostic significance in colorectal cancer. *Transl Oncol*. 2016;9(3):191-196.
23. Haq R, Fisher DE, Widlund HR. Molecular pathways: BRAF induces bioenergetic adaptation by attenuating oxidative phosphorylation. *Clin Cancer Res*. 2014;20(9):2257-2263.
24. Hall A, Meyle KD, Lange MK, et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600E BRAF oncogene. *Oncotarget*. 2013;4(4):584-599.
25. Yun J, Rago C, Cheong I, et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science*. 2009;325(5947):1555-1559.
26. Lee MH, Lee SE, Kim DW, et al. Mitochondrial localization and regulation of BRAF V600E in thyroid cancer: a clinically used RAF inhibitor is unable to block the mitochondrial activities of BRAF V600E. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):19-30.
27. Sánchez-Romero C, Bologna-Molina R, Mosqueda-taylor A, De AO. Immunohistochemical expression of GLUT-1 and HIF-1 α in tooth germ, ameloblastoma, and ameloblastic carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2016;24(5):410-418.
28. Otsuru M, Aoki T, Tsukinoki K, Karakida K, Yamazaki H, Kaneko A. Usefulness of 18 F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for detecting ameloblastoma, with special reference to glucose transporter-1 expression. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(8):1761-1765.
29. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, Garcia A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;147:149-173.

SUPPORTING INFORMATION

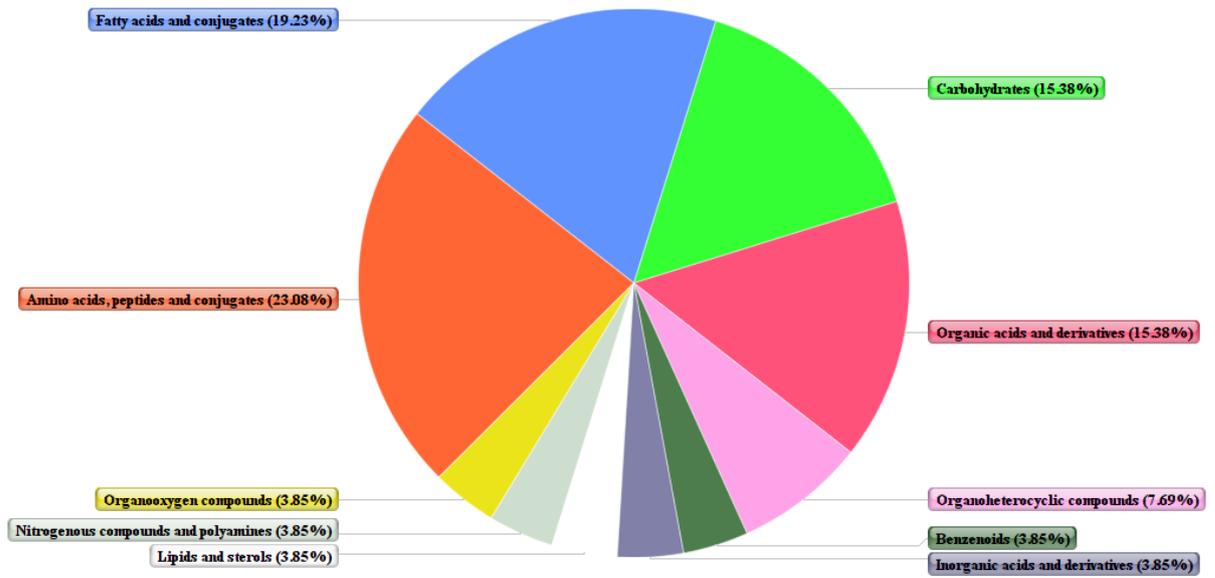
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Duarte-Andrade FF, Silva AMB, Vítório JG, et al. The importance of BRAF-V600E mutation to ameloblastoma metabolism. *J Oral Pathol Med*. 2019;00:1-8. <https://doi.org/10.1111/jop.12839>

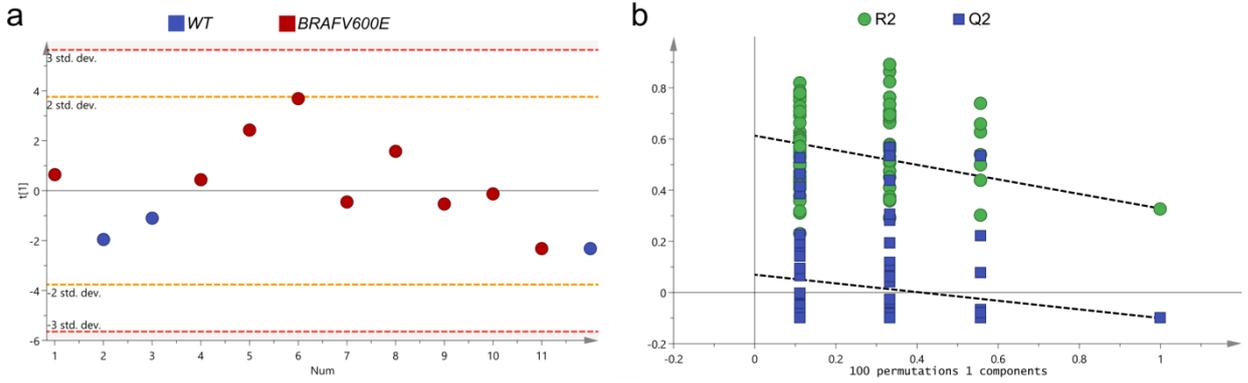
SUPPLEMENTARY MATERIALS



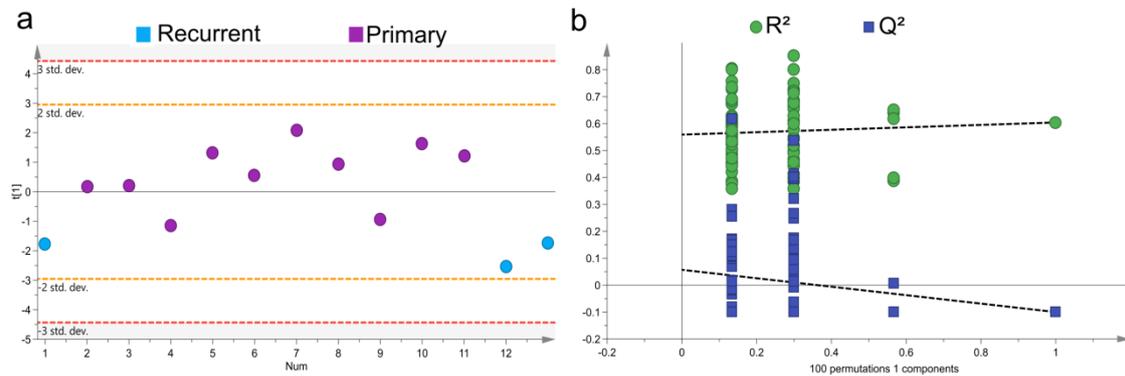
S1 Figure. Assessment of GC-MS analytical performance using pooled QC samples. (a) PCA score plot for total features showing QC samples clustering. **(b)** Representative overlay of TIC of quality control samples.



S2 Figure. Classes of metabolites identified in FFPE tissue extracts. Classification was determined according to available information on KEGG, Chempider and HMDB.



S3 Figure. Comparison of ameloblastoma samples with *BRAF-V600E* and wild-type alleles. (a) PLS-DA plot constructed with identified metabolites, using one component. Quality parameters of the model: R^2Y : 0.435, Q^2 : -0.1, p-value: 1.0. **(b)** Permutation test with 100 permutations, with intercepts $R^2 = (0.0, 0.637)$ and $Q^2 = (0.0, -0.0444)$.



S4 Figure. Comparative evaluation of ameloblastoma manifestations (primary and recurrent). **(a)** PLS-DA built comparing primary and recurrent cases. R^2Y : 0.604, Q^2 : -0.1, p-value: 1.0. **(b)** Permutation test (100 iterations), showing intercept $R^2 = (0.0, 0.559)$ and $Q^2 = (0.0, 0.0571)$

Patient	Age (Y)	Gender	Associated teeth	Symptoms and signs	Radiographic findings
PF1	21	M	38	Asymptomatic	Radiolucency surrounding the teeth
PF2	18	M	38	NS	Radiolucency surrounding the teeth
PF3	15	M	48	Asymptomatic	NS
PF4	16	F	NS	Asymptomatic	Radiolucency
PF5	19	M	48	Asymptomatic	Radiolucency surrounding the teeth
PF6	09	F	NS*	Asymptomatic	Radiolucency

S1 Table. Clinical data of pericoronal follicles' patients.

Abbreviations: PF: pericoronal follicles; NS: not specified; F: female; M: male

S2 Table. Metabolites detected by GC-MS and their respective chemical and physical properties

Metabolite	Molecular Formula	Biochemical classification	Monoisotopic mass	FC
2-hydroxypyridine	C ₅ H ₅ NO	Organoheterocyclic compounds	95.0371	1.040
L-(+) lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	Organic acids and derivatives	90.0317	0.998
3,7-dimethyl-1-octanol	C ₁₀ H ₂₂ O	Lipids and sterols	158.167	1.021
glycolic acid	C ₂ H ₄ O ₃	Organic acids and derivatives	76.016	1.043
2-hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	Organic acids and derivatives	104.047	1.017
2-butyne-1,4-diol	C ₄ H ₆ O ₂	Organooxygen compounds	86.037	1.005
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	Organic acids and derivatives	122.037	0.996
Urea	CH ₄ N ₂ O	Nitrogenous compounds and polyamines	60.032	1.040
Caprylic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fatty acids and conjugates	144.115	1.199
Phosphoric acid	H ₃ O ₄ P	Inorganic acids and derivatives	97.977	1.096
Sugar alcohol (Glycerol)	C ₃ H ₈ O ₃	Carbohydrates	92.047	1.033
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	Amino acids, peptides and conjugates	75.032	1.149
Porphine	C ₂₀ H ₁₄ N ₄	Organoheterocyclic compounds	310.122	1.015
L-serine	C ₃ H ₇ NO ₃	Amino acids, peptides and conjugates	105.043	1.481
β -cyano-L-alanine	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	Amino acids, peptides and conjugates	114.043	1.104
β-alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	Amino acids, peptides and conjugates	89.048	1.022
Benzene-1,2,4-triol	C ₆ H ₆ O ₃	Benzenoids	126.032	0.995
L-glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	Amino acids, peptides and conjugates	147.053	5.042
L-homoserine	C ₄ H ₉ NO ₃	Amino acids, peptides and conjugates	119.058	1.016
Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Fatty acids and conjugates	228.209	1.029
Sugar alcohol (mannitol/sorbitol*)	C ₆ H ₁₄ O ₆	Carbohydrates	182.079	0.993
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Fatty acids and conjugates	256.240	1.013
Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Fatty acids and conjugates	270.256	1.005
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Fatty acids and conjugates	282.256	1.064
O-glycosyl compound (sucrose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates	342.1162	0.963
O-glycosyl compound (D-(+) trehalose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates	342.1162	1.089

*It is not possible to differentiate isomers with very close retention time using GC-MS. FC: fold change

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ameloblastoma é um tumor odontogênico agressivo que está associado a alta morbidade. Entender melhor as alterações moleculares envolvidas em sua patogênese pode fornecer informações úteis para a identificação de biomarcadores, que por sua vez podem contribuir com a predição do prognóstico dos pacientes afetados e possibilitar o uso de novos fármacos para o seu tratamento.

O presente estudo utilizou como ferramenta metodológica a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas que representa uma abordagem contemporânea e uma valiosa aliada dos estudos metabolômicos de diferentes sistemas biológicos. Assim, foi possível distinguir entre amostras de ameloblastoma e epitélio odontogênico normal derivado de folículos dentários 11 metabólitos que encontravam-se em maior abundância no ameloblastoma, assim como apontar vias metabólicas potencialmente alteradas neste tumor que estão relacionadas a mecanismos envolvidos na proliferação celular e crescimento tumoral.

Assim, o ameloblastoma apresenta um perfil metabólico diferente do epitélio odontogênico normal derivado de folículos dentários. Não houve diferença na assinatura metabólica entre tumores primários e recorrentes. Entretanto, observamos uma sutil mudança metabólica em função da presença da mutação *BRAF-V600E*, representada pela diminuição nos níveis de glicerol em ameloblastomas mutados. Embora este trabalho apresente novos aspectos relacionados ao metabolismo do ameloblastoma, são necessários estudos adicionais para esclarecer seu papel na origem e progressão do tumor. Como perspectivas futuras, sugere-se a validação funcional dos achados do presente estudo e a utilização de outras plataformas analíticas para complementação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- BRIERLEY, D. J.; SPEIGHT, P. M.; JORDAN, R. C. K. Current concepts of odontogenic tumours—an update. **Diagnostic Histopathology**, Los Angeles, v. 23, n. 6, p. 266-274, Jun. 2017.
- BROWN, N. A.; BETZ, B. L. Ameloblastoma: a review of recent molecular pathogenetic discoveries. **Biomarkers in cancer**, Auckland, v. 7, p. 19-24, Out. 2015.
- CACCIATORE, S.; ZADRA, G.; BANGO, C.; PENNEY, K. L.; TYEKUCHEVA, S.; YANES, S.; LODA, M. Metabolic profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded prostate cancer tissues. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 439-447, Abr. 2017.
- DINIZ, M. G.; GOMES, C. C.; GUIMARÃES, B. V. A.; CASTRO, W. H. LACERDA, J. C. T.; CARDOSO, S. V.; de FARIA, P. R.; DIAS, F. L.; EISENBERG, A. L. A.; LOYOLA, A. M.; GOMEZ, R. S. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumor Biology**, Tokyo, v. 36, n. 7, p. 5649-5653, Jul. 2015.
- FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. **Current protocols in molecular biology**, New York, v. 114, n. 1, p. 30.4.1-30.4.32, Abr. 2016.
- GOMES, C. C.; DINIZ, M. G.; GOMEZ, R. S. Progress towards personalized medicine for ameloblastoma. **The Journal of pathology**, Oxford, v. 232, n. 5, p. 488-491, Abr. 2014.
- KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; VAN DER GREEF, J.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, New York, v. 7, n. 3, p. 307-328, Set. 2011.
- KLUPCZYNSKA, A.; DEREZINSKI, P.; KOKOT, Z. J. Metabolomics in medical sciences - trends, challenges and perspectives. **Acta poloniae pharmaceutica**, Warszawa, v. 72, n. 4, p. 629-641, Jul. 2015.
- MCCLARY, A. C.; WEST, R. B.; MCCLARY, A. C.; POLLACK, J. R.; FISCHBEIN, N. J.; HOLSINGER, C. F.; SUNWOO, J.; COLEVAS, A. D.; SIRJANI, D. Ameloblastoma: a clinical review and trends in management. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, Heidelberg, v. 273, n. 7, p. 1649-1661, Jul. 2016.

PEACOCK, Z. S. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 475-486, Nov. 2017.

PEREIRA, N. B.; PEREIRA, K. M. A.; COURA, B. P.; DINIZ, M. G.; CASTRO, W. H.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. BRAFV 600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen , v. 45, n. 10, p. 780-785, Nov. 2016.

WOJAKOWSKA, A.; CHEKAN, M.; MARCZAK, L.; POLANSKI, K.; LANGE, D. PIETROWSKA, M.; WIDLAK, P. Detection of metabolites discriminating subtypes of thyroid cancer: molecular profiling of FFPE samples using the GC/MS approach. **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v. 417, p. 149-157, Dez. 2015.

WRIGHT, J. M.; VERED, M. Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumors. **Head and neck pathology**, Secaucus, v. 11, n. 1, p. 68-77, Mar. 2017.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico do Ameloblastoma

Pesquisador: Felipe Paiva Fonseca

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 97428718.5.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.059.929

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto das grandes áreas de Ciências da Saúde e Biológicas, cuja proposta é realizar um estudo metabólico de ameloblastoma. Conforme o proponente descreve, o ameloblastoma é uma neoplasia odontogênica epitelial originada do aparato dentário embrionário, cuja patogênese envolve mutações em genes que regulam a proliferação celular. O tumor apresenta formas clínicas e histopatológicas diversas, comportamento clínico agressivo e potencial para sofrer malignização. A metabolômica é uma técnica bioquímica que utiliza a espectrometria de massa e a bioinformática para identificar e quantificar, em uma amostra biológica, os produtos finais das atividades bioquímicas teciduais: os metabólitos. Metabólitos fornecem uma boa correlação com o fenótipo tecidual. Desta maneira, o estudo do perfil metabólico produzido por tumores odontogênicos pode contribuir para o entendimento da patogenia destas lesões, visto não haver a aplicação da metabolômica neste contexto, podendo os resultados ajudar no aprimoramento do manejo clínico destes tumores. Serão utilizadas 14 amostras de ameloblastoma e 6 amostra de tecido odontogênico morfológicamente normal obtidos de casos diagnosticados como capuz pericoronário obtidas de blocos de parafina arquivados no Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFG). Os diagnósticos serão revisados e confirmados por meio da análise de novos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina e revisados por um patologista oral experiente de acordo com os critérios presentes na última classificação de tumores odontogênicos da

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.059.929

Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017). Como critérios de inclusão serão selecionados casos de pacientes com diagnóstico de ameloblastoma confirmados e que possuam tecido parafinado disponível para os ensaios laboratoriais.

Objetivo da Pesquisa:

Como objetivo primário é descrito avaliar o perfil metabólico de ameloblastoma. Como objetivos secundários são descritos Identificar quais as vias metabólicas mais ativas e quais os metabólitos mais presentes no ameloblastoma, além de identificar possíveis alterações, e comparar com tecido odontogênico morfológicamente normal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relacionados à quebra de confidencialidade dos participantes. Benefícios: Compreensão a respeito da etiopatogenia do ameloblastoma e identificação de possíveis biomarcadores

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, com abordagem inovadora que poderá trazer contribuições para o manejo da neoplasia odontológica estudada. É um pesquisa de risco baixo, por não envolver intervenções diretas ao paciente, mas que prevê o uso de material biológico humano, no caso em questão, de biópsias incluídas em parafina. Também envolve consulta a prontuário dos pacientes. Previsão de término em 2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados Folha de Rosto assinado pela vice-diretora da Faculdade de Odontologia, Parecer consubstanciado aprovado pela Câmara Departamental do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgias Odontológicas, Formulário de Informações Básicas, Projeto Completo, Termo de Constituição de Biorrepositório. Apresentados TCLE, TCLE para responsável e TALE, além de Carta resposta.

Recomendações:

Corrigir, no TCLE para responsável, a linguagem do trecho correspondente a autorização de uso de material biológico (ONDE SE LÊ: () Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa. () Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa,..." CORRIGIR PARA " () Concordo que o material biológico do(da) menor sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa. () Concordo que o meu material biológico do(a) menor sob minha responsabilidade possa ser utilizado em outras pesquisa,..."

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 3.059.929

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O proponente atendeu as solicitações da diligência.

SMJ, o projeto Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico do Ameloblastoma do pesquisador Felipe Paiva Fonseca, está aprovado. Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1193716.pdf	18/11/2018 14:00:48		Aceito
Outros	Carta_Resposta2.pdf	18/11/2018 14:00:24	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Mestrado_com_alteracoes_COEP2.pdf	18/11/2018 13:59:59	André Myller Barbosa Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	18/11/2018 13:59:28	André Myller Barbosa Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel.pdf	18/11/2018 13:59:16	André Myller Barbosa Silva	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.059.929

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_paciente.pdf	18/11/2018 13:58:55	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Outros	Termo_constituicao_biorrepositorio.pdf	18/10/2018 14:46:42	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	23/08/2018 12:40:46	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_local_de_pesquisa.pdf	23/08/2018 12:40:07	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Andre_Myller_Barbosa_Silva.pdf	23/08/2018 09:49:06	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Ricardo_Santiago_Gomez.pdf	23/08/2018 09:44:37	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Felipe_Paiva_Fonseca.pdf	23/08/2018 09:41:33	André Myller Barbosa Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_consultado_com_aprovacao_da_camara.pdf	23/08/2018 09:39:56	André Myller Barbosa Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 05 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido - paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTE

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte do seu material biológico (o tecido que foi retirado quando você fez a biópsia) que está armazenado no Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. O seu material biológico será usado somente nesta pesquisa ou, se o (a) Sr. (a) concordar, em outras futuras. Nesta pesquisa pretendemos avaliar o perfil metabólico do ameloblastoma, identificar quais as vias metabólicas mais ativas na doença e quais os metabólitos mais presentes, quando comparado com tecido bucal normal. Isso significa que iremos avaliar substâncias presentes na lesão (ameloblastoma) que foi retirada, o que pode ajudar futuramente no tratamento de outras pessoas com esse problema. Para esta pesquisa usaremos técnicas e aparelhos específicos que identificam essas substâncias. O armazenamento e descarte de todos os materiais utilizados seguirão as normas da UFMG e dos órgãos ambientais competentes. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em possível quebra de confidencialidade de dados como seu nome, idade e sexo. Porém, ressalta-se que tomaremos todo o cuidado possível para evitar isso, uma vez que as consultas às fichas com dados dos pacientes serão realizadas apenas com o objetivo de observar dados clínicos e de evitar que um mesmo indivíduo participe duas vezes da pesquisa. Além disso, somente os pesquisadores responsáveis terão acesso a estas informações. A pesquisa contribuirá para a compreensão e respeito das causas e maneiras como acontece o ameloblastoma e para a identificação futura de exames e medicamentos que poderão ajudar a tratar esta doença de forma menos mutiladora para o paciente.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito a indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização deste termo. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (a) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 3202 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Prof. Felipe Paiva Fonseca

Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha

CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefone: (31)3409-2403

E-mail: felipepfonseca@hotmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Nome completo do Pesquisador Responsável: André Myller Barbosa Silva

Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha

CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefone: (31)3409-2403

E-mail: andremyller@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

ANEXO C - Termo de assentimento livre e esclarecido

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que se chama “**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA**” e que será feita pela Faculdade de Odontologia da UFMG. Pedimos sua autorização para utilizar, nessa pesquisa, o pedaço de tecido da lesão que foi retirada de sua boca e que está guardado no laboratório da faculdade. Vamos ver quais substâncias tem nesse tecido e como estas substâncias fazem para dar esta doença na boca. Isso tudo usando máquinas e substâncias químicas certas para isso. Esta pesquisa vai ajudar a entender como o ameloblastoma acontece, podendo ajudar a criar exames novos e remédios para tratar quem tem essa doença. Faremos tudo de acordo com as leis da UFMG e do meio ambiente. Vamos usar alguns dados seus tirados da ficha clínica (idade, sexo, e características da doença), mas vamos tomar cuidado para que ninguém além de nós possa ver isso. Você pode escolher se podemos usar esse material somente para essa pesquisa ou se podemos usar também em outras.

Para participar deste estudo, você não precisa pagar nada e também não vai ganhar nenhum dinheiro. O seu nome não vai aparecer na pesquisa. Mas se você achar que aconteceu algo de ruim com você por causa desta pesquisa e se isso for comprovado, você tem direito a ser recompensado. Você poderá nos perguntar informações sobre o estudo sempre que quiser. Você participa só se quiser e não tem problema se não quiser participar: você será tratado da mesma forma. Se você resolver participar mas depois se arrepender, você também pode nos avisar e não participar mais. Sendo assim, nós não usaremos mais o seu pedaço de tecido que está guardado no laboratório. Quando a pesquisa acabar, nós podemos te mostrar tudo que descobrimos com ela, se você quiser.

Tem duas cópias deste documento: uma delas será guardada em um arquivo pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será dada a você. Nós guardaremos esses dados e o material da pesquisa por um tempo (5 anos) na sala 3202 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo eles serão jogados fora. Os pesquisadores vão usar suas informações somente para fazer esta pesquisa mesmo e tomarão todo o cuidado para que seu nome não apareça em nada, de acordo como mandam as leis brasileiras.

Eu, _____, que tenho a certidão de nascimento ou a carteira de identidade número _____ fui informado (a) dos motivos, maneira como será feita, partes boas e partes ruins da pesquisa chamada “**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA**”. Entendi tudo e minhas dúvidas foram respondidas. Sei que a qualquer momento posso fazer mais perguntas e pedir mais informações sobre o estudo. Posso também não participar mais dessa pesquisa se depois eu quiser.

() Concordo que o pedaço de tecido da lesão que foi retirada de minha boca pode ser usado só nesta pesquisa.

() Concordo que o pedaço de tecido da lesão que foi retirada de minha boca pode ser usado nesta pesquisa e também em outras. Se for usado em outras também, eu serei avisado pelo pesquisador novamente e vou assinar outro documento igual a este explicando como será usado o material.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste documento que foi assinado por mim e pelo pesquisador, que me deixou ler e respondeu todas as minhas perguntas e dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Prof. Felipe Paiva Fonseca
Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG
Telefone: (31)3409-2403
E-mail: felipefonseca@hotmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Nome completo do Pesquisador Responsável: André Myller Barbosa Silva
Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG
Telefone: (31)3409-2403
E-mail: andremyller@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.
 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

ANEXO D - Termo de consentimento livre e esclarecido para o responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - RESPONSÁVEL

Estamos convidando você a permitir a participação do (a) menor sob sua responsabilidade a participar da pesquisa “ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte do material biológico do (a) menor sob sua responsabilidade (o tecido que foi retirado quando ele (a) fez a biópsia) que está armazenado no Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. O material biológico do (a) menor sob sua responsabilidade será usado somente nesta pesquisa ou, se o (a) Sr. (a) concordar, em outras futuras também. Nesta pesquisa pretendemos avaliar o perfil metabólico do ameloblastoma, identificar quais as vias metabólicas mais ativas na doença e quais os metabólitos mais presentes, quando comparado com tecido bucal normal. Isso significa que iremos avaliar substâncias presentes na lesão (ameloblastoma) que foi retirada, o que pode ajudar futuramente no tratamento de outras pessoas com esse problema. Para esta pesquisa usaremos técnicas e aparelhos específicos que identificam essas substâncias. O armazenamento e descarte de todos os materiais utilizados seguirão as normas da UFMG e dos órgãos ambientais competentes. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em possível quebra de confidencialidade de dados como nome, idade e sexo do (a) menor sob sua responsabilidade. Porém, ressalta-se que tomaremos todo o cuidado possível para evitar isso, uma vez que as consultas às fichas com dados dos pacientes serão realizadas apenas com o objetivo de observar dados clínicos e de evitar que um mesmo indivíduo participe duas vezes da pesquisa. Além disso, somente os pesquisadores responsáveis terão acesso a estas informações. A pesquisa contribuirá para a compreensão a respeito das causas e maneiras como acontece o ameloblastoma e para a identificação futura de exames e medicamentos que poderão ajudar a tratar esta doença de forma menos mutiladora para o paciente.

Para participar deste estudo o (a) menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o (a) menor sob sua responsabilidade tem assegurado o direito a indenização. O Sr. (a) e o (a) menor sob sua responsabilidade terão o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejarem e ele (a) estará livre para participar ou recusar-se a participar e, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, o Sr. (a) pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico do (a) menor sob sua responsabilidade armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização deste termo. A permissão para a participação do (a) menor sob sua responsabilidade é voluntária, e a recusa em permitir não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que ele é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir do material biológico do (a) menor sob sua responsabilidade, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão e a do (a) o menor sob sua responsabilidade. O (A) menor sob sua responsabilidade não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desta pesquisa.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 3202 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade do (a) menor sob sua responsabilidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resoluções N° 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ e responsável pelo (a) menor _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO AMELOBLASTOMA”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de autorizar a participação do (a) menor sob minha responsabilidade se assim o desejar.

- () Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.
- () Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do responsável pelo menor: _____

Declaro que permito a participação do (a) menor sob minha responsabilidade nesta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do responsável pelo (a) menor _____ Data _____

Assinatura do responsável pelo (a) menor _____

Nome completo do Pesquisador Responsável: Prof. Felipe Paiva Fonseca
Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG
Telefone: (31)3409-2403
E-mail: felipefonseca@hotmail.com

Assinatura do pesquisador responsável _____ Data _____

Nome completo do Pesquisador Responsável: André Myller Barbosa Silva
Endereço: Faculdade de Odontologia – UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG
Telefone: (31)3409-2403
E-mail: andremyller@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando) _____ Data _____

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.
 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

ANEXO E – Termo de constituição de biorrepositório

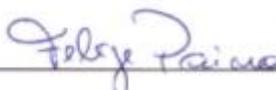
O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa “Análise do Perfil Metabólico do Ameloblastoma”, a ser gerenciado pelo pesquisador Professor Doutor Felipe Paiva Fonseca, com participação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha - CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG, fundação pública, CNPJ nº 17.217.985/0001-04 e do professor Ricardo Santiago Gomez, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha - CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG, fundação pública, CNPJ nº 17.217.985/0001-04, conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto nas Resoluções nº 441/11 e nº 466/12, ambas do CNS.

- 1- O Biorrepositório, constituído por amostras de biópsias de tumor e de tecido normal bucal atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais / Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial, inscrita no CNPJ sob o nº 17.217.985/0001-04 e situada na Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha - CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG;
- 2- O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em temperatura ambiente até sua utilização;
- 3- O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG);
- 4- As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto;
- 5- A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Projeto de Pesquisa e mediante aprovação da análise ética;
- 6- O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador, competindo aos acordantes o cumprimento das disposições aqui constantes e observância das normas contidas no regulamento de Biorrepositório;
- 7- A requisição de amostras durante a vigência da pesquisa deverá ser feita por escrito e não poderá causar prejuízo ao regular desenvolvimento do Projeto de Pesquisa;
- 8- Havendo a retirada ou desistência por parte do participante da pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém

a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso, será facultado ao participante da pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;

- 9- Em caso de dissolução da parceria entre as instituições durante a vigência do projeto, a partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo que deverá ser submetido à análise de ética dos Comitês de Ética Institucionais;
- 10- Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o pesquisador responsável pelo projeto deverá manifestar seu interesse por escrito e assinado pelos pesquisadores e instituições parceiras. A partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo entre as instituições, que deverá ser submetido à análise ética dos Comitês de Ética em Pesquisa envolvidos;
- 11- Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução nº 441/2011 do CNS, deverá haver submissão de novo Projeto de Pesquisa ao Sistema CEP/CONEP;
- 12- Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da Cláusula 10;
- 13- Os casos não contemplados pelo presente Termo de Constituição de Biorrepositório serão submetidos à análise conjunta dos acordantes e resolvidos de comum acordo pelas partes envolvidas.

Assinaturas (com a inclusão de carimbos):


 Prof. Felipe Pariva Fonseca
 Patologia - UFMG
 CRO-MG 48.333

Pesquisador Principal do Projeto e Responsável pelo Biorrepositório

M^{re}. Cassia F. de Aguiar
 Chefe do CPC
 Faculdade de Odontologia - UFMG



Chefia do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas



Representante Legal da Instituição / Responsável Legal pela Instituição Acordante

Prof. Rogeli Tibúrcio Ribeiro da Cunha Peixoto
 Inscrição UFMG 134805
 Vice-Diretora da Faculdade de
 Odontologia/UFMG