

**SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA EM AMELOBLASTOMAS**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2020**

**Sara Ferreira Dos Santos Costa**

## **ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA EM AMELOBLASTOMAS**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Odontologia. Área de concentração em: Patologia Bucal.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez**

**Coorientador: Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca**

**Belo Horizonte**

**2020**

## Ficha Catalográfica

C837a Costa, Sara Ferreira dos Santos.  
2020 Análise proteômica quantitativa em ameloblastomas / Sara  
T Ferreira dos Santos Costa. -- 2020.

69 f.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez.  
Coorientador: Felipe Paiva Fonseca.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Ameloblastoma. 2. Proteômica. 3. Espectrometria de massas. 4. Metabolismo. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Fonseca, Felipe Paiva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB: 6/2727.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Análise proteômica quantitativa em ameloblastomas

**SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA**

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

Aprovada em 16 de outubro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

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

Prof(a). Karuza Maria Alves Pereira  
Universidade Federal do Ceará

Prof(a). Thaís dos Santos Fontes Pereira  
UFMG/CNPq

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

Prof(a). Fabrício Tinôco Alvim de Souza  
Centro Universitário UNA

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 21 / 10 / 2020.

Prof.ª. Isabela Almeida Pordeus  
Coordenadora  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Aos meus pais, Margarida e João, meus maiores incentivadores e base das minhas conquistas, por todo amor e dedicação.

Ao meu marido, Gilson, por ser um companheiro presente, que torce e vibra pelas minhas conquistas, e por atuar como um alicerce nos momentos de desafio.

## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, pela oportunidade de participar de sua equipe, por todos os ensinamentos no decorrer do mestrado e do doutorado e pelo exemplo de profissional ético e de excelência.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca, por todas as oportunidades, pela paciência e apoio, e por ser exemplo de ética, competência e dedicação.

À comissão examinadora da tese, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karuza Maria Alves Pereira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Ferreira de Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais dos Santos Fontes Pereira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovanna Ribeiro Souto e Prof. Dr. Fabrício Tinôco Alvim de Souza, por aceitarem o convite para analisar e contribuir com o trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, das áreas de Estomatologia e Patologia Bucal, Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Ferreira de Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tarcília Aparecida da Silva e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Carlos Caldeiras, por todo conhecimento compartilhado e discussões científicas que tivemos em sala de aula, clínica e laboratório.

Às professoras do Instituto de Ciências Biológicas, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Cavaliéri Gomes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa de Fátima Bernardes e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Gonçalves Diniz pela disponibilidade e valiosas contribuições nesta tese e outros trabalhos.

Aos amigos e amigas, Thaís, Núbia, Mariana, Camila, Leni, Lauren, Maria Sissa, Alcides, Humberto, Matheus, Filipe, Jéssica, Sâmila, agradeço pela convivência diária e as alegrias compartilhadas no decorrer da caminhada do curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais / Laboratório Nacional de Biociências / Laboratório de Espectrometria de Massas, com especial agradecimento a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Franco Paes Leme e MSc. Romênia Ramos Domingues.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por todo apoio financeiro fornecido.

## RESUMO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno caracterizado por crescimento lento localmente agressivo, alta morbidade e grande potencial de recidiva. Apesar dos avanços em bioinformática que levaram ao desenvolvimento de tecnologias que permitiram o estudo das ciências “ômicas”, há escassos estudos de proteômica em ameloblastomas. O nosso objetivo, portanto, foi realizar uma análise quantitativa do perfil proteômico de ameloblastomas em comparação a folículos pericoronários. No presente estudo, nós utilizamos a estratégia de proteômica *shotgun* para identificação de proteínas usando a combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massas em *tandem* (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; LC-MS/MS). Também foram realizadas análises de *cluster* e de enriquecimento funcional das proteínas que apresentaram abundâncias alteradas nos ameloblastomas. Nesse estudo realizou-se ainda avaliação do *status* de mutação em *BRAF* nos casos de ameloblastoma. Por fim, a validação dos resultados da etapa de proteômica foi feita por meio de imunistoquímica. A análise proteômica quantitativa comparativa resultou na identificação de 1.353 proteínas. Os ameloblastomas mostraram um perfil proteômico distinto daquele encontrado nos folículos dentais, com 33 proteínas super-reguladas e 21 para sub-reguladas. As proteínas super-reguladas estão envolvidas no metabolismo da glicose e nas vias de biossíntese de macromoléculas, indicando um mecanismo adaptativo de crescimento do tumor, enquanto a maioria das proteínas sub-reguladas desempenha papéis importantes na produção de energia celular mitocondrial e na regulação do metabolismo de oxidorreductase, sugerindo disfunção mitocondrial e resposta ao estresse oxidativo. *BRAF* p.V600E foi detectado na maioria dos ameloblastomas e pode estar relacionado à indução de fluxo glicolítico, assim como ao estresse oxidativo. Para investigar a ativação do sistema antioxidante, nós avaliamos a imunexpressão da enzima antioxidante denominada glutatona S-transferase ômega 1 (GSTO1), que foi super-regulada nos ameloblastomas. Os ameloblastomas mostraram imunexpressão de GSTO1 difusa e com intensidade moderada a forte, enquanto uma imunexpressão fraca ou negativa de GSTO1 foi observada nos folículos pericoronários. Nossa hipótese é que o ameloblastoma apresenta reprogramação metabólica glicolítica com alta geração de precursores biossintéticos. Além disso, foi observada uma baixa abundância de componentes respiratórios mitocondriais, o que está possivelmente associado à disfunção mitocondrial. Nós identificamos pela primeira vez alterações em vias metabólicas críticas que não só contribuem para a elucidação da patogênese do ameloblastoma, mas também podem ser alvos terapêuticos potenciais para esses tumores.

**Palavras-chave:** Ameloblastoma. Proteômica. Espectrometria de massas. Metabolismo.

## ABSTRACT

### Quantitative proteomic analysis in ameloblastomas

Ameloblastoma is a benign epithelial odontogenic tumor characterized by slow but locally aggressive growth, high morbidity and great potential for recurrence. Despite the advances in bioinformatics that led to the development of technologies that allowed the study of omics sciences, there are scarce studies of proteomics in ameloblastomas. Our aim was to perform a quantitative analysis of the proteomic profile of ameloblastomas compared to dental follicles. In the present study, we performed shotgun proteomics to identify proteins using the combination of liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We also performed cluster and functional enrichment analyses of proteins with altered abundances in ameloblastomas. This study also carried out an assessment of the BRAF mutation status in cases of ameloblastoma. Finally, the validation of the results of the proteomics step was performed using immunohistochemistry. Quantitative comparative proteomic analysis resulted in the identification of 1,343 proteins. Ameloblastomas were shown to harbor a proteomic profile distinct from that found in dental follicles, with 33 over-regulated and 21 down-regulated proteins. Over-regulated proteins are involved in glucose metabolism and biosynthesis pathways, indicating an adaptative tumor growth mechanism. Most of the down-regulated proteins play prominent roles in cellular mitochondrial energy production and oxidoreductase metabolism regulation, suggesting mitochondrial dysfunction and oxidative stress response. *BRAF* p.V600E was detected in most ameloblastomas and it may be related to the induction of glycolytic flux, as well as oxidative stress. To investigate the activation of the antioxidant system, we assessed the immunoexpression of the antioxidant enzyme glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1), which was up-regulated in ameloblastomas. Ameloblastomas showed diffuse and moderate to strong GSTO1 immunoexpression, whereas weak or negative immunoexpression was observed in dental follicles. We hypothesize that ameloblastoma presents metabolic reprogramming towards a more glycolytic state with high biosynthetic precursor generation. In addition, a low abundance of mitochondrial respiratory components possibly associated with mitochondrial dysfunction was observed. We were able to identify for the first-time alterations in critical metabolic pathways, which not only contribute to the elucidation of ameloblastoma pathogenesis but also could be potential targets for drug therapy in these tumors.

**Keywords:** Ameloblastoma. Proteomics. Mass spectrometry. Metabolism.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>09</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>	<b>15</b>
3.1	Aspectos éticos.....	15
3.2	Pacientes e amostras.....	15
3.3	Avaliação do status de <i>BRAF</i> p.V600E.....	16
3.4	Preparação das amostras para análise proteômica.....	16
3.4.1	Microdissecção a laser.....	16
3.4.2	Dissecção manual.....	17
3.4.3	Extração e digestão das proteínas.....	17
3.5	Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida.....	18
3.6	Identificação de proteínas e análise quantitativa.....	19
3.7	Anotação de dados e análise estatística.....	20
3.8	Análises de interação proteína-proteína e enriquecimento funcional.....	21
3.9	Validação do candidato biomarcador.....	21
<b>4</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>23</b>

<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>68</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os tumores odontogênicos compreendem um grupo heterogêneo de tumores que se originam das células epiteliais e mesenquimais derivadas de elementos que constituem os tecidos que formam os dentes nos ossos maxilares (WRIGHT e VERED, 2017). Com base na origem histológica, os tumores odontogênicos benignos podem ser divididos em três grupos: tumores epiteliais, tumores epiteliais com ectomesênquima e tumores mesenquimais (WRIGHT e VERED, 2017).

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno considerado um dos mais prevalentes tumores odontogênicos representando aproximadamente 1% de todos os tumores orais e cerca de 9-18% dentre todos os tumores odontogênicos (GÜLTEKIN *et al.*, 2018; SOLTANI *et al.*, 2018). Recentemente, um estudo mostrou que a taxa de incidência global estimada para casos de ameloblastoma é de 0,92 a cada 1.000.000 pessoas por ano (HENDRA *et al.*, 2019).

Apesar da etiologia do ameloblastoma ainda não ter sido completamente esclarecida, acredita-se que ele pode se originar a partir dos remanescentes dos tecidos envolvidos na formação do dente como órgão do esmalte, restos epiteliais de Malassez, epitélio reduzido do órgão do esmalte, remanescentes da bainha de Hertwig e lâmina dental (GÜLTEKIN *et al.*, 2018; YOU *et al.*, 2019). Alguns autores também acreditam que os ameloblastomas possam se originar como resultado de alterações neoplásicas no revestimento de cistos odontogênicos (MENDENHALL *et al.*, 2007).

Na classificação atual da Organização Mundial de Saúde para os tumores odontogênicos, os ameloblastomas foram classificados em: ameloblastoma (convencional), ameloblastoma unicístico e ameloblastoma periférico. O ameloblastoma (convencional) é o tipo mais comum e é caracterizado por um crescimento lento, mas localmente agressivo, resultando em maior propensão para recidivas (DHANUTHAI *et al.*, 2012). Os ameloblastomas do tipo unicístico são tipicamente encapsulados apresentando comportamento menos agressivo (REICHART *et al.*, 1995). Os casos periféricos ou extraósseos correspondem a

apenas cerca de 1% de todos os casos (HENDRA *et al.*, 2019; GÜLTEKIN *et al.*, 2018).

O ameloblastoma ocorre predominantemente entre a terceira e a quinta décadas de vida com pico de incidência na terceira década de vida, com uma média de idade no momento do diagnóstico de aproximadamente 35 anos (HENDRA *et al.*, 2019; REICHART *et al.*, 1995). A maioria dos casos ocorre predominantemente na mandíbula (80%-87,2%), principalmente na região do terceiro molar, seguido da maxila (8,5%-20%). Em relação ao sexo, há uma frequência similar de ameloblastoma com um discreto predomínio em homens (53,2%) em comparação com as mulheres (46,7%) exibindo uma razão homem/mulher de 1,14:1 (HENDRA *et al.*, 2019). Frequentemente, o ameloblastoma é um tumor assintomático e descoberto como um achado ocasional de um exame radiográfico de rotina, mas que pode levar a aumento de volume podendo resultar deformidade facial (MENDENHALL *et al.*, 2007). O tumor também pode levar ao deslocamento e a perda de dentes, parestesia, dor e expansão das corticais (MENDENHALL *et al.*, 2007).

Radiograficamente, o ameloblastoma se apresenta como uma lesão radiolúcida multilocular ou unilocular, podendo ser circundado por uma borda esclerótica com limites festonados. Um dente não erupcionado pode estar associado ao defeito radiolúcido (DHANUTHAI *et al.*, 2012).

Apesar da escolha do tratamento do ameloblastoma depender de fatores como o tipo do tumor, localização e a apresentação clínica, o tratamento de escolha é cirúrgico variando de enucleação a ressecção, esta última frequentemente resulta em significativa morbidade (CARLSON e MARX, 2006; MENDENHALL *et al.*, 2007).

A patogênese do ameloblastoma ainda não foi completamente elucidada. Há numerosos estudos que tentam explicar a sua tumorigênese e que identificam potenciais marcadores de diagnóstico, prognóstico e alvos para o tratamento desse tumor. Evidências recentes mostram que a ativação da via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) tem um papel importante nesse contexto com diferentes estudos reportando uma alta prevalência de 46 a 90% da mutação oncogênica *BRAF V600E* em ameloblastomas, incluindo o tipo unicístico e

a variante maligna (BROWN *et al.* 2014; DINIZ *et al.*, 2015; HEIKINHEIMO *et al.*, 2019; KURPPA *et al.*, 2014; OH *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2016; SWEENEY *et al.*, 2014). A mutação resulta em ativação constitutiva da via de sinalização com consequente aumento de proliferação celular, sobrevivência e transformação neoplásica. Entretanto, essa mutação também foi observada em outras lesões odontogênicas como carcinoma odontogênico de células claras e aqueles tumores que apresentam um componente ameloblastomatoso (fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico e carcinoma ameloblástico) (BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015). Soltani *et al.* (2018) identificaram novas variantes do gene *BRAF* (G606E, L584P e V590G) em pacientes com ameloblastoma (convencional).

Embora muitos dos estudos sobre as alterações moleculares tenham se concentrado nos membros da via MAPK, na literatura também existem estudos que detalham a expressão de moléculas envolvidas em outras vias de sinalização celular que medeiam processos cruciais do crescimento tumoral, como proliferação e diferenciação celulares. Observou-se aumento da expressão de genes relacionados à via de sinalização sonic hedgehog (SHH), como SMO, PTCH1, GLI1 e CCND1 (MISHRA *et al.*, 2015), assim como elevada expressão de Akt, p-Akt, mTOR e p-mTOR, componentes da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, em ameloblastomas (LI *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, os avanços em ciências da computação e informática tornaram possível o desenvolvimento de novas estratégias em biologia molecular que permitem coletar e analisar dados em grande escala sobre as interações complexas dentro dos sistemas biológicos. Esses avanços levaram ao desenvolvimento das tecnologias de alto desempenho, o que vem permitindo o estudo dos sistemas biológicos através das denominadas ciências ômicas, ou seja, o conjunto de técnicas moleculares que auxiliam na compreensão das doenças ao nível das diferentes moléculas biológicas como os estudos de DNA (genômica), RNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) (WIDLAK *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços mencionados, no contexto dos tumores odontogênicos, a proteômica e a metabolômica ainda compreendem campos de estudo pouco explorados. Recentemente, nosso grupo publicou um estudo de análise

metabolômica em ameloblastomas usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas que permitiu a identificação de um total de 26 metabólitos, sendo a maioria deles classificados como aminoácidos, peptídeos e conjugados. Dos metabólitos identificados, 11 mostraram diferenças significantes entre ameloblastomas e o grupo de comparação composto por folículos dentários. Interessantemente, todos estes metabólitos foram elevados nas amostras tumorais e os níveis de glicerol foram significativamente menores nos casos de ameloblastomas de pacientes que tinham a mutação *BRAF* p.V600E (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2019).

A proteômica tem como objetivo sistematicamente estudar o conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um determinado tempo e sob determinada condição. Os estudos de proteômica podem ser primariamente categorizados em: proteômica de descoberta e proteômica alvo. A proteômica de descoberta é utilizada para identificação e quantificação do máximo de proteínas possível sem qualquer conhecimento prévio de quais proteínas podem estar presentes. A proteômica alvo, por sua vez, é utilizada para confirmação de proteínas com base no conhecimento prévio, como literatura e estudos genômicos, ou seja, para identificar e quantificar um conjunto de proteínas de interesse específicas que se espera que estejam presentes (RIFAI *et al.*, 2006). Entre as ferramentas proteômicas está a espectrometria de massas que tem por objetivo mensurar um grande número de proteínas em uma amostra através da separação química e física dos íons e pela determinação da razão entre a massa e a carga ( $m/z$ ) das mesmas (BOGGESS, 2001).

Apesar dos recentes avanços da proteômica na compreensão dos mecanismos biológicos de diferentes tumores, o perfil proteico de tumores odontogênicos e, especificamente do ameloblastoma, ainda necessita de elucidação. Em uma comparação direta entre ameloblastoma e sua contraparte maligna usando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE-PAGE) combinada com espectrometria de massa (MS) foram identificadas 29 proteínas com níveis elevados em carcinomas ameloblásticos. Essas proteínas estão associadas à diversas funções celulares, como estrutura celular, metabolismo e resposta ao estresse, que podem inibir a progressão tumoral. Dessa forma, os

autores sugerem que elas podem estar relacionadas com a evolução dos tumores benignos para malignos (GARCÍA-MUNHÓZ *et al.*, 2014). Apesar dos métodos baseados em gel 2DE terem sido amplamente utilizados para analisar os perfis de proteínas, eles podem ser limitados em sua reprodutibilidade e capacidade de detectar proteínas de baixa abundância. A proteômica *shotgun*, como aqui realizada, é uma tecnologia que permite uma análise proteômica de ampla cobertura, com alta sensibilidade e especificidade.

O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil proteômico do ameloblastoma com o folículo dentário utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS). Além disso, nós realizamos a validação através de imunexpressão para verificar o padrão de expressão de uma proteína com desregulação selecionada. Em particular, nosso objetivo foi descobrir alteração em proteínas que podem ajudar na compreensão de importantes vias na patogênese do ameloblastoma, o que facilitará a pesquisa de novos biomarcadores diagnósticos e alvos terapêuticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi realizar uma análise quantitativa do perfil proteômico de ameloblastomas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil proteômico diferencial entre ameloblastomas e folículos dentários;
- Construir uma rede de interações proteína-proteína (*protein-protein interaction*, PPI);
- Realizar análises de enriquecimento funcional;
- Analisar o *status* de mutação em *BRAF* nos casos de ameloblastoma;
- Avaliar a imunexpressão de proteína selecionada com abundância diferencial entre os grupos de ameloblastoma e folículo dentário.



## **3 METODOLOGIA EXPANDIDA**

### **3.1 Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais através do protocolo de parecer sob o registro CAAE 69737617.5.0000.5149 (Anexo A).

### **3.2 Pacientes e amostras**

O estudo foi primariamente dividido em duas etapas: 1) análise proteômica quantitativa comparativa de descoberta e 2) validação dos resultados. Para a etapa de proteômica de descoberta foram utilizadas 14 amostras de ameloblastoma e 6 de folículo dentário. Todas as amostras foram obtidas do arquivo do Serviço de Patologia Bucomaxilofacial da Universidade Federal de Minas Gerais no período entre 2010 a 2017 e foram fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE). Os critérios de inclusão utilizados para seleção dos casos foram: 1) Fragmentos do tumor contendo frações enriquecidas de epitélio tumoral ou de folículo dentário apresentando epitélio normal e com quantidade de tecido suficiente para realização dos experimentos; 2) Amostras de folículo dentário obtidas de pacientes saudáveis durante extrações de terceiros molares não erupcionados sem processo inflamatório associado; 3) Casos de ameloblastoma com diagnóstico confirmado após avaliação da peça cirúrgica. Todas as amostras foram revisadas por dois patologistas orais experientes (R.S.G. e F.P.F) de acordo com a classificação atual da Organização Mundial de Saúde para tumores de cabeça e pescoço (WRIGHT e VERED, 2017).

Para a etapa de validação dos resultados da proteômica, 11 casos de ameloblastoma foram selecionados, incluindo 06 utilizados na etapa anterior e 05 casos adicionais. Similarmente, 08 casos de folículos dentários foram selecionados para a etapa de validação, compreendendo 03 casos que foram incluídos na etapa de proteômica de descoberta e 05 casos adicionais.

### 3.3 Avaliação do status de *BRAF*p.V600E

Levando em consideração que a literatura mostra uma alta frequência de *BRAF* p.V600E em ameloblastomas, examinamos o *status* dessa mutação nos casos de tumor incluídos na análise proteômica de descoberta. Para tal, o DNA genômico foi extraído do tecido FFPE das amostras usando o *kit* QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliar a presença de mutação, PCR em tempo real alelo-específico foi realizado com sondas TaqMan (*BRAF\_476\_mu* e *BRAF\_rf*) (Life Technologies, CA, EUA) para detectar a transversoão T> A na posição c.1799. Os arquivos de dados contendo os valores de *cycle threshold* (Ct) foram importados para o software Mutation Detector™, versão 2.0 (Life Technologies, CA, EUA). A diferença entre o valor Ct do ensaio do alelo mutante e o valor Ct do ensaio do gene referência correspondente foi calculada para determinar o *status* de mutação para cada amostra.

### 3.4 Preparação das amostras para análise proteômica

#### 3.4.1 *Microdissecção a laser*

Para seleção e isolamento das áreas de interesse, as amostras foram submetidas à microdissecção de captura a laser (*laser capture microdissection*, LCM). A LCM foi realizada em todas as amostras teciduais de folículo dentário e em quatro amostras de ameloblastoma utilizando o sistema CellCut Plus (MMI, Molecular Machines and Industries, Zürich, Switzerland). Apenas ilhas de epitélio odontogênico tumoral, assim como ilhotas e revestimento de epitélio odontogênico dos folículos dentários foram selecionadas para microdissecção.

Para a obtenção das áreas de interesse selecionadas para LCM, secções histológicas foram preparadas a uma espessura de 08 µm em uma membrana de polietileno (MMI membrane, Olympus, Tokyo, Japan). Em seguida, as secções foram desparafinizadas em xilol, hidratadas com concentrações decrescentes de etanol e coradas como descrito anteriormente (STROKES *et al.*, 2011). As secções coradas, então, foram microdissecadas usando microscópio invertido Olympus IX81 acoplado com laser UV (355 nm). As regiões selecionadas separadas de cada amostra foram

coletadas e colocadas conjuntamente em um microtubo coletor estéril. Aproximadamente 3.200.000–10.500.000  $\mu\text{m}^2$  foram coletados do grupo de ameloblastoma e uma quantidade menor, cerca de 1.500.000–5.600.000  $\mu\text{m}^2$ , do grupo de folículo dentário.

#### 3.4.2 *Dissecção manual*

Ainda com o objetivo de selecionar e isolar as áreas de interesse para enriquecimento das mesmas, microdissecção manual foi realizada nas amostras de ameloblastoma restantes (10/14) que apresentavam maior quantidade em área ( $\text{mm}^2$ ) de epitélio tumoral facilitando sua separação e isolamento manualmente sem a necessidade da microdissecção a laser. Através de avaliação microscópica de lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE), áreas contendo mais de 70% de epitélio tumoral foram identificadas e superpostas contra os respectivos blocos de parafina para delimitação e separação. Utilizando um micrótomo rotativo manual (Microtome Rotary, 820 Spencer Type, American Optical Company), secções histológicas de 10  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas de cada caso e diretamente colocadas conjuntamente em microtubos coletores estéreis. Uma maior quantidade de área foi obtida destes casos que foram submetidos à microdissecção manual (aproximadamente 9.000.000-19.700.000  $\mu\text{m}^2$ ) em comparação a quantidade adquirida nos casos selecionados para LCM. Para todas as amostras submetidas à microdissecção manual, parafina foi removida das secções microdissecadas por sucessivas incubações em xilol e etanol absoluto (3x para cada). E, em seguida, as amostras foram hidratadas em uma série de soluções de etanol a 100%, 85% e 70%.

Todas as amostras submetidas à microdissecção de captura a laser e microdissecção manual foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento de uso.

#### 3.4.3 *Extração e digestão das proteínas*

Todas as secções microdissecadas de cada amostra foram tratadas com ureia 8M para desnaturação, com ditioneitol 05 mM para redução das ligações dissulfeto (DTT, 25 min,  $56^\circ\text{C}$ ), com iodoacetamina 14 mM para alquilação de resíduos de cisteína (IAA, 30 min, temperatura ambiente no escuro) e digeridas com tripsina (*overnight*, Promega, 1 $\mu\text{g}$ /amostra, 16 h, a  $37^\circ\text{C}$ ) (VILLÉN e GYGI, 2008). As

reações foram paralisadas com ácido fórmico a 0,4%, os peptídeos foram dessalinizados usando C18 Stage Tips (RAPPSILBER *et al.*, 2007) e reconstituídos em ácido fórmico a 0,1%, de acordo com o tamanho da área microdissecada (10ul/1,000,000 mm<sup>2</sup>). A mistura resultante foi armazenada a -20 °C para análise subsequente por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*.

### 3.5 Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

Para detecção, identificação e quantificação relativa das proteínas utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução do tipo *tandem* (LC-MS/MS; *Liquid chromatograph coupled to tandem mass spectrometry*) que permite eficiente separação e análise de proteínas e peptídeos mesmo em baixíssimas concentrações, cobrindo uma ampla faixa dinâmica de concentração em amostras biológicas complexas.

A mistura resultante de peptídeos foi analisada em um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) acoplado ao sistema de cromatografia líquida em nanofluxo EASY-nLC (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, USA) através de fonte de ionização por electrospray Proxeon. Os peptídeos foram separados por um gradiente de acetonitrila a 2-90% para fase móvel em ácido fórmico 0,1% para fase estacionária usando coluna analítica cromatográfica capilar PicoFrit (20 cm x ID75 µm, 5 µm tamanho da partícula, New Objective, Woburn, MA) com uma taxa de fluxo de 300 nL/min durante 212 min. A voltagem do nanoeletrospray foi de 2.2 kV e a temperatura da fonte foi de 275 °C.

Em relação aos métodos do instrumento, a aquisição de dados foi realizada pelo modo DDA (*data-dependent acquisition*), ou seja, aquisição dependente dos dados, onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de MS. O escaneamento completo de espectros MS ( $m/z$  300–1,600) foi adquirido no analisador Orbitrap após acumulação com um valor alvo de  $1 \times 10^6$ . A resolução no Orbitrap foi de  $r=60.000$  e os 20 mais intensos íons peptídeos com estados de carga  $\geq 2$  foram sequencialmente isolados para um valor de 5.000 e fragmentados em íon linear através de baixa energia de colisão por meio de dissociação induzida por

colisão (*collision-induced dissociation*, CID) com energia de colisão normalizada de 35%.

### 3.6 Identificação de proteínas e análise quantitativa

Os dados brutos gerados pelo espectrômetro de massas foram utilizados para quantificação das proteínas no *software* MaxQuant seguindo os parâmetros padrões. Os valores de intensidade LFQ (*label-free quantification*) resultantes foram utilizados como método de quantificação relativa para comparação da abundância das proteínas entre as amostras analisadas. O processamento dos dados, então, foi realizado no *software* Perseus.

Os resultados disponíveis no formato de arquivos brutos foram processados no *software* MaxQuant, versão 1.3.0.3, que é específico para análise de conjunto de dados em larga escala proveniente de abordagem proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas (COX e MANN, 2008) e os espectros MS/MS foram submetidos ao mecanismo de pesquisa de peptídeos integrado Andromeda (COX *et al.*, 2011) contra a base de dados internacional de sequências de proteínas e informação funcionais UniProt (<http://www.uniprot.org>) em outubro de 2017. A tolerância do precursor de massa foi de 10 ppm para primeira pesquisa e 6 ppm para pesquisas de base de dados no Andromeda. A tolerância da massa dos íons fragmentos foi de 0.5 Da. A especificidade enzimática foi para tripsina com tolerância de peptídeos com até dois sítios de clivagem não digeridos. A oxidação de metionina (15.994915 Da) e acetilação N-terminal de proteínas (42.010565 Da) foram definidas como modificações variáveis, assim como a carbamilação de cisteína (57.021464 Da) foi definida como modificação fixa. O comprimento mínimo de peptídeo foi de 7 aminoácidos. A taxa de falsas descobertas de peptídeos e proteínas (*false discovery rates*, FDRs) foi de 1%. Ao final deste processamento de dados, obtivemos os valores de abundância relativa de todas as proteínas identificadas pelo método de quantificação livre de marcadores baseada na intensidade normalizada do espectro (intensidade LFQ, *label-free quantification*).

Duas amostras de ameloblastomas (AM3 e AM11) foram excluídas das análises posteriores devido ao baixo número de proteínas identificadas (<30%) como previamente feito por Carnielli *et al.*, 2018.

### 3.7 Anotação dos dados e análise estatística

A análise estatística foi realizada usando a plataforma de bioinformática Perseus, versão 1.2.7.4, que é utilizada para análise integrativa de dados proteômicos obtidos por meio de espectrometria de massas (COX e MANN, 2008). A plataforma permite a anotação de dados e análise estatística.

Inicialmente, as entradas da matriz de abundância identificadas somente por sítio de modificação, assim como aquelas identificadas pelo banco reverso foram excluídas das análises posteriores. Como já mencionado, a abundância relativa de cada proteína foi calculada com base na intensidade LFQ que, nesta etapa, teve seu valor convertido para  $\log_2$ . As entradas da matriz de abundância foram filtradas para conter somente valores válidos em pelo menos 70% dos resultados de pelo menos um dos grupos para as análises subsequentes. Os contaminantes não foram automaticamente removidos dos dados, pois proteínas queratinas consideradas como contaminantes pela plataforma são de interesse no estudo de tecidos epiteliais (CARNIELLI *et al.*, 2018). Em uma etapa posterior, os verdadeiros contaminantes foram removidos manualmente.

A significância dos resultados foi avaliada utilizando o teste *t* de Student para identificar proteínas com abundâncias significativamente diferentes entre ameloblastomas e folículos dentários considerando o valor de  $p < 0,05$ . Os valores de *fold-change* (FC) foram calculados pela razão da média de intensidade  $\log_2$  LFQ do ameloblastoma e do folículo dentário. Os valores  $1.5 \geq \log_2 FC \leq -1.5$  foram estabelecidos como padrão de corte para considerar desregulação das proteínas diferencialmente abundantes. As características clinicopatológicas foram apresentadas de forma descritiva como frequência relativa e média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.8 Análises de interação proteína-proteína e de enriquecimento funcional

Para as proteínas que apresentaram abundâncias diferentes no grupo de ameloblastomas comparando com o grupo de folículos dentários, uma rede de interações proteína-proteína (*protein-protein interaction*, PPI) foi construída utilizando a ferramenta STRING (*Search Tool for Retrieval of Interacting Genes*), versão 10.5, que contém interações físicas e funcionais conhecidas e preditas entre proteínas derivadas de várias fontes de bases de dados (SZKLARCZYK *et al.*, 2017). A rede de interações entre as proteínas foi importada do STRING para o software Cytoscape, versão 3.6.1, usando stringApp (DONCHEVA *et al.*, 2019). O escore de confiança definido para as interações foi o valor  $\geq 0,4$  (confiança média). Uma análise de enriquecimento de vias utilizando a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) foi realizada através da funcionalidade adicional para a análise de enriquecimento funcional no STRING.

A análise de ontologia genética (*gene ontology*, GO) baseada em três categorias (processo biológico, componente celular e função molecular) também foi realizada no STRING usando o proteoma humano completo como referência.

Apenas as proteínas que mostram níveis significativamente diferentes (teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ) e com níveis desregulados entre o grupo de ameloblastomas e o grupo de folículos dentários consideradas na análise PPI e na anotação funcional.

### 3.9 Validação do candidato biomarcador

A expressão da proteína glutationa-S-transferase ômega-1 (GSTO1) foi validada por imunohistoquímica (IHC). A etapa de IHC foi realizada seguindo protocolos padrões. Resumidamente, secções de tecido com 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram desparafinizadas com xilol e hidratadas com uma sequência de soluções de etanol. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM. O anticorpo primário anti-GSTO1 (1: 100) (GeneTex, Irvine, CA, EUA, ref. GTX118439) com concentração de 1: 100 foi incubado *overnight* a 4 °C. As etapas de bloqueio de proteína e peroxidase endógena, bem como a detecção, foram realizadas com reagentes do *kit* REVEAL - Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring

BioScience Corporation, Pleasanton, CA, ref. SPB-999). O cromogênio 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB, Spring BioScience, ref. DAB-999) foi usado, seguido por contracoloração com hematoxilina.

A imunexpressão de GSTO1 foi avaliada por três investigadores (RSG, FPF e SFSC). A intensidade da coloração e o padrão de distribuição foram avaliados usando um sistema de pontuação de quatro níveis, conforme relatado anteriormente: (-) negativo; (+) nível de expressão fraco; (++) nível de expressão moderado; (+++) alto nível de expressão (Li *et al.*, 2014). As colorações citoplasmática e nuclear foram consideradas como reação positiva.



#### 4 ARTIGO

**Title:** Proteomic profiling reveals metabolic reprogramming in ameloblastomas.

**Journal:** Cellular and Molecular Life Sciences.

**Authors:**

Sara Ferreira dos Santos **Costa**<sup>a</sup>, ORCID ID: 0000-0001-5150-9227

Jéssica Gardone **Vitório**<sup>a</sup>,

Filipe Fideles **Duarte-Andrade**<sup>a</sup>, ORCID ID: 0000-0003-0345-0376

Romênia Ramos **Domingues**<sup>b</sup>,

Adriana Franco **Paes Leme**<sup>b</sup>,

Marina Gonçalves **Diniz**<sup>c</sup>,

Vanessa Fátima **Bernardes**<sup>c</sup>, ORCID ID: 0000-0003-0194-7434

Carolina Cavaliéri **Gomes**<sup>c</sup>, ORCID ID: 0000-0003-1580-4995

Felipe Paiva **Fonseca**<sup>a</sup>, ORCID ID: 0000-0002-6657-4547

Ricardo Santiago **Gomez**<sup>a\*</sup>, ORCID ID: 0000-0001-8770-8009

**Affiliations:**

<sup>a</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup>Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

## ABSTRACT

Ameloblastoma is an aggressive odontogenic tumor with great potential for recurrence and uncertain molecular pathogenesis. We performed liquid chromatography-tandem mass spectrometry in tumor-enriched samples to compare the proteome of ameloblastomas and dental follicles. The comparative quantitative proteomic analysis resulted in the identification of 1353 proteins. Using cluster analysis, ameloblastomas were shown to harbor a proteomic profile distinct from that found in dental follicles, with 33 over-regulated and 21 down-regulated proteins. The enrichment analysis suggested that over-regulated proteins are involved in glucose metabolism and biosynthesis pathways, indicating an adaptative tumor growth mechanism. Most of the down-regulated proteins play prominent roles in cellular mitochondrial energy production and oxidoreductase metabolism regulation, suggesting mitochondrial dysfunction and oxidative stress response. *BRAF* p.V600E was detected in most ameloblastomas and it may be related to the induction of glycolytic flux, as well as oxidative stress. To investigate the activation of the antioxidant system, we assessed the immunoexpression of the antioxidant enzyme GSTO1, which was up-regulated in ameloblastomas. Ameloblastomas showed diffuse and moderate to strong GSTO1 immunoexpression, whereas weak or negative immunoexpression was observed in dental follicles. We hypothesize that ameloblastoma presents metabolic reprogramming towards a more glycolytic state with high biosynthetic precursor generation. In addition, a low abundance of mitochondrial respiratory components possibly associated with mitochondrial dysfunction was observed. We were able to identify for the first-time alterations in critical metabolic pathways, which not only contribute to the elucidation of ameloblastoma pathogenesis but also could be potential targets for drug therapy in these tumors.

**Keywords:** Odontogenic tumor; Ameloblastoma; Proteomics; Tandem Mass spectrometry; Glycolysis; Mitochondrial dysfunction.

## INTRODUCTION

Ameloblastoma is an epithelial odontogenic tumor that presents a locally aggressive clinical behavior and high recurrence and morbidity rates [1]. It comprises 13–58% of all odontogenic tumors, and its incidence ranges from 0.35 to 2.41 per million population-year [2]. Several studies published in the last decade support the crucial role of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cellular signaling pathway in ameloblastomas, with 60-80% of cases harboring *BRAF* p.V600E [3–8]. Despite the high prevalence of *BRAF* p.V600E in this tumor, ameloblastoma etiopathogenesis has not been fully elucidated. In addition to MAPK pathway alterations, changes in molecules involved in other cell signaling pathways that mediate crucial processes of tumor growth have been reported [9], suggesting additional mechanisms for the development and progression of ameloblastoma.

Metabolic reprogramming is a hallmark of tumorigenesis. The advances in bioinformatics and high-throughput technologies have made possible the emergence of new strategies in molecular biology such as “omics” approaches that allow the acquisition and analysis of large-scale data. However, these molecular techniques have been poorly explored in odontogenic tumors research [10].

In the current study, we performed a discovery-based proteomic analysis using high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) approach to identify the proteome associated with ameloblastoma in comparison to dental follicles. We aimed to identify signaling pathways-related proteins that might help to understand ameloblastoma pathogenesis, contributing to the discovery of potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets. Additionally, we carried out a validation phase to verify the immunoexpression of a differentially abundant protein.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

The research was approved by the local Ethics Committee at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE 69737617.5.0000.5149).

## Patients and tissue samples

In the discovery quantitative proteomics analysis, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of 14 ameloblastomas and 06 dental follicles were obtained from the archives of the Oral Pathology Service at UFMG from 2010 to 2017. To meet the inclusion criteria, samples should have sufficient tumor or normal epithelium for experimental procedures. Dental follicle samples were obtained from asymptomatic impacted teeth extracted from healthy individuals and ameloblastoma cases had their histopathological diagnosis confirmed after surgical specimen evaluation. All samples were reviewed by two pathologists (RSG and FPF) and the ameloblastoma cases were evaluated according to the current WHO Classification of Head and Neck Tumors [1].

In the immunohistochemistry validation phase, 11 ameloblastoma cases were chosen, including 06 from the discovery proteomics and 05 additional cases. Similarly, 08 cases of dental follicles were selected for the validation step, comprising 03 from the discovery cohort and 05 additional samples.

## ***BRAF* p.V600E mutation assessment**

Considering the high frequency of *BRAF* p.V600E in ameloblastomas, we examined the status of this mutation in the tumor cases included in the discovery proteomics analysis. Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and competitive allele-specific real-time PCR was performed with specific TaqMan probes (*BRAF*\_476\_mu and *BRAF*\_rf) (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA), as previously described [11].

## Sample preparation

### *Tissue dissection*

Laser capture microdissection (LCM) was performed on a MMI CellCut system with MMI Cell Tools control software v.4.0.7 RC2 (MMI Molecular Machines & Industries, Tokyo, Japan) and an optical microscope. Tumor epithelial components of ameloblastomas and the epithelial lining of dental follicles were microdissected (**Fig S1**).

Manual dissection was performed on the remaining ameloblastoma samples (10/14). Only areas containing more than 70% of tumor epithelium were selected. After dissection, tissues were deparaffinized and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

#### *Extraction and digestion of proteins*

The dissected tissues of the discovery cohort (14 ameloblastomas and 06 dental follicles) were treated with 8 M urea, reduced (5 mM dithiothreitol), alkylated (14 mM iodoacetamide) and digested with trypsin (Promega, 1ug/sample) [12]. The reaction was stopped with 0.4% formic acid and the peptides were desalinated using C18 Stage Tips [13]. Each sample was reconstituted in 0.1% formic acid for subsequent analysis by LC-MS/MS, according to the size of the microdissected area (10ul/1,000,000 mm<sup>2</sup>).

#### **LC-MS/MS analysis**

The mixture of peptides was analyzed on a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled with a nanoflow liquid chromatography by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem, Odense, Denmark) through a Proxeon nanoelectrospray ion source as reported previously [14]. Briefly, peptides were separated by a 2–90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid. All of the instrument methods were set up in the data-dependent acquisition (DDA) mode. The most intense peptide ions were sequentially isolated and fragmented by low energy CID (collision-induced dissociation).

#### **Protein identification and quantitative analysis**

The raw files were processed using the MaxQuant version 1.3.0.3 software [15], and the MS/MS spectra were submitted to the Andromeda search engine [16] against the Human UniProt database. The precursor mass tolerance was set to 10 ppm for first searches and 6 ppm for main Andromeda database searches. The fragment ion mass tolerance was set to 0.5 Da. Enzyme specificity was set to trypsin with a maximum of two missed cleavage. Oxidation of methionine and protein N-terminal acetylation were defined as variable modifications, and carbamidomethylation of cysteine was defined as a fixed modification. The false discovery rates (FDRs) of peptide and protein were less than 1%. We obtained the

relative abundance values of all proteins identified by the label-free quantification method based on the normalized intensity of the spectrum (LFQ intensity).

### **Protein interaction and functional enrichment analyses**

Protein-protein interaction (PPI) networks of differentially abundant proteins in ameloblastoma *versus* dental follicles were constructed using STRING v.11 [17]. The KEGG enriched pathways and gene ontology (GO) analyses were also performed using this web-platform.

### **Validation of candidate marker**

The expression of the protein glutathione-S-transferase omega-1 (GSTO1) was validated using immunohistochemistry (IHC). The IHC was carried out following standard protocols. Antigenic retrieval was performed with 10mM sodium citrate solution. The primary antibody anti-GSTO1 (1:100) (GeneTex, Irvine, CA, USA) was incubated overnight at 4°C. The endogenous peroxidase and protein blocking steps were carried out with ready-to-use reagents from the REVEAL-Biotin-Free Polyvalent HRP kit (Spring BioScience Corporation, Pleasanton, CA, USA). The chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Spring BioScience) was used, followed by hematoxylin counterstaining.

The GSTO1 immunoexpression was evaluated by three investigators (RSG, FPF and SFSC). The staining intensity and distribution pattern were assessed using a four-level scoring system, as reported previously: (-) negative; (+) weak expression level; (++) moderate expression level; (+++) high expression level [18]. Cytoplasmic and nuclear staining were considered a positive reaction.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Perseus v.1.2.7.4 [20]. First, reverse and identified “only by site” entries were excluded from further analysis. The LFQ intensity was log<sub>2</sub>-transformed and only valid values at least 50% in at least one group were considered for subsequent analysis. Contaminants were not automatically removed from the dataset because keratins are of interest in the study of epithelial tissues [14]. Potential contaminants were reviewed and manually removed. Student’s *t* test was used to identify differentially abundant proteins

between ameloblastoma and dental follicle. The fold-change (FC) was calculated dividing the log<sub>2</sub> transformed LFQ intensity mean of ameloblastoma/ and dental follicle. The cutoff of significance was FDR adjusted p-value <0.05. The values 1.5-fold were established as cutoff standard for up- or down-regulation, respectively, of differentially abundant proteins. Clinicopathological features were descriptively presented as relative frequency and mean  $\pm$  SD.

## RESULTS

### Sample characterization

A total of 19 ameloblastoma cases were included, 10 from men and 9 from women, most of which showing follicular histological pattern (89.5%, 17/19). The age of patients ranged from 08 to 81 years (mean of  $34.3 \pm 18$  years). Most of the cases occurred in the mandible (84.2%, 16/19), and the average tumor size was  $54.3 \pm 27.8$  mm. In most cases, patients were asymptomatic, and 07 showed recurrence. *BRAF* p.V600E was detected in 90% (09/10) of the discovery cohort cases. The clinicopathological and demographic data of all ameloblastoma patients included in the present study are summarized in **Table 1**.

The comparison group consisted of dental follicles from 04 men and 07 women with ages ranging from 09 to 23 years ( $16.3 \pm 1.7$ ). Almost all dental follicle were from the mandible (09/11) (**Table 2**).

### Comparative proteomic profile

Of a total of 20 samples (14 ameloblastoma and 06 dental follicle) that were submitted to proteomic analysis, five were excluded due to the low number of quantified proteins and low correlation coefficient value (samples AM2, AM3, AM6, AM11 and DF5), as shown in **Fig S2** and **Table S1**.

After data filtering, 1353 proteins were identified. Among these proteins, 1277 (94.4%) were shared by both groups, while 67 were identified exclusively in the ameloblastomas, and 09 were exclusive of dental follicles (**Fig 1a** and **Table S2**). To assess the differences and similarities of the proteome between ameloblastomas and dental follicles, a Principal Component Analysis (PCA) was constructed with the total of identified proteins. A clear separation among ameloblastoma and dental follicle

samples was observed, as shown in **Fig 1b**. Similarly, unsupervised hierarchical cluster analysis revealed differences in the proteomic profiles between the analyzed groups, as seen in **Fig 1c-d**.

Of the total proteins shared between the groups, we found 108 proteins with significantly different abundances between ameloblastomas and dental follicles (**Table S3**). The fold-change (FC) values of these proteins with differential abundance ranged from 0.1 to 11.3 ( $\log_2$  FC: -3.3 to 3.5). Of these proteins, 54 demonstrated dysregulation in ameloblastomas ( $1.5 \geq \log_2$  FC  $\leq -1.5$ ), of which 33 were over-regulated ( $\log_2$  FC  $\geq 1.5$ ) and 21 down-regulated ( $\log_2$  FC  $\leq -1.5$ ) (**Fig 2a** and **Table S4**).

### **Molecular network map and functional enrichment**

To understand the biological meaning of the proteins with dysregulation (n=54) in ameloblastomas, we examined the PPI network. In this network, different subgroups of proteins were observed and, among them, a group with down-regulated proteins highly related to each other, as seen in **Fig 2b**.

The KEGG pathway enrichment among dysregulated proteins in ameloblastomas showed that these proteins were significantly enriched in 13 pathways, being overrepresented in cellular metabolism-related pathways. Most of the down-regulated proteins are mitochondrial components that play prominent roles in cellular mitochondrial energy production and regulate oxidoreductase metabolism, while most of the over-regulated proteins are enzymes involved in metabolic precursor pathways (**Fig 2c**).

The GO annotation also indicates cellular metabolic processes overrepresented for dysregulated proteins. In agreement with KEGG analysis, several proteins were enriched into cellular energy production, metabolites precursor generation, and reduction-oxidation (redox) process (**Table S5**).

### **Immunohistochemical analysis**

Considering that a set of dysregulated proteins are related to redox processes, we investigated the possible antioxidant defense system activation in response to oxidative stress by IHC evaluation of GSTO1, an enzyme that plays an important role



in cell detoxification. All ameloblastoma and dental follicle cases showed predominantly GSTO1 cytoplasmic staining. In most ameloblastomas, the pattern of GSTO1 expression in tumor cells was diffuse (11/10) with a staining intensity moderate to strong (11/11). It was observed only one tumor case with a weak expression for GSTO1. Conversely, the majority of dental follicles exhibited negative or weak immunoexpression for GSTO1 (05/08) in the epithelial islands and the overlying odontogenic epithelium. In three dental follicle cases, a moderate GSTO1 expression was observed (**Fig 3a-d**).

## DISCUSSION

Several studies have attempted to explain the ameloblastoma tumorigenesis, in addition to seek to identify potential markers of diagnosis, prognosis, and targets for the treatment of this tumor. Previously, a direct comparison between ameloblastoma and ameloblastic carcinoma using a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE-PAGE) approach combined with MS reported increased levels of 20 proteins in the malignant tumor [20]. Although 2DE gel-based methods have been widely used to analyze protein profiles, it has limited reproducibility and ability to detect low abundant proteins. The shotgun proteomics we used in our study is a powerful technology that allows a broader proteome coverage analysis with high sensitivity and specificity. To our knowledge, the present investigation was the first to assess the quantitative proteome difference between ameloblastomas and dental follicles using high-throughput screening technology.

In the present study, KEGG and GO annotation analyses from dysregulated proteins demonstrated that metabolic pathways related to macromolecular precursors biosynthesis, cellular energy production, and oxidoreductase regulation are over-represented in ameloblastomas. One of the main metabolic sources of precursor molecules and energy production is the carbon metabolism with glycolysis and their branching pathways. Our proteomics results demonstrated a high abundance of several enzymes part of the glycolysis and macromolecules biosynthesis: glucose-6-phosphate isomerase (GPI), 6-phosphogluconolactonase (PGLS), D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), inosine 5-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), adenine phosphoribosyltransferase (APRT), ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (UBA1) and platelet-activating factor acetylhydrolase IB

subunit gamma (PAFAH1B3). Consistently, our previous study based on metabolome analysis of ameloblastomas also suggested a potential upregulation of glycolysis and serine/glycine biosynthesis in this tumor [21].

The complex mechanisms underlying the upregulation of glycolysis in tumors have been extensively discussed [22], and, it is likely to be an adaptation phenomenon to hypoxia, a common event in solid tumors growth. The presence and role of hypoxia in ameloblastomas have been suggested by the increased immunoexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [23,24]. Although the impact of hypoxia might vary according to cell type, extent, and duration of oxygen limitation, the presumably altered glucose metabolism in ameloblastoma may be considered an adaptative mechanism to low oxygen concentration. Acquisition of glycolytic phenotype might also be achieved through the upregulation of glucose transporters, notably GLUT-1 and GLUT-3 [22]. Overexpression of GLUT-1 has been reported in ameloblastomas [25,26]. In association with our findings, these results indicate an apparent adaptative mechanism with increased glucose flux and activation of cellular biosynthetic activity in ameloblastoma. This metabolic alteration conforms with the clinical behavior observed in ameloblastoma because aggressive and infiltrative tumors depend on high rates of glycolysis to support their growth [27]. Most of the ameloblastomas included in this study showed positivity for *BRAF* p.V600E. In cancer cells, the oncogenic activation of MAPK signaling pathway has been related to HIF-1 $\alpha$  accumulation and increased glucose uptake [27]. Collectively, the results raise the possibility that *BRAF* mutation participates in the induction of glycolytic flux in ameloblastomas.

Following the enzymatic reactions of metabolism, the ultimate phase of cellular catabolism occurs in mitochondria. Interestingly, the ameloblastoma group exhibited a down abundance of components of the two mitochondrial energy generation complexes: tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS). The TCA enzymes that showed reduced abundance in ameloblastomas were: SDH and IDH subunits (SDHA and IDH3 $\alpha$ ), as well as aconitate hydratase (ACO2). We also identified in ameloblastomas downregulation of several OXPHOS components: NADH dehydrogenase subunits beta 4 and S3 1 (NDUFB4 and NDUFS3), succinate dehydrogenase subunit A (SDHA), cytochrome c (CYCS), cytochrome c oxidase subunits 2, 5A and 6B1 (MT-CO2, COX5A and COX6B1), and ATP synthase subunit

O (ATP5O). The deficiency of these TCA cycle and OXPHOS components in odontogenic tumors has not been investigated yet.

The low abundance of mitochondrial components may also be related to hypoxia areas, which lead to the suppression of some metabolic reactions that require molecular oxygen as an electron acceptor [28]. The HIF-1 $\alpha$  upregulation in response to hypoxia enhances the expression of glycolytic enzymes, and concurrently it down-regulates mitochondrial respiration [29]. The TCA and OXPHOS complexes activity were found to be decreased in some benign and malignant tumors [30,31], but whether this deficiency is a required step in tumor growth remains to be elucidated.

Defects in mitochondrial respiratory complexes can result in enhanced ROS/NOS generation, which in turn can damage respiratory components impacting mitochondrial dysfunction with further production of ROS/NOS [29]. High ROS/NOS production has been considered a hallmark of many tumors due to its ability to cause oxidative DNA damage [32], which can trigger DNA damage response (DDR). In this study, we identified the upregulation of DNA-apurinic/aprimidinic (AP) site lyase (APEX1), an AP endonuclease that plays a major role in the repair of oxidative DNA damage and redox regulation [33]. Previously, our research group reported high levels of DNA damage markers, suggesting the activation of the DNA repair system in ameloblastomas [34]. Other studies reported reduced immunoexpression of mismatch repair (MMR) system-related proteins, another DDR mechanism, in ameloblastomas [35,36]. A possible inactivation or failure of the DDR mechanisms may explain the reduction in the expression of proteins related to MMR system in ameloblastomas, as observed by the above-mentioned studies.

The role of oncogene-induced ROS/NOS production, as well as the modulation of mitogenic signaling pathways by ROS/NOS in the development of tumors, has been extensively debated [37]. One possibility is that an excess of ROS/NOS production induced by mitochondrial dysfunction and *BRAF* activation promotes oxidative DNA damage with DDR mechanism activation in ameloblastomas. Conversely, mitochondrial dysfunction and *BRAF* activation can be a consequence of high ROS/NOS levels.

We detected the upregulation of glutathione S-transferases *Omega* 1 (GSTO1) and thioredoxin (TRX) in ameloblastomas. Furthermore, the ameloblastoma

group exhibited higher immunostaining intensity of GSTO1 than dental follicle. GSTO1 and TRX are part of the antioxidant defense system, and they are activated in an attempt to prevent oxidative stress due to the overproduction of ROS/NOS [38]. Our results indicate the activation of the antioxidant system to inhibit oxidative stress in ameloblastoma. The possible oxidative stress-related mechanisms involved in ameloblastoma pathogenesis remains to be elucidated.

The present study demonstrated dysregulation in proteins related to metabolic pathways suggesting that ameloblastoma undergoes metabolic reprogramming towards a more glycolytic state with high biosynthetic precursor generation and low abundance of mitochondrial respiratory components. We hypothesize that the down-regulation of mitochondrial complexes can result in mitochondrial dysfunction with consequent oxidative stress. The oxidative stress can be further induced by *BRAF* mutation, leading to the activation of the antioxidant system in ameloblastomas. The present investigation identified alterations in pivotal mechanisms of tumor regulation, which may be implicated in initiation and/or progression of ameloblastomas. Further studies are encouraged to clarify the role of these events in the pathogenesis of this odontogenic tumor and to investigate their potential as therapeutic targets.

## REFERENCES

- [1] Vered M, Muller S, Heikinheimo K. Ameloblastoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC, 2017.
- [2] Hendra FN, Van Cann EM, Helder MN, Ruslin M, De Visscher JG, Forouzanfar T et al (2020) Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis. Oral Dis;26:12-21. <https://doi.org/10.1111/odi.13031>
- [3] Heikinheimo K, Huhtala JM, Thiel A, Kurppa KJ, Heikinheimo H, Kovac M et al (2019) The Mutational Profile of Unicystic Ameloblastoma. J Dent Res;98:54-60. <https://doi.org/10.1177/0022034518798810>
- [4] Pereira NB, Pereira KM, Coura BP, Diniz MG, De Castro WH, Gomes CC et al (2016) BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. J Oral Pathol Med;45:780-785. <https://doi.org/10.1111/jop.12443>

- [5] Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, Castro WH, Lacerda JC, Cardoso SV et al (2015) Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biology*;36:5649-5653. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3238-0>
- [6] Brown NA, Rolland D, Mchugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS et al (2014) Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res*;20:5517-5526. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1069>
- [7] Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, Ristimäki A, Ruhin B, Kellokoski L et al (2014) High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol*;232:492-498. <https://doi.org/10.1002/path.4317>
- [8] Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho L, Neahring L, Kweu KA et al (2014) Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet*;46:722–725. <https://doi.org/10.1038/ng.2986>
- [9] Diniz MG, Gomes CC, Sousa SFS, Xavier GM, Gomez RS (2017) Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol*;72:165–173. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.021>
- [10] Duarte-Andrade FF, Vitória JG, Pereira TSF, Gomes CC, Gomez RS (2020) A review of the molecular profile of benign and malignant odontogenic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*;129:357–368. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.12.017>
- [11] Coura BP, Resende TAC, Menezes VCB, Bernardes VF, Sousa SF, Diniz MG et al (2020) Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis. *Arch Oral Biol*;113:104523. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104523>
- [12] Villén J, Gygi SP (2008) The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc*; 3:1630–1638. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.150>
- [13] Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*;2:1896–1906. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
- [14] Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, Granato DC, Rivera C, Domingues RR et al (2018) Combining discovery and targeted proteomics

- reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun*;9:3598. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05696-2>
- [15] Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*;26:1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- [16] Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*;10:1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>
- [17] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J et al (2019) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*;47:607–613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- [18] Li Y, Zhang Q, Peng B, Shao Q, Qian Q, Zhang J (2014) Identification of glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) protein as a novel tumor-associated antigen and its autoantibody in human esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*;35:10871-10877. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2394-y>
- [19] Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T et al (2016) The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)omics Data. *Nat Methods*;13:731-40. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- [20] García-Muñoz A, Bologna-Molina R, Aldape-Barrios B, Licéaga-Escalera C, Montoya-Pérez LA, Rodríguez MA (2014) Identification of Proteins With Increased Levels in Ameloblastic Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*;72:1183-1196. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.11.029>
- [21] Duarte-Andrade FF, Silva AMB, Vitório JG, Canuto GAB, Costa SFS, Diniz MG et al (2019) The importance of BRAF-V600E mutation to ameloblastoma metabolism. *J Oral Pathol Med*;48:307-314. <https://doi.org/10.1111/jop.12839>
- [22] Gatenby RA, Gillies RJ (2007) Glycolysis in Cancer: A Potential Target for Therapy. *Int J Biochem Cell Biol*;39:1358-1366. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.021>

- [23] Da Costa NMM, Fialho ADV, Proietti CC, Kataoka MSS, Jaeger RG, Alves-Júnior SM et al (2016) Role of Hypoxia-Related Proteins in Invasion of Ameloblastoma Cells: Crosstalk Between NOTCH1, Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ , a Disintegrin and Metalloproteinase 12, and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. *Histopathology*;69:99-106. <https://doi.org/10.1111/his.12922>
- [24] Da Costa NMM, Siqueira AS, Ribeiro ALR, Kataoka MSS, Jaeger RG, Alves-Júnior SM et al (2018) Role of HIF-1 $\alpha$  and CASPASE-3 in Cystogenesis of Odontogenic Cysts and Tumors. *Clin Oral Investig*;22:141-149. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2090-6>
- [25] Sánchez-Romero C, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Almeida OP (2016) Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and HIF-1 $\alpha$  in Tooth Germ, Ameloblastoma, and Ameloblastic Carcinoma. *Int J Surg Pathol*;24:410-418. <https://doi.org/10.1177/1066896916640359>
- [26] Vasconcelos RC, Moura JM, Brasileiro-Junior VL, Silveira EJ, Souza LB (2016) Immunohistochemical Expression of GLUT-1, GLUT-3, and Carbonic Anhydrase IX in Benign Odontogenic Lesions. *J Oral Pathol Med*;45:712-717. <https://doi.org/10.1111/jop.12427>
- [27] Lavoie H, Gagnon J, Therrien M (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*; e-pub ahead of print 23 June 2007. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- [28] Pavlova NN, Thompson CB (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*;23:27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- [29] Solaini G, Sgarbi G, Baracca A (2011) Oxidative Phosphorylation in Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta*;1807:534-542. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.09.003>
- [30] Simonnet H, Demont J, Pfeiffer K, Guenaneche L, Bouvier R, Brandt U et al (2003) Mitochondrial Complex I Is Deficient in Renal Oncocytomas. *Carcinogenesis*;24:1461-1466. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg109>
- [31] Bonora E, Porcelli AM, Gasparre G, Biondi A, Ghelli A, Carelli V et al (2006) Defective Oxidative Phosphorylation in Thyroid Oncocytic Carcinoma Is Associated With Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Affecting Complexes I and III. *Cancer Res*;66:6087-6096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0171>

- [32] Sullivan LB, Chandel NS (2014) Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cancer. *Cancer Metab*;2:17. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- [33] Hsieh MM, Hegde V, Kelley MR, Deutsch WA (2011) Activation of APE/Ref-1 Redox Activity Is Mediated by Reactive Oxygen Species and PKC Phosphorylation. *Nucleic Acids Res*;29:3116-3122. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.3116>
- [34] Diniz MG, Guimarães BVA, Pereira NB, Menezes GHF, Gomes CC, Gomez RS (2017) DNA Damage Response Activation and Cell Cycle Dysregulation in Infiltrative Ameloblastomas: A Proposed Model for Ameloblastoma Tumor Evolution. *Exp Mol Pathol*;102:391-395. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.04.003>
- [35] Amaral-Silva GK, Sánchez-Romero C, Wagner VP, Martins MD, Pontes HR, Fregnani ER et al (2017) Prognostic Significance of hMSH2, hMSH3, and hMSH6 Expression in Ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*;124:286-295. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.05.511>
- [36] Bologna-Molina R, Pereira-Prado V, Sánchez-Romero C, Tapia-Repetto G, Soria S, Hernandez M et al (2018) Expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ameloblastomas and tooth germs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;23:126–131. <https://doi.org/10.4317/medoral.22210>
- [37] Ogrunc M, Micco RD, Liontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M et al (2014) Oncogene-induced Reactive Oxygen Species Fuel Hyperproliferation and DNA Damage Response Activation. *Cell Death Differ*; 21:998-1012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.16>
- [38] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;45:51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.0958>



**Table 1:** Clinicopathological and demographic features, *BRAF*p.V600E status and experiments performed in ameloblastoma cases.

Sample	Histological type	Age (years)	Sex	Location	Size (mm)	Syntomatology	Recurrence	<i>BRAF</i> p.V600E	LC-MS/MS	IHC
1	Follicular	41	F	Mandible	89	Assymptomatic	No	Positive	X	
2 <sup>a</sup>	Follicular	8	M	Maxilla	70	Assymptomatic	No	Negative	X	
3 <sup>a</sup>	Follicular	35	F	Mandible	27	Assymptomatic	No	NC <sup>b</sup>	X	
4	Follicular	35	F	Mandible	20	Symptomatic	Yes	Positive	X	X
5	Follicular	27	F	Mandible	NA	Assymptomatic	Yes	Positive	X	
6 <sup>a</sup>	Follicular	48	M	Maxilla	60	Symptomatic	Yes	NC <sup>b</sup>	X	
7	Plexiform	14	M	Mandible	43	Assymptomatic	No	Positive	X	X
8	Follicular	53	M	Mandible	30	Symptomatic	Yes	Positive	X	
9	Plexiform	22	F	Mandible	65	Assymptomatic	No	Positive	X	X
10	Follicular	54	M	Mandible	40	Assymptomatic	Yes	Positive	X	X
11 <sup>a</sup>	Follicular	32	M	Mandible	68	NA	No	Positive	X	X
12	Follicular	49	F	Mandible	10	Assymptomatic	Yes	NC <sup>b</sup>	X	
13	Follicular	46	M	Mandible	25	Assymptomatic	Yes	NC <sup>b</sup>	X	X
14	Follicular	17	F	Mandible	NA	NA	No	Positive	X	
15	Follicular	13	M	Mandible	80	Assymptomatic	No	NE		X
16	Follicular	81	M	Maxilla	70	Assymptomatic	No	NE		X
17	Follicular	21	F	Mandible	100	Assymptomatic	No	NE		X
18	Follicular	26	F	Mandible	93	Symptomatic	No	NE		X
19	Follicular	29	M	Mandible	33	Assymptomatic	No	NE		X

Abbreviations: F = Female; M = Male; NA = Not available; NE = Not evaluated; NC= Not conclusive; LC-MS/MS = Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; IHC = Immunohistochemistry. <sup>a</sup>Samples 3 and 11 were excluded of proteomics data processing due to the low number of identified proteins (<10%). Samples 2 and 6 were removed from the proteomics analysis due to the low values of Pearson's correlation coefficient. <sup>b</sup>TaqMan allele-specific qPCR reaction was not considered conclusive.

**Table 2:** Clinicopathological and demographic features and experiments performed in dental follicle cases.

Sample	Age (years)	Sex	Location	Size (mm)	LC-MS/MS	IHC
1	21	F	Mandible	11	X	
2	9	F	Maxilla	10	X	X
3	19	M	Mandible	12	X	X
4	18	M	Mandible	21	X	
5 <sup>a</sup>	16	F	Mandible	25	X	
6	15	M	Mandible	19	X	X
7	16	F	Mandible	7		X
8	22	F	Mandible	3		X
9	17	F	Mandible	15		X
10	21	M	Maxilla	15		X
11	23	F	Mandible	15		X

Abbreviations: F = Female; M = Male; LC-MS/MS = Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; IHC = Immunohistochemistry. <sup>a</sup>Sample 5 was removed from the proteomics analysis due to the low value of Pearson's correlation coefficient.

**Table S1:** Correlation coefficient (Pearson r) among the LFQ intensities of total proteins identified in ameloblastoma and dental follicle samples before AM2, AM6 and DF5 exclusion.

DF1	DF2	DF3	AM1	AM2	DF4	AM4	AM5	DF5	AM6	AM7	AM8	AM9	AM10	AM12	AM13	AM14	DF6	
NaN	0,87	0,89	0,80	0,72	0,88	0,83	0,85	0,84	0,67	0,85	0,84	0,86	0,84	0,85	0,84	0,85	0,86	<b>DF1</b>
0,87	NaN	0,93	0,79	0,69	0,89	0,79	0,82	0,76	0,66	0,85	0,84	0,84	0,84	0,80	0,80	0,79	0,89	<b>DF2</b>
0,89	0,93	NaN	0,78	0,67	0,91	0,80	0,82	0,82	0,66	0,87	0,85	0,85	0,84	0,81	0,83	0,82	0,88	<b>DF3</b>
0,80	0,79	0,78	NaN	0,71	0,76	0,83	0,85	0,69	0,60	0,84	0,81	0,85	0,83	0,84	0,82	0,78	0,79	<b>AM1</b>
0,72	0,69	0,67	0,71	NaN	0,68	0,74	0,75	0,65	0,55	0,75	0,74	0,77	0,75	0,69	0,70	0,77	0,67	<b>AM2</b>
0,88	0,89	0,91	0,76	0,68	NaN	0,79	0,84	0,82	0,64	0,86	0,85	0,86	0,85	0,82	0,83	0,83	0,84	<b>DF4</b>
0,83	0,79	0,80	0,83	0,74	0,79	NaN	0,85	0,68	0,60	0,86	0,89	0,88	0,87	0,79	0,77	0,90	0,80	<b>AM4</b>
0,85	0,82	0,82	0,85	0,75	0,84	0,85	NaN	0,71	0,63	0,86	0,88	0,87	0,88	0,86	0,85	0,87	0,83	<b>AM5</b>
0,84	0,76	0,82	0,69	0,65	0,82	0,68	0,71	NaN	0,72	0,78	0,73	0,78	0,72	0,80	0,82	0,74	0,73	<b>DF5</b>
0,67	0,66	0,66	0,60	0,55	0,64	0,60	0,63	0,72	NaN	0,69	0,66	0,70	0,68	0,72	0,73	0,67	0,63	<b>AM6</b>
0,85	0,85	0,87	0,84	0,75	0,86	0,86	0,86	0,78	0,69	NaN	0,86	0,93	0,88	0,84	0,82	0,85	0,85	<b>AM7</b>
0,84	0,84	0,85	0,81	0,74	0,85	0,89	0,88	0,73	0,66	0,86	NaN	0,89	0,95	0,83	0,85	0,90	0,82	<b>AM8</b>
0,86	0,84	0,85	0,85	0,77	0,86	0,88	0,87	0,78	0,70	0,93	0,89	NaN	0,91	0,85	0,84	0,88	0,82	<b>AM9</b>
0,84	0,84	0,84	0,83	0,75	0,85	0,87	0,88	0,72	0,68	0,88	0,95	0,91	NaN	0,84	0,84	0,87	0,82	<b>AM10</b>
0,85	0,80	0,81	0,84	0,69	0,82	0,79	0,86	0,80	0,72	0,84	0,83	0,85	0,84	NaN	0,87	0,81	0,80	<b>AM12</b>
0,84	0,80	0,83	0,82	0,70	0,83	0,77	0,85	0,82	0,73	0,82	0,85	0,84	0,84	0,87	NaN	0,83	0,81	<b>AM13</b>

0,85	0,79	0,82	0,78	0,77	0,83	0,90	0,87	0,74	0,67	0,85	0,90	0,88	0,87	0,81	0,83	NaN	0,79	<b>AM14</b>
0,87	0,89	0,89	0,79	0,67	0,84	0,80	0,83	0,72	0,63	0,85	0,82	0,82	0,82	0,80	0,81	0,79	NaN	<b>DF6</b>

---

AM2, AM6 and DF5 were removed from the proteomics analysis due to the low values of Pearson's correlation coefficient (>0.7).

**Table S2:** Proteins exclusively identified in ameloblastoma (n=67) and dental follicle groups (n=09).

<b>Ameloblastoma group</b>		
<b>Protein ID (Uniprot)</b>	<b>Protein name</b>	<b>Gene symbol</b>
E7ERK9	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	EIF2B4
P15374	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3
P13591	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM1
Q9P2K5	Myelin expression factor 2	MYEF2
E9PAU2	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	RAVER1
P20810-6	Calpastatin	CAST
H7BY58	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCMT1
Q9UJH6	Sedoheptulokinase	SHPK
Q149N8	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	SHPRH
O60610	Protein diaphanous homolog 1	DIAPH1
P63000-2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2
P49354	Protein farnesyltransferase	FNTA
P16035	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2
P16220	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	CREB1
Q969P0	Immunoglobulin superfamily member 8	IGSF8
Q86VB7-2	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	CD163
P58546	Myotrophin	MTPN
P61086	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K
O14618	Copper chaperone for superoxide dismutase	CCS
Q9UI30	tRNA methyltransferase 112 homolog	TRMT112
F5GXR3	Parathyrosin	PTMS
F5H2F4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1
Q99538	Legumain	LGMN
Q92542	Nicastrin	NCSTN
P29218-3	Inositol monophosphatase 1	IMPA1

O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	DYNC1LI2
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3
O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	HAT1
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1
P03956	Interstitial collagenase	MMP1
P07476	Involucrin	IVL
P07711	Cathepsin L1	CTSL1
P11137	Microtubule-associated protein 2	MAP2
P11215-2	Integrin alpha-M	ITGAM
P13688	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1
P15090	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART
P23141-2	Liver carboxylesterase 1	CES1
P28799	Granulins	GRN
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit	RPA3
P36222	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1
P43121	Cell surface glycoprotein MUC18	MCAM
P48147	Prolyl endopeptidase	PREP
Q5T5C7	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS
X6R8F3	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	LCN2
Q01813	6-phosphofructokinase type C	PFKP
Q12860	Contactin-1	CNTN1
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	TLL12
Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GPNMB
Q16270	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IGFBP7
Q3LXA3	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase	DAK
Q52LJ0-2	Protein FAM98B	FAM98B
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	ZNF326
Q5RHS7	Protein S100-A2	S100A2

Q9P1F3	Costars family protein ABRACL	ABRACL
Q7Z5P9	Mucin-19	MUC19
Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3
Q8IWA5-2	Choline transporter-like protein 2	SLC44A2
Q8NDC0	MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like	MAPK1IP1L
Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2
Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2
Q96JB6	Lysyl oxidase homolog 4	LOXL4
Q96RF0	Sorting nexin-18	SNX18
Q9BRP8	Partner of Y14 and mago	WIBG
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	PYCARD
Q9Y5Z4	Heme-binding protein 2	HEBP2

### Dental follicle group

Protein ID (Uniprot)	Protein name	Gene symbol
Q9ULH0	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	KIDINS220
O94901-9	SUN domain-containing protein 1	SUN1
G0XQ39	Stromal interaction molecule 1	STIM1
Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	SQRDL
O95428	Papilin	PAPLN
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	SMR3B
P08493-2	Matrix Gla protein	MGP
P58107	Epiplakin	EPPK1
Q6ZR64	Matrix-remodeling-associated protein 7	MXRA7

---

**Table S3:** Proteins showed significantly different levels between ameloblastoma and dental follicle (n=108).

<b>Protein IDs</b>	<b>Protein names</b>	<b>Gene names</b>	<b>-Log p-value</b>	<b>q-value</b>
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	3,340667	0,014689
E7EUC7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2	2,515156	0,044026
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	3,100485	0,021532
P41252	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	3,458629	0,012668
A0A0A0MTS2	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	2,695084	0,037516
Q01105	Protein SET	SET	2,884152	0,028205
A2A274	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	3,592311	0,010775
P00387-3	NADH-cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3	2,941575	0,026971
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2	2,532109	0,04361
P99999	Cytochrome c	CYCS	4,886576	0,001797
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14	4,564035	0,003314
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5	4,438658	0,0036
D6RFN0	COP9 signalosome complex subunit 4	COPS4	3,299254	0,015792
P02774-3	Vitamin D-binding protein	GC	2,462396	0,045057
Q13884	Beta-1-syntrophin	SNTB1	2,631203	0,039457
Q9NZL9	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	MAT2B	2,614483	0,039916
Q9UNZ2-5	NSFL1 cofactor p47	NSFL1C	2,932091	0,026971



P37837	Transaldolase	TALDO1	3,212011	0,018584
F5GYJ8	Ubiquitin thioesterase OTUB1	OTUB1	2,541012	0,043532
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10	2,885062	0,028205
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	3,902907	0,00816
P12268	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	5,066854	0,001483
P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	2,905583	0,027744
H3BNX8	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	COX5A	3,749461	0,008801
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	3,577225	0,010775
J3QQX2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	7,371485	5,88E-05
Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	PAFAH1B3	3,588835	0,010775
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	2,8779	0,028205
O60664	Perilipin-3	PLIN3	3,798091	0,00816
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	3,140079	0,020458
O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	2,441898	0,0459
O75494	Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10	2,650928	0,039136
O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein	ENDOD1	3,691709	0,00908
O95168	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4	2,500662	0,044591
O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	5,077066	0,001483
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	2,767915	0,034227
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	3,1715	0,019575

P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	5,126104	0,001483
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	2,909889	0,027744
P00747	Plasminogen	PLG	3,027168	0,02453
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	2,480515	0,045057
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocyte	SPTA1	3,856688	0,00816
P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	2,486476	0,045057
P04066	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCA1	2,574583	0,041482
P04080	Cystatin-B	CSTB	5,184306	0,001483
P04083	Annexin A1	ANXA1	2,688117	0,037516
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	4,441576	0,0036
P05109	Protein S100-A8	S100A8	2,518204	0,044026
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	4,08091	0,006102
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	2,50771	0,044326
P06702	Protein S100-A9	S100A9	3,71362	0,00908
P06733	Alpha-enolase	ENO1	3,168189	0,019575
P07737	Profilin-1	PFN1	2,933019	0,026971
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	4,903418	0,001797
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH	2,667866	0,038617
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	3,801753	0,00816
P10599	Thioredoxin	TXN	5,157994	0,001483

P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1	4,349694	0,003867
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	2,448936	0,04558
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	2,457994	0,045057
P17301	Integrin alpha-2	ITGA2	2,602676	0,040175
P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	2,869114	0,028345
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	2,573885	0,041482
P23229	Integrin alpha-6;Integrin alpha-6 heavy chain	ITGA6	2,636035	0,039457
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	3,849272	0,00816
P26639-2	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	2,798029	0,032404
P26640	Valine--tRNA ligase	VARS	2,633252	0,039457
P28331-2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1	3,564381	0,010782
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	2,459221	0,045057
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	4,13591	0,005954
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	3,407319	0,013214
P32926	Desmoglein-3	DSG3	3,926374	0,00816
P36957	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLST	4,076906	0,006102
P38117-2	Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	2,725758	0,036145
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	3,03571	0,024515
P40121	Macrophage-capping protein	CAPG	2,65712	0,039077

P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2	2,474442	0,045057
P47929	Galectin-7	LGALS7	2,610568	0,039916
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	4,362633	0,003867
P48637	Glutathione synthetase	GSS	2,75846	0,034481
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	3,114829	0,021249
P53597	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	SUCLG1	3,20925	0,018584
P60866-2	40S ribosomal protein S20	RPS20	2,459504	0,045057
P61158	Actin-related protein 3	ACTR3	3,443267	0,012689
P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	3,705198	0,00908
P62328	Thymosin beta-4	TMSB4X	3,435653	0,012689
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIA	2,709762	0,036987
P63313	Thymosin beta-10	TMSB10	2,942261	0,026971
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	2,528424	0,04361
P78417	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	3,820424	0,00816
Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	2,970667	0,026441
Q12874	Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3	3,381673	0,013684
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1	2,538539	0,043532
Q13835	Plakophilin-1	PKP1	5,925131	0,000822
Q14195-2	Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	3,819436	0,00816
Q14764	Major vault protein	MVP	2,579359	0,041482

Q15388	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	TOMM20	5,245628	0,001483
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	2,611089	0,039916
Q16658	Fascin	FSCN1	4,541649	0,003314
Q8N163	DBIRD complex subunit KIAA1967	KIAA1967	2,546956	0,043532
Q96IU4	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHD14B	3,495287	0,011958
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	2,998735	0,025606
Q99497	Protein DJ-1	PARK7	3,550616	0,01082
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	2,745312	0,03504
Q9NQC3	Reticulon-4	RTN4	2,802488	0,032404
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	2,686101	0,037516
Q9Y4W6	AFG3-like protein 2	AFG3L2	2,465179	0,045057
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	2,495373	0,044682

---

Student's t test, with P values adjusted for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg FDR method,  $P < 0.05$ .

**Table S4:** Up-regulated proteins (log FC $\geq$ 1.5; n=33) and down-regulated proteins (log FC $\geq$  -1.5; n=21) in ameloblastomas.**Up-regulated proteins in ameloblastoma**

Protein ID	Protein names	Gene names	FC	Log2 FC	-log p value
P04080	Cystatin-B	CSTB	11,31	3,50	5,18
P63313	Thymosin beta-10	TMSB10	10,15	3,34	2,94
P06702	Protein S100-A9	S100A9	7,02	2,81	3,71
P62328	Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide	TMSB4X	6,56	2,71	3,44
P02774-3	Vitamin D-binding protein	GC	6,13	2,62	2,46
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	5,68	2,51	2,88
P02794	Ferritin heavy chain;Ferritin	FTH1	5,17	2,37	2,49
Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	PAFAH1B3	4,49	2,17	3,59
P17301	Integrin alpha-2	ITGA2	4,37	2,13	2,60
O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	4,36	2,13	5,08
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	4,33	2,11	4,90
Q99497	Protein DJ-1	PARK7	4,19	2,07	3,55

P12268	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	3,93	1,97	5,07
P04083	Annexin A1;Annexin	ANXA1	3,89	1,96	2,69
F5GYJ8	Ubiquitin thioesterase OTUB1	OTUB1	3,85	1,94	2,54
P49755	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMED10	3,75	1,91	2,89
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	3,61	1,85	4,14
O60664	Perilipin-3	PLIN3	3,54	1,82	3,80
Q16658	Fascin	FSCN1	3,41	1,77	4,54
Q96IU4	Abhydrolase domain-containing protein 14B	ABHD14B	3,39	1,76	3,50
P10599	Thioredoxin	TXN	3,35	1,74	5,16
A0A0A0MTS2	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	3,30	1,72	2,70
Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	3,27	1,71	2,97
J3QQX2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDIA	3,21	1,68	7,37
P05109	Protein S100-A8	S100A8	3,18	1,67	2,52
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	3,17	1,66	2,57
Q14195-2	Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	3,15	1,66	3,82
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase;DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial	APEX1	3,11	1,64	3,90
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1	3,03	1,60	4,35
P04066	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCA1	2,99	1,58	2,57
P61158	Actin-related protein 3	ACTR3	2,96	1,56	3,44

P78417	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	2,91	1,54	3,82
P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2	2,91	1,54	2,47

### Down-regulated proteins in ameloblastoma

Protein ID	Protein names	Gene names	FC	Log2 FC	-log p value
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocyte	SPTA1	0,10	-3,33	3,86
A2A274	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	0,15	-2,77	3,59
P99999	Cytochrome c	CYCS	0,19	-2,36	4,89
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	0,21	-2,23	3,17
Q13835	Plakophilin-1	PKP1	0,22	-2,20	5,93
P47929	Galectin-7	LGALS7	0,22	-2,17	2,61
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	0,22	-2,15	2,48
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	0,24	-2,08	4,44
O95168	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4	0,24	-2,08	2,50
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	0,26	-1,92	2,63
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	0,27	-1,87	3,41
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	0,28	-1,86	2,45
H3BNX8	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	COX5A	0,28	-1,83	5,13
P28331-2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1	0,28	-1,83	3,75



Q13884	Beta-1-syntrophin	SNTB1	0,29	-1,81	3,56
O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	0,29	-1,80	2,44
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	0,31	-1,71	4,36
P00747	Plasminogen	PLG	0,31	-1,70	3,03
P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	0,31	-1,69	2,91
P32926	Desmoglein-3	DSG3	0,33	-1,61	3,93
O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein	ENDOD1	0,35	-1,52	3,69

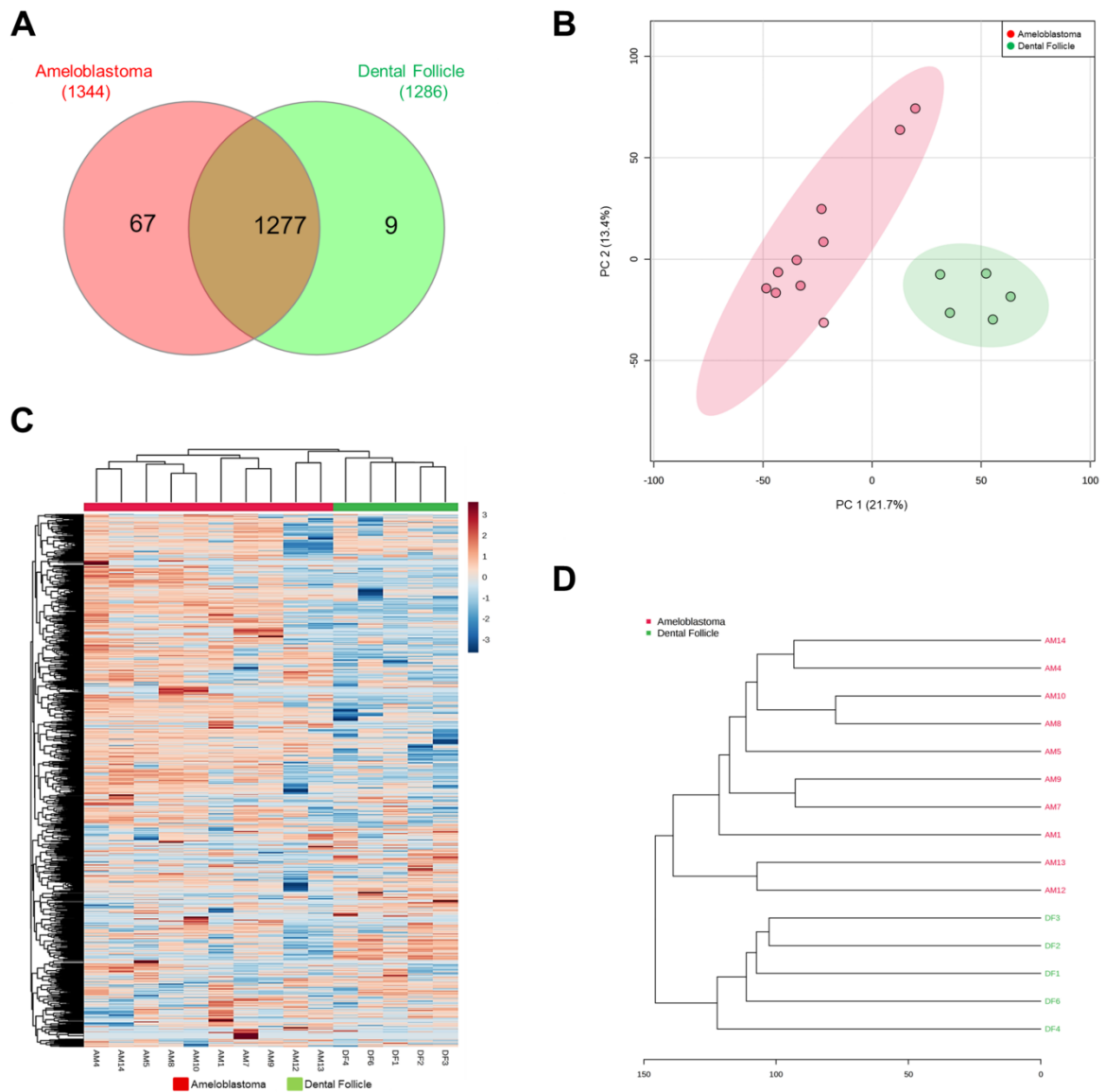
---

**Table S5:** Top 20 GO biological process of dysregulated proteins ( $P < 0.05$ ;  $1.5 \geq \log_2 FC \leq -1.5$ ) in ameloblastomas.

<b>ID</b>	<b>Description</b>	<b>Gene count</b>	<b>FDR</b>	<b>Matching proteins in your network (gene symbol)</b>
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	14	5.52e-09	ACO2,AKR1A1,ATP5O,COX5A,COX6B1,CYCS,GPI,IDH3A,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PHGDH,SDHA
GO:0055114	oxidation-reduction process	19	5.52e-09	ACO2,AKR1A1,APEX1,COX5A,COX6B1,CYCS,FTH1,GPI,GSTO1,IDH3A,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PARK7,PHGDH,SDHA,TXN
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	11	3.07e-08	APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:0022900	electron transport chain	10	3.07e-08	AKR1A1,COX5A,COX6B1,CYCS,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PHGDH,SDHA
GO:0044281	small molecule metabolic process	23	3.07e-08	ABHD14B,ACO2,AKR1A1,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,FUCA1,GC,GOT2,GPI,GSTO1,IDH3A,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PARK7,PGLS,PHGDH,SDHA,TXN
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	13	6.96e-08	ABHD14B,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PGLS,SDHA
GO:0009117	nucleotide metabolic process	14	9.13e-08	ABHD14B,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PARK7,PGLS,SDHA
GO:0006119	oxidative phosphorylation	8	9.26e-08	ATP5O,COX5A,CYCS,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	10	9.26e-08	ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:0045333	cellular respiration	9	9.26e-08	ACO2,COX5A,CYCS,IDH3A,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA

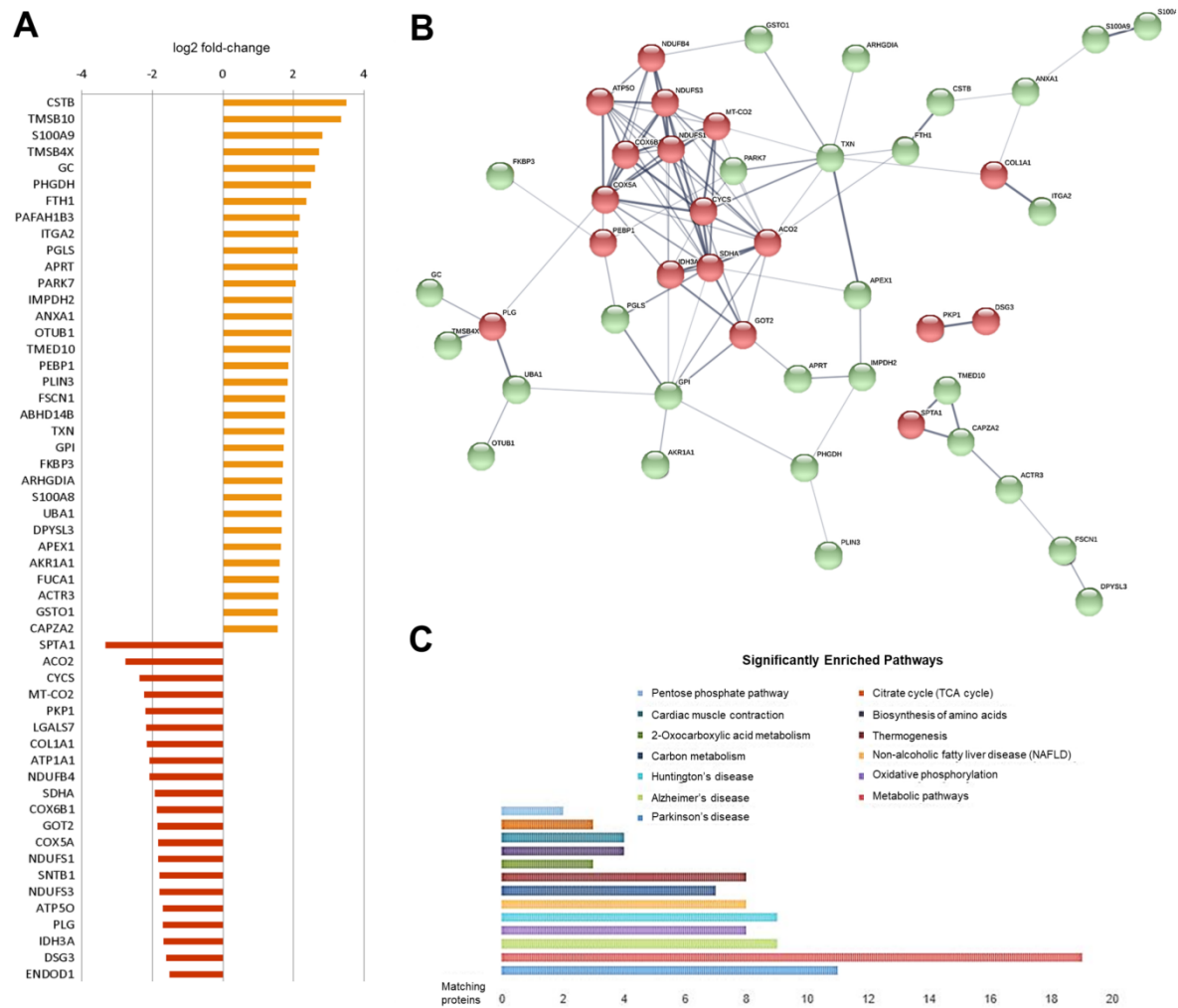
GO:0017144	drug metabolic process	14	1.42e-07	ACO2,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IDH3A,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PARK7,PHGDH,SDHA
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	12	1.99e-07	ABHD14B,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:0046903	Secretion	17	2.60e-07	ANXA1,APRT,CSTB,ENDOD1,FTH1,FUCA1,GOT2,GPI,IMPDH2,MT-CO2,PARK7,PKP1,PLG,S100A8,S100A9,TMED10,TMSB4X
GO:0042775	mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	7	2.80e-07	COX5A,CYCS,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:0046034	ATP metabolic process	9	2.80e-07	ATP5O,COX5A,CYCS,GPI,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,SDHA
GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	16	1.58e-06	ABHD14B,AKR1A1,APRT,ATP5O,COX5A,CYCS,FUCA1,GPI,IMPDH2,MT-CO2,NDUFB4,NDUFS1,NDUFS3,PARK7,PGLS,SDHA
GO:0032940	secretion by cell	15	2.23e-06	ANXA1,APRT,CSTB,ENDOD1,FTH1,FUCA1,GPI,IMPDH2,PARK7,PKP1,PLG,S100A8,S100A9,TMED10,TMSB4X

---

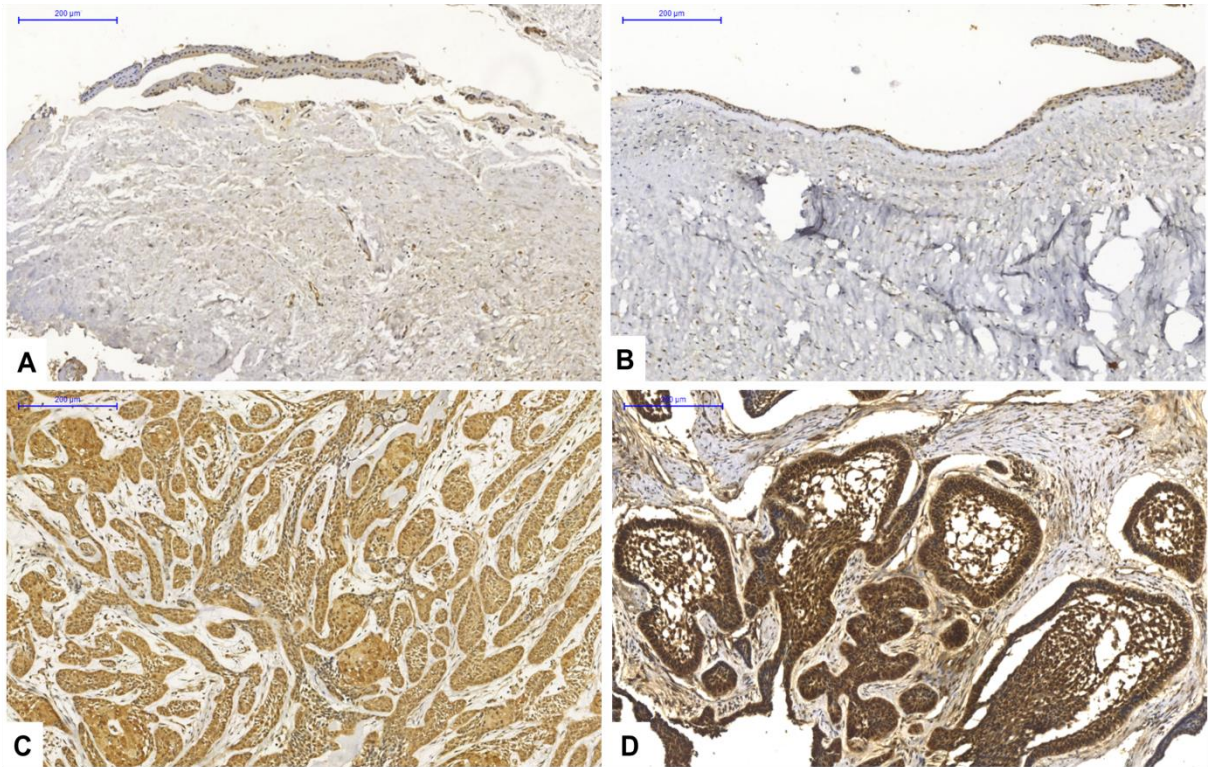


**Fig. 1** Quantitative proteome analysis indicates distinct protein signature in ameloblastoma compared with normal tissue. **A** Venn diagram of common and exclusively identified proteins for comparative groups. Venn diagram was generated using the InteractiVenn tool (Heberle et al., 2015). **B** PCA score plot illustrates the separation between ameloblastoma and dental follicle groups. The PCA was performed in MetaboAnalyst v.4.0 web-platform. **C** Clustering analysis of all proteins identified ( $n=1,353$ ) in discovery proteomics. Values for each protein (rows) and for each sample (columns) are colored based on the protein abundance, in which high (red) and low (blue)  $\log_2$  LFQ intensity values are indicated based in the color scale bar shown in the top right of the figure. The

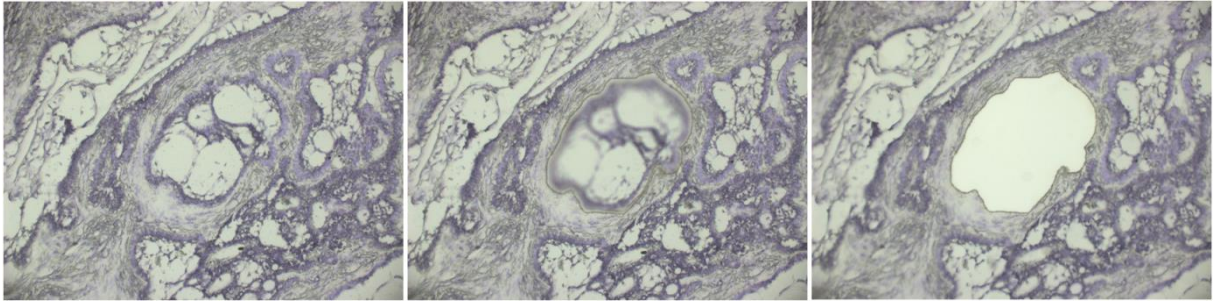
colored bars shown on the top of the figure indicate ameloblastoma samples in red and dental follicle samples in green. Hierarchical clustering was performed in MetaboAnalyst v.4.0 web-platform using the Euclidean distance measure and complete linkage clustering algorithm. **D** Dendrogram was built using Euclidean distance measure with complete linkage clustering algorithm. (MetaboAnalyst v.4.0).



**Fig. 2** Differentially abundant proteins between ameloblastoma and dental follicles groups. **A** Proteins with dysregulation ( $1.5 \geq \log_2 \text{FC} \leq -1.5$ ) in ameloblastomas. The over-regulated proteins ( $\log_2 \text{FC} \geq 1.5$ ) are indicated by light orange color, while down-regulated proteins ( $\log_2 \text{FC} \leq -1.5$ ) are represented by dark orange. **B** Network of dysregulated proteins ( $P < 0.05$ ;  $1.5 \geq \log_2 \text{FC} \leq -1.5$ ) in ameloblastomas. Up-regulated proteins are represented in red, while down-regulated proteins are presented in green. The thickness of the continuous lines refers to confidence of the interaction data between the proteins, that is, the thicker the line, the stronger the relationship between the proteins. We excluded 06 proteins (SNTB1, ENDOD1, LGALS7, ATP1A1, FUCA1 and PFAFH1B3) that did not show interactions in the network. The score that defined interaction confidence was set at  $\geq 0.4$  (medium confidence) and with no maximum additional interactors. **C** KEGG enrichment analysis of dysregulated proteins ( $P < 0.05$ ;  $1.5 \geq \log_2 \text{FC} \leq -1.5$ ) in ameloblastomas.

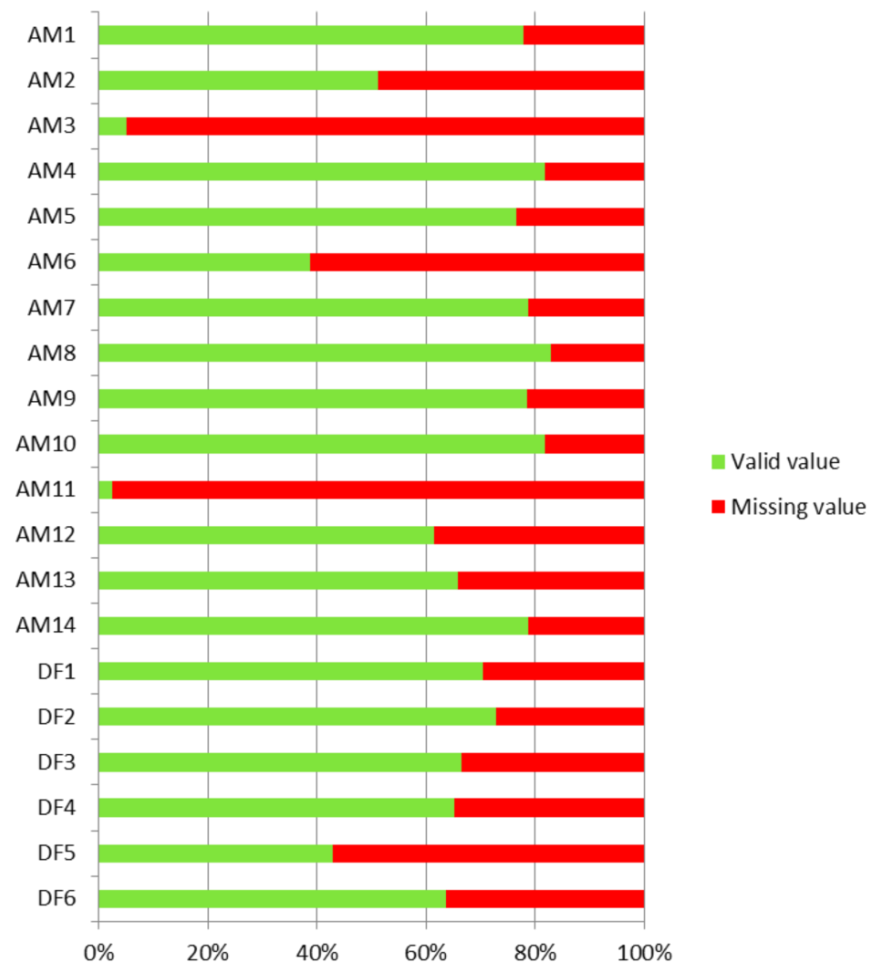


**Fig. 3** Ameloblastoma exhibited higher immunostaining intensity of GSTO1 than dental follicle. **A, B** Immunoexpression of GSTO1 in dental follicles. The majority of dental follicles exhibited negative or weak expression for GSTO1. **C, D** Immunoexpression of GSTO1 in ameloblastoma. A moderate to strong staining intensity of GSTO1 expression was observed in ameloblastomas.



**Fig. S1** Laser capture microdissection (LCM) from FFPE ameloblastoma tissues. **A)** Stained section from ameloblastoma sample showing tumor epithelial odontogenic island. **B)** Delimitation and cutting out selected region of tumor island. **C)** Absence of laser-capture microdissected tumor island.





**Fig. S2** Percentage of valid values corresponding to identification and quantification of proteins in each case selected for the discovery proteomics analysis. AM3 and AM11 showed the lowest percentage of valid values (<10%). AM2, AM6 and DF5 presented less than 60% of valid values. Samples AM3 and AM11 were excluded of proteomics data processing due to the low number of identified proteins (<10%).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou pela primeira vez um perfil proteômico distinto em ameloblastomas na comparação com grupo controle composto por folículos dentários. Nossas análises mostraram que o metabolismo celular é potencialmente importante na tumorigênese do ameloblastoma. Nós identificamos alteração na abundância de proteínas relacionadas às importantes vias metabólicas, sugerindo que o ameloblastoma sofre reprogramação metabólica com elevada glicólise e alta geração de precursores biossintéticos de macromolécula, além de baixa abundância de componentes respiratórios mitocondriais. A nossa hipótese é que a sub-regulação dos complexos mitocondriais pode resultar em disfunção mitocondrial com consequente estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ainda ser induzido pela mutação em *BRAF*. Os resultados também mostraram uma superregulação e maior imunexpressão de GSTO1, uma enzima antioxidante, nos ameloblastomas, o que pode ser entendido como uma tentativa de impedir o estresse oxidativo pela ativação do sistema antioxidante.

Nosso estudo identificou alterações nos mecanismos essenciais de regulação tumoral, que podem estar implicados no início e/ou progressão dos ameloblastomas. Novos estudos são incentivados a esclarecer o papel desses eventos na patogênese desse tumor, assim como o potencial destes como alvos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- BOGGESS, B. Mass Spectrometry Desk Reference (Sparkman, O. David). **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 2, p. 168, 2001.
- BROWN, N. A.; ROLLAND, D.; MCHUGH, J. B.; WEIGELIN, H. C.; ZHAO, L.; LIM, M. S. et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 21, p. 5517-5526, 2014.
- BRUNNER, P.; BIHL, M.; JUNDT, G.; BAUMHOER, D.; HOELLER, S. BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. **Oral Oncology**, v. 51, n. 10, p. e77-78, 2015.
- CARLSON, E.R.; MARX, R.E. The Ameloblastoma: Primary, Curative Surgical Management. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 3, p. 484-494, 2006.
- DHANUTHAI, K.; CHANTARANGSU, S.; ROJANAWATSIRIVEJ, S.; PHATTARATARATIP, E.; DARLING, M.; JACKSON-BOETERS L. et al. Ameloblastoma: a multicentric study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 113, n. 6, p. 782-788, 2012.
- DINIZ, M. G.; GOMES, C. C.; GUIMARÃES, B. V.; CASTRO, W. H.; LACERDA, J. C.; CARDOSO, S. V. et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumour Biology**, v. 36, n. 7, p. 5649-5653, 2015.
- DUARTE-ANDRADE, F. F.; SILVA, A. M. B.; VITÓRIO, J. G.; CANUTO, G. A. B.; COSTA, S. F. S.; DINIZ, M. G. et al. The importance of BRAF-V600E mutation to ameloblastoma metabolism. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 2019. **IN PRESS**. doi: 10.1111/jop.12839.
- GARCÍA-MUÑOZ, A.; BOLOGNA-MOLINA, R.; ALDAPE-BARRIOS, B.; LICÉAGA-ESCALERA, C.; MONTOYA-PÉREZ, L. A.; RODRÍGUEZ, M. A. et al. Identification of proteins with increased levels in ameloblastic carcinoma. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 6, p. 1183-1196, 2014.
- GÜLTEKIN S. E.; AZIZ, R.; HEYDT, C.; SENGÜVEN, B.; ZÖLLER, J.; SAFI, A. F. et al. The landscape of genetic alterations in ameloblastomas relates to clinical features. **Virchows Archive**, v. 472, n. 5, p. 807-814, 2018.
- HEIKINHEIMO, K.; HUHTALA, J. M.; THIEL, A.; KURPPA, K. J.; HEIKINHEIMO, H.; KOVAC, M. et al. The Mutational Profile of Unicystic Ameloblastoma. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 1, p. 54-60, 2019.
- HENDRA, F. N; VAN CANN, E. M.; HELDER, M. N.; RUSLIN, M.; DE VISSCHER, J. G.; FOROUZANFAR, T. et al. Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, 2019. **IN PRESS**. doi: 10.1111/odi.13031.

KURPPA, K. J.; CATÓN, J.; MORGAN, P. R.; RISTIMÄKI, A.; RUHIN, B.; KELLOKOSKI, L. et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **The Journal of Pathology**, v. 232, n.5, p. 492-498, 2014.

LI, Y.; ZHANG, Q.; PENG, B.; SHAO, Q.; QIAN, Q.; ZHANG, J. Identification of glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) protein as a novel tumor-associated antigen and its autoantibody in human esophageal squamous cell carcinoma. **Tumour Biology**, v. 35, p. 10871-10877.

LI, N.; SUI, J.; LIU, H.; ZHONG, M.; ZHANG, M.; WANG, Y.; HAO, F. Expression of phosphorylated Akt/mTOR and clinical significance in human ameloblastoma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 4, p. 5236-5244, 2015.

MENDENHALL, W.M.; WERNING, J. W.; FERNANDES, R.; MALYAPA, R. S.; MENDENHALL, N. P. Ameloblastoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 30, p. 645–648, 2007.

MISHRA, P.; PANDA, A.; BANDYOPADHYAY, A.; KUMAR, H.; MOHIDDIN, G. Sonic Hedgehog Signalling Pathway and Ameloblastoma - A Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 11, p. e10-3, 2015.

OH, K. Y.; CHO, S. D.; YOON, H. J.; LEE, J. I.; AHN, S. H.; HONG, S. D. High prevalence of BRAF V600E mutations in Korean patients with ameloblastoma: Clinicopathological significance and correlation with epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 5, p. 413-420, 2019.

PEREIRA, N. B.; PEREIRA, K. M.; COURA, B. P.; DINIZ, M. G.; DE CASTRO, W. H.; GOMES, C. C. et al. BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 10, p. 780-785, 2016.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P.; SONNER, S. Ameloblastoma: Biological Profile of 3677 Cases. **European Journal of Cancer Oral Oncology**, v. 31, n. 2, p. 86-99, 1995.

RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971-983, 2006.

SOLTANI, M.; TABATABAIEFAR, M. A.; MOHSENIFAR, Z.; POURREZA, M. R.; MORIDNIA, A.; SHARIATI, L. et al. Genetic study of the BRAF gene reveals new variants and high frequency of the V600E mutation among Iranian ameloblastoma patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 1, p. 86-90, 2018.

SWEENEY, R.T.; MCCLARY, A. C.; MYERS, B. R.; BISCOCHO, L.; NEAHRING, L.; KWEU, K. A. et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p. 722-725, 2014.

WIDLAK, W. High-Throughput Technologies in Molecular Biology. In: Widłak W. (eds) Molecular Biology. Lecture Notes in Computer Science, v. 8248. Springer, Berlin, Heidelberg.

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**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2017.

YOU, Z.; LIU, S. P.; DU, J.; WU, Y. H.; ZHANG, S. Z. Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: A review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 3, p. 201-205, 2019.

**ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE 69737617.5.0000.5149**

**Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez  
Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica  
Faculdade de Odontologia- UFMG**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de setembro de 2017, o projeto de pesquisa intitulado "Perfil de microRNAs e de proteínas em ameloblastomas" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

  
Prof. Dra. Vivian Resende  
Coordenadora do COEP-UFMG