

VICTOR COUTINHO BASTOS

**ALTERAÇÕES IDADE-DEPENDENTE NAS VIAS METABÓLICAS DE
FOLÍCULOS DENTÁRIOS: *UM ESTUDO PILOTO***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Victor Coutinho Bastos

**ALTERAÇÕES IDADE-DEPENDENTE NAS VIAS METABÓLICAS DE
FOLÍCULOS DENTÁRIOS: *UM ESTUDO PILOTO***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Cavaliéri Gomes.
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

B327a Bastos, Victor Coutinho.
2021 Alterações idade-dependente nas vias metabólicas de
T folículos dentários: um estudo piloto / Victor Coutinho
Bastos. -- 2021.

99 f. : il.

Orientadora: Carolina Cavaliéri Gomes.
Coorientador: Ricardo Santiago Gomez.

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

1. Saco dentário/metabolismo. 2. Dente não Erupcionado.
3. Envelhecimento. 4. Patologia bucal. 5. Fenômenos
fisiológicos dentários. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II.
Gomez, Ricardo Santiago. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALTERAÇÕES IDADE-DEPENDENTE NAS VIAS METABÓLICAS DE FOLÍCULOS DENTÁRIOS: UM ESTUDO PILOTO


VÍCTOR COUTINHO BASTOS

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

Aprovada em 26 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:



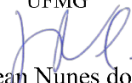
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes – Orientadora
FO-UFMG



Prof(a). Ricardo Santiago Gomez
FO-UFMG



Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
UFMG



Prof(a). Jean Nunes dos Santos
Universidade Federal da Bahia

Belo Horizonte, 26 de julho de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 26 / 07 / 2021.



Profa. Isabela Almeida Fordeus
Coordenadora

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho à minha Mãe, Reislá, e à minhas avós Cecília e Solange, por seus exemplos de força, apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos, pelo amor, carinho, paciência e suporte. Agradeço também ao meu tio Fernando e avós que em muito me ajudaram.

Agradeço aos orientadores, professora Carolina Cavaliéri Gomes e professor Ricardo Santiago Gomez, pela excelência, acompanhamento, escuta e apoio, pelo entusiasmo demonstrado a cada resultado obtido e, sobretudo, pela confiança depositada em mim para a condução deste trabalho. De forma especial, agradeço também aos amigos de laboratório Jéssica Gardone, Filipe Fideles, Thais Pereira, Roberta Chaves e Flávia Lima, pela intensa troca e ensinamentos, fundamentais ao longo deste tempo. Aos solícitos Yuri Lebron e Victor Moreira, alunos do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG), meu muito obrigado.

Agradeço às Professoras Gisele Canuto (Universidade Federal da Bahia) e Adriana Nori (Universidade Federal de Minas Gerais), por toda a assistência; e aos técnicos do Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial (FO-UFMG) pelo cuidado e empenho na manutenção do Arquivo.

Agradeço aos demais amigos que a pós-graduação me deu, Isadora Gomes, Taynara Resende, Gabriela Ribeiro, Daniela Meirelles, Eustáquio Alexandre e Carolina Peres pelo companheirismo e pela enriquecedora convivência.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq que proporcionaram as condições financeiras para realização do trabalho.

A todos que me acompanharam durante estes tempos difíceis e trouxeram boas energias, gratidão.

“Na superfície da Terra, todos os lugares são diferentes entre si. Existem aqueles dos quais deve fugir e outros que devem ser objetos de suas buscas, e você deve estar familiarizado com todos eles.”

Sun Tzu (*A Arte da Guerra*)

RESUMO

Envelhecer não é uma escolha; é nosso destino. O *declínio funcional dependente do tempo que afeta a maioria dos organismos vivos* está vinculado às alterações em variados processos celulares, incluindo senescência celular, alterações epigenéticas, instabilidade genômica, exaustão de células-tronco, entre outras. As alterações morfológicas relacionadas à idade nos folículos dentários associados a dentes não-erupcionados têm sido investigadas há décadas, principalmente motivado pelo fato de que cistos e tumores podem surgir em associação a dentes inclusos e/ou impactados. Quanto mais entendemos a fisiologia dos folículos dentários, mais nos tornamos capazes de contextualizar eventos biológicos que podem estar associados à ocorrência de lesões odontogênicas cuja incidência aumenta com a idade. Assim, nosso objetivo foi avaliar as alterações metabólicas relacionadas à idade em amostras de folículos dentários associados à terceiros molares inferiores inclusos/impactados de indivíduos adolescentes e adultos. Uma amostra de conveniência de folículos dentários fixados em formalina e embebidos em parafina de indivíduos adolescentes (<16 anos, $n= 13$) e adultos (>26 anos, $n= 7$) foi selecionada. As amostras foram preparadas e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS) em análise metabolômica *untargeted*. Análises uni- e multivariadas foram conduzidas, e a previsão de vias alteradas foi realizada pelas abordagens *mummichog* e GSEA. Folículos dentários de indivíduos adolescentes e adultos mostraram diferenças nas vias relacionadas à biossíntese do hormônio esteróide C21, biossíntese dos ácidos biliares, metabolismo da galactose, biossíntese de androgênio e estrogênio, metabolismo do amido e sacarose e metabolismo do lipoato. Nossos achados sugerem que, assim como outros tecidos humanos, os folículos dentários associados a dentes não erupcionados apresentam, durante o envelhecimento, alterações em nível metabólico, o que pode abrir caminho para novos estudos sobre biologia, fisiologia e patologia oral.

Palavras-chave: Envelhecimento. Folículo dentário. Biologia do desenvolvimento. Patologia bucal. Metabolômica. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Age-related metabolic pathways changes in dental follicles: a pilot study

Aging is not a matter of choice; it is our fate. The 'time-dependent functional decline that affects most living organisms' is coupled with several alterations in cellular processes, including cell senescence, epigenetic alterations, genomic instability, stem cell exhaustion, amongst others. Age-related morphological changes in dental follicles have been investigated for decades, mainly motivated by the fact that cysts and tumors may arise in association with a unerupted and/or impacted teeth. The more we understand dental follicles' physiology, the more we become able to contextualize biological events that can be associated with the occurrence of odontogenic lesions which incidence increases with age. Thus, our objective was to assess age-related changes in metabolic pathways of dental follicles associated with unerupted/impacted mandibular third molars from young and adult individuals. For this purpose, a convenience sample of formalin-fixed paraffin-embedded dental follicles from young (<16 y.o., n = 13) and adult (>26 y.o., n = 7) individuals was selected. Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)-based untargeted metabolomics. Multivariate and univariate analyses were conducted, and the prediction of altered pathways was performed by *mummichog* and GSEA approaches. Dental follicles from young and older individuals showed differences in pathways related to C21-steroid hormone biosynthesis, bile acid biosynthesis, galactose metabolism, androgen and estrogen biosynthesis, starch and sucrose metabolism and lipoate metabolism. Our findings support that similar to other human tissues, dental follicles associated with unerupted tooth show alterations at a metabolic level with aging, which can pave the way for further studies on oral pathology, oral biology and physiology.

Palavras-chave: Aging. Dental follicle. Developmental biology. Oral pathology. Metabolomics. Liquid chromatography. Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estágios da odontogênese..... | 15 |
| Figura 2 – Folículos dentários associados a dentes não irrompidos e impactados. | 21 |
| Figura 3 – Características histológicas de folículos dentários associados a dentes não erupcionados..... | 23 |
| Figura 4 – Lesões odontogênicas associadas a dentes não erupcionados..... | 26 |
| Figura 5 – <i>Hallmarks</i> do envelhecimento..... | 28 |
| Figura 6 – Representação esquemática de todo o fluxo de trabalho executado. .. | 34 |
| Figura 7 – Características histológicas dos folículos dentários incluídos no estudo. | 42 |
| Figura 8 – Representação esquemática dos conjuntos de dados tridimensionais produzidos..... | 43 |
| Figura 9 – Cromatogramas obtidos pelo modo positivo de ionização (ESI+). | 44 |
| Figura 10 – Cromatogramas obtidos pelo modo negativo de ionização (ESI-)..... | 45 |
| Quadro 1 – Síntese da otimização de parâmetros pelo package IPO..... | 47 |
| Figura 11 – Modelos gerados pela análise estatística multivariada..... | 48 |
| Figura 12 – Gráficos de dispersão da análise de enriquecimento das vias metabólicas. | 49 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 – Default da função peak picking (ESI+)..... | 86 |
| Gráfico 2 – Primeiro gráfico gerado para a função Peak Picking, após a adição dos demais parâmetros (ESI+). | 87 |
| Gráfico 3 – Último gráfico gerado para a função Peak Picking, após a adição dos demais parâmetros (ESI+). | 88 |
| Gráfico 4 – Primeiro gráfico gerado para a função RetGroup (ESI+). | 89 |
| Gráfico 5 – Último gráfico gerado para a função RetGroup (ESI+). | 90 |
| Gráfico 6 – Default da função peak picking (ESI-)..... | 91 |
| Gráfico 7 – Primeiro gráfico gerado para a função Peak Picking, após a adição dos demais parâmetros (ESI-). | 92 |
| Gráfico 8 – Último gráfico gerado para a função Peak Picking, após a adição dos demais parâmetros (ESI-). | 93 |
| Gráfico 9 – Primeiro gráfico gerado para a função RetGroup (ESI-). | 94 |
| Gráfico 10 – Último gráfico gerado para a função RetGroup (ESI-). | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Dados clínicos, demográficos e histológicos dos pacientes e amostras analisadas. | 41 |
| Tabela 2 – Resultados da análise de vias produzido pelo <i>mummichog</i> | 51 |
| Tabela 3 – Resultados da análise de vias produzido pelo <i>mummichog</i> +GSEA..... | 52 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 | O folículo dentário durante a odontogênese | 14 |
| 2.2 | Folículos dentários associados a dentes inclusos | 17 |
| 2.3 | Alterações morfológicas, moleculares, e patológicas nos folículos dentários de dentes não erupcionados | 21 |
| 2.4 | Investigações sobre o metabolismo no contexto do envelhecimento | 27 |
| 3 | OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 | Geral: | 30 |
| 3.2 | Específicos: | 30 |
| 4 | METODOLOGIA | 31 |
| 4.2 | Preparo da Amostra | 31 |
| 4.3 | Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) | 32 |
| 4.4 | Pré-processamento dos dados | 35 |
| 4.4.1 | Aquisição dos dados brutos | 35 |
| 4.4.2 | Otimização dos parâmetros e obtenção das planilhas de trabalho | 35 |
| 4.5 | Tratamento e processamento dos dados | 36 |
| 4.6 | Análise estatística | 38 |
| 4.6 | Predição de vias metabólicas alteradas | 38 |
| 5 | RESULTADOS | 41 |
| 5.1 | Descrição da amostra de estudo | 41 |
| 5.2 | Instrumentação no HPLC-MS e pré-processamento dos dados | 43 |
| 5.3 | Análise da estabilidade instrumental e análise estatística | 46 |
| 5.4 | Enriquecimento e análise das vias metabólicas | 49 |
| 6 | DISCUSSÃO | 53 |
| 7 | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 60 |
| | APÊNDICE A – Documentação apresentada junto ao Comitê de Ética em Pesquisa | 78 |
| | APÊNDICE B – Scripts executados e gráficos gerados nos packages IPO e XCMS | 85 |
| | APÊNDICE C – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico <i>Frontiers in Oral Health</i> | 98 |
| | APÊNDICE D – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico <i>Developmental Dynamics</i> | 99 |

1 INTRODUÇÃO

O folículo dentário compreende uma estrutura definida com um papel notável na odontogênese, periodontogênese e erupção dentária (CAHILL; MARKS, 1980; CHO; GARANT, 2000; MARKS, SANDY C., 1995; SARRAFPOUR *et al.*, 2013). Classicamente, o folículo dentário se define como o tecido de origem ectomesenquimal, derivado da crista neural, que envolve o dente durante a odontogênese (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971). Sob uma definição clínica, contudo, o termo “folículo dentário” pode compreender tanto o tecido ectomesenquimal clássico, quanto a porção epitelial que compõe o epitélio reduzido do órgão do esmalte (LARSON *et al.*, 1994). Nos casos de dentes inclusos ou impactados, esta estrutura permanece aderida à porção coronal de seu respectivo dente (STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). Alterações morfológicas e moleculares nestas estruturas são descritas, e manifestam-se de maneira relacionada ao avanço da idade (ADELSPERGER *et al.*, 2000; KUCUKKOLBASI; ESEN; ERINANC, 2014; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). A estas alterações morfológicas e moleculares, credita-se a possível origem de lesões odontogênicas, as quais podem se manifestar sob a forma de lesões císticas, hamartomas, neoplasias benignas e malignas, ainda que a ocorrência destas lesões seja incomum (GHAEMINIA *et al.*, 2020).

O envelhecimento é um processo complexo que envolve alterações em muitos processos celulares resultando em/de interações células-células alteradas, perda da proteostase celular, erosão telomérica, senescência celular, disfunção mitocondrial, alterações epigenéticas, instabilidade genômica, exaustão de células-tronco, entre outros (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). A complexidade multinível subjacente ao processo de envelhecimento envolve interações entre ácidos nucléicos, proteínas e é influenciada por fatores ambientais, que conjuntamente definem o chamado “fenótipo do envelhecimento” (SRIVASTAVA, 2019). A metabolômica, área emergente dentre as chamadas “ciências ômicas”, corresponde a uma ferramenta promissora para entender e caracterizar o fenótipo de células, tecidos, órgãos e organismos em diferentes contextos (FIEHN, 2002; NALBANTOGLU, 2019; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Ao se estudar o

metaboloma (conjunto de todos os metabólitos em organismos complexos), portanto, pode-se revelar mudanças fenotípicas relacionadas à funções biológicas específicas, derivadas de alterações nas concentrações de determinados metabólitos (ARMITAGE; BARBAS, 2014).

Diversos estudos têm sido conduzidos, em esforço a elucidar o impacto do envelhecimento em diferentes tecidos (ASPINALL, 2003; SRIVASTAVA, 2019). Ao se estudar a fisiologia do envelhecimento, nosso entendimento acerca do curso de doenças cuja incidência aumenta conforme o avanço da idade pode ser ampliado. Exemplos não faltam em relação a estas doenças, que afetam diferentes tecidos e órgãos do organismo: doença de Alzheimer, doenças reumáticas, cardiovasculares, metabólicas e, em especial, o câncer, entre várias outras (CAMPISI, 2013). Sendo assim, no presente estudo, investigamos as vias metabólicas alteradas em folículos dentários associados a terceiros molares de indivíduos adolescentes e adultos, por meio de uma abordagem metabolômica não direcionada (*untargeted*). Nosso objetivo foi apresentar uma lista de possíveis vias metabólicas alteradas, o que pode fornecer pistas para o entendimento da dinâmica do envelhecimento de folículos dentários, assim como abrir caminho para pesquisas futuras que possam vir a utilizá-los como modelos de estudo para elucidar os mecanismos de erupção dentária, fisiologia óssea, interações epitélio-mesênquima e outros fenômenos que podem ser investigados neste tecido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

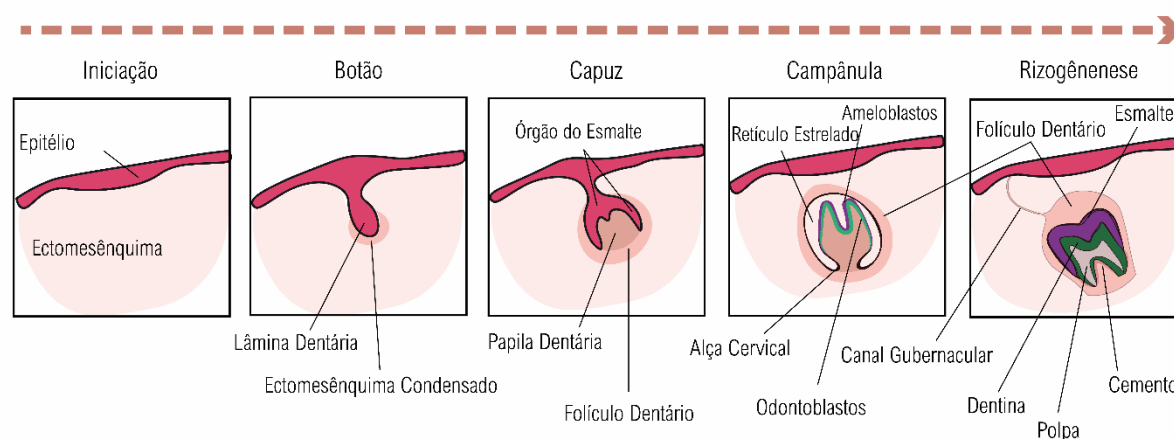
2.1 O folículo dentário durante a odontogênese

Durante a odontogênese, o folículo dentário se desenvolve no início do estágio de capuz, sendo composto principalmente por ectomesênquima condensado envolvendo o órgão do esmalte e a papila dentária e distinguindo-se desta última pela presença e organização dos componentes fibrilares da matriz extracelular e pela sua função (FIGURA 1) (BASTOS; GOMEZ; GOMES, 2021; CATE; MILLS; SOLOMON, 1971). O folículo dentário dá origem à cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos, células responsáveis pelo desenvolvimento do tecido periodontal (ou seja, osso alveolar, ligamento periodontal e cimento). Já as células da papila dentária organizam-se e dão origem ao complexo dentino-pulpar (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971). Apesar de tais características bem definidas nos componentes formadores do aparato dentário, modelos murinos e estudos com cultura de tecidos sugerem a participação da papila dentária imatura no desenvolvimento do folículo dentário, conforme descrito por Rothová e colaboradores (2012) (ROTHOVÁ; PETERKOVÁ; TUCKER, 2012). De fato, o referido trabalho também foi capaz de demonstrar a retenção do potencial de células destinadas a originar o folículo dentário em se diferenciarem em odontoblastos no estágio de capuz, revelando o poder dos sinais indutivos fornecidos pelo epitélio interno do órgão do esmalte e seu microambiente em incitarem esta diferenciação (ROTHOVÁ; PETERKOVÁ; TUCKER, 2012).

O reconhecimento do folículo dentário como estrutura precursora do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar remonta à década de 1960 ou mesmo antes (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971; HOFFMAN, 1966), ainda que fenômenos específicos relacionados a estes processos não pudessem ser totalmente compreendidos àquela época. Pela morfologia, três “estratos” teciduais são descritos compondo o folículo dentário: um associado ao osso, um associado ao dente e uma camada intermediária (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971; DIEKWISCH, 2002; HOFFMAN, 1966). Assim, foi sugerido que o termo *folículo dentário* fosse reservado apenas para a camada interna de tecido ectomesenquimal do folículo que

dá origem ao cemento (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971), ao passo que o termo *mesênquima perifolicular* deveria ser usado para se referir ao tecido remanescente do folículo dentário clássico, que origina o ligamento periodontal e o osso alveolar (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971; CHO; GARANT, 2000; PALMER; LUMSDEN, 1987). Por acepção cirúrgica, baseada no folículo dentário associado ao dente não irrompido, no entanto, o folículo dentário seria composto por uma camada externa (ectomesenquimal), correspondendo ao folículo dentário clássico, e por uma camada interna, relativa ao epitélio reduzido do órgão do esmalte (LARSON *et al.*, 1994; MARKS, SANDY C.; CAHILL; WISE, 1983).

Figura 1 — Estágios da odontogênese.



Legenda: As interações múltiplas e recíprocas entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente são responsáveis pelo desenvolvimento dos dentes. A coroa do dente é formada ao longo de quatro etapas principais: iniciação, seguida das etapas de botão, capuz e campânula, cada uma caracterizada por características morfológicas e moleculares específicas. Uma vez que a coroa do dente é formada, a raiz do dente começa seu desenvolvimento através da extensão da alça cervical do órgão do esmalte em direção apical. A histodiferenciação dos tecidos de suporte dentário também começa nesta fase, auxiliando no desenvolvimento do periodonto.

Fonte: Traduzido e Adaptado de BASTOS, V.C.; GOMEZ, R.S.; GOMES, C.C. 2021, *epub ahead of print*.

Apesar de todo o debate histórico acerca de tais terminologias, as células do folículo dentário, em suas diferentes camadas/estratos, são definitivamente as células que dão origem ao periodonto (SCHROEDER, 1986a). Inúmeros experimentos em que germes dentários dissecados foram implantados em órgãos como a cápsula renal ou nos olhos de animais, provaram que o germe dentário é capaz de prover todos os tipos celulares para formar dentes e o tecido periodontal. A origem do osso alveolar a partir de células do folículo dentário foi evidenciada por

Diep e colaboradores (2009), respondendo a dúvidas lançadas há décadas por Hoffman (1966) e Ten Cate (1971). Estes consideravam o desenvolvimento do tecido periodontal como um produto das relações indutivas das células do folículo dentário sobre o microambiente do sítio de implantação (as células do folículo recrutariam e induziriam a histodiferenciação de tecidos vizinhos adjacentes). Assim, excluía-se a possibilidade de que tais células carregassem um potencial de diferenciação celular *per se* (CATE; MILLS; SOLOMON, 1971; CHO; GARANT, 2000; DIEP *et al.*, 2009; HOFFMAN, 1966). Estudos avaliando a dinâmica de migração de células ectomesenquimais também evidenciaram tanto a subpopulação celular que dá origem à papila dentária e à camada mais interna do folículo dentário clássico (ROTHOVÁ; PETERKOVÁ; TUCKER, 2012; YOSHIKAWA; KOLLAR, 1981), quanto a subpopulação do então chamado mesênquima perifolicular que carrega o potencial de originar cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (DIEKWISCH, 2002; DIEP *et al.*, 2009).

À medida em que o dente se desenvolve, seguido pela formação da raiz, o processo alveolar se emancipa e amadurece. Ao final da fase de campânula, septos e pontes ósseas podem ser observados, individualizando cada germe dentário em uma posição específica (CHO; GARANT, 2000). O movimento deste em diferentes posições assegura seu correto posicionamento ao logo do plano oclusal no interior dos ossos gnáticos em desenvolvimento. Enquanto as raízes são formadas, o processo alveolar aumenta em altura (CHO; GARANT, 2000; SCHROEDER, 1986b). Neste momento, as células do folículo dentário alcançam sua apoteose, diferenciando-se nas células que compõem o ligamento periodontal, cemento e osso.

O papel do folículo dentário na erupção do dente é notável: mesmo na ausência de movimentos dentários naturais, o folículo dentário expande em direção ao plano oclusal, seguindo o canal gubernacular, e conduz a reabsorção óssea, criando uma rota para erupção dentária, caracterizada pelo influxo de células mononucleares que se diferenciam em osteoclastos (WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002). Esse fenômeno foi demonstrado em pré-molares de filhotes de cães por Cahill em 1969, em modelo de impactação dentária induzida experimentalmente (CAHILL, 1969). A remoção da coroa do dente sem perturbação significativa do folículo dentário não interrompeu a formação do “caminho” de

erupção. Além disso, em experimentos adicionais, foi demonstrado que a remoção cirúrgica do folículo dentário em cães afeta negativamente o alongamento das raízes dentárias e a erupção dentária (CAHILL; MARKS, 1980). À luz das evidências mais recentes, os padrões de migração e diferenciação das células do folículo parecem justificar tal impacto (DIEKWISCH, 2002).

É importante enfatizar que a odontogênese/periodontogênese humana difere de outros mamíferos, embora muitos dos eventos possam ser inferidos e recapitulados por modelos animais – historicamente envolvendo camundongos, ratos e cães (COBOURNE; SHARPE, 2010; MARKS, SANDY C.; SCHROEDER, 1996; MILETICH, 2003; SEPPALA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2005). Alguns excelentes artigos originais e revisões delineiam as diferenças entre humanos, outros mamíferos e até mesmo entre outras classes de animais, recapitulando o desenvolvimento de tecidos orofaciais sob perspectiva evolutivo-desenvolvimental (GAENGLER; METZIER, 1992; LANDOVA SULCOVA *et al.*, 2020; MCCOLLUM; SHARPE, 2001; ORTIZ *et al.*, 2018; RENVOISÉ; MICHON, 2014). O desenvolvimento e relação anatômica dos tecidos periodontais são atualmente uma questão de debate, alguns abrigando uma relevância prática na odontologia e medicina regenerativa (YELICK; SHARPE, 2019).

2.2 Folículos dentários associados a dentes inclusos

À medida em que o dente em desenvolvimento completa seu destino, ao longo da formação da coroa, raiz e tecidos periodontais, o dente inicia seu processo de erupção. Cinco estágios são descritos na erupção dentária: movimentos pré-eruptivos, estágio intraósseo, penetração na mucosa, estágios pré- e pós-oclusais (ALMONAITIENE; BALCIUNIENE; TUTKUVIENE, 2010; KREIBORG; JENSEN, 2018). Citando Wise (1998), “a erupção dentária é o único processo de desenvolvimento em que um tecido semiduro deve escapar de sua ‘concha’, o osso alveolar no qual está envolvido” (WISE, 1998). Conforme mencionado anteriormente, o folículo dentário desempenha papel decisivo durante a erupção, ainda alguns fenômenos pareçam incluir a participação do órgão do esmalte/epitélio reduzido do

órgão do esmalte (CAHILL; MARKS, 1980; LIU *et al.*, 2016; MARKS, S. C.; GORSKI; WISE, 1995; MARKS, SANDY C.; SCHROEDER, 1996; WISE, 1998). Enquanto as células do folículo dentário, após recrutarem e ativarem osteoclastos, se diferenciam em osteoblastos em prol de mediar a remodelação óssea ao longo da rota de erupção, há evidências da importância do retículo estrelado em fornecer sinais para células do folículo, atuando como uma espécie de “relógio” na condução da erupção dentária (HONDA *et al.*, 2010; WISE, 1998; ZHOU, T. *et al.*, 2019). De maneira harmônica, no retículo estrelado de dentes de cães, uma espécie difiodonte (assim como os humanos), a proeminente fragmentação da sialoproteína DF-95 ao início da erupção dentária parece ser um dos principais marcadores deste processo (GORSKI *et al.*, 1988, 1994; WISE, 1998). Contudo, quando o órgão do esmalte é dissociado do folículo dentário, a erupção ainda ocorre, reafirmando o papel do folículo dentário como “protagonista” (LARSON *et al.*, 1994).

Inúmeros marcadores de erupção dentária encontram-se descritos, e compõem uma cascata complexa de processos com a participação de hormônios, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, tais como proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), TGF- α , interleucina 1 alfa (IL-1 α), fator estimulador de colônias-1 (CSF-1), proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (e seus respectivos receptores), proto-oncogenes e fatores de transcrição, a exemplo de como c-Fos, fator nuclear-kappa (NF κ B1 e NF κ B2) (MARKS, S. C.; GORSKI; WISE, 1995). É necessário que se interprete tais dados com cautela, dado que algumas destas moléculas estejam relacionadas ao desenvolvimento de grupos de dentes específicos (p.ex. incisivos, caninos, pré-molares e molares) e, além disso, uma vez que a maioria destas moléculas e vias de sinalização foram investigadas em modelos animais, deve-se estar atento às diferenças entre as espécies. A “beleza da erupção dentária” exalta sua interpretação como um processo biológico, ao longo de uma cascata de desenvolvimento bem orquestrada, em vez da mentalidade inconscientemente estabelecida desse processo como um mero resultado de vetores de força (WISE, 1998). Uma vez reforçado isso, podemos então prestar atenção a outros fatores envolvidos no processo de erupção, tais como a sensibilidade do folículo dentário às forças de mordida e o modo como esta também pode levar o dente à sua posição funcional nos ossos gnáticos (SARRAFPOUR *et al.*, 2013).

Determinantes celulares, moleculares e genéticos da erupção dentária e condições humanas que afetam a erupção dentária foram revisados por Wise e colegas (2002) (WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002). Conforme comentado por Kjær (2014), estudos da erupção dentária em humanos são raramente histológicos, valendo-se sobretudo de avaliações clínicas e radiográficas (KJÆR, 2014). Apesar desta limitação, determinantes genéticos, sexo, estado nutricional, parto pré-termo, presença de doenças sistêmicas, altura e peso corporais, morfologia craniofacial e mesmo fatores socioeconômicos podem provocar desvios da normalidade na erupção dentária (ALMONAITIENE; BALCIUNIENE; TUTKUVIENE, 2010). Correlações entre a erupção dentária, maturação ósseo-esquelética e idade parecem indicar a impactação dentária como resultante da maturação dentária tardia em conjunto a uma maturação ósseo-esquelética precoce (KJÆR, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre quais parâmetros afetam a maturação dentária (KJÆR, 2014). Falhas ou incapacidade do folículo dentário em iniciar e promover eventos metabólicos responsáveis pela reabsorção óssea ao longo do trajeto de erupção podem levar a desvios desta ou mesmo à impactação dentária (KJÆR, 2014; RAGHOEBAR *et al.*, 1991).

Na literatura encontram-se descritos doenças e lesões relacionadas às alterações celulares e moleculares associadas ao componente ectomesenquimal do folículo dentário ou aos remanescentes epiteliais que povoam o mesmo, e como estas podem estar associadas a não-erupção dentária. Dentre elas, destaca-se uma doença rara, denominada folículos dentários hiperplásicos e calcificantes múltiplos, a qual se caracteriza pela presença de folículos dentários atípicos, constituídos por um tecido conjuntivo fibroso, denso, hiperplásico e com focos de material mineralizado, associados à falhas na erupção dentária (DESAI *et al.*, 2017; GOMEZ *et al.*, 2007; GUARDADO-LUEVANOS *et al.*, 2020; WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002). Adicionalmente, distúrbios na erupção dentária podem compor parte do fenótipo expresso em algumas síndromes e distúrbios genéticos, a exemplo da síndrome GAPO, síndrome de Down, mucopolissacaridose IV, displasia osteoglofônica, osteogênese imperfeita tipo I, osteopetrose, displasia cleidocranial, entre outras (ALMONAITIENE; BALCIUNIENE; TUTKUVIENE, 2010; KIM, S.-G. *et al.*, 2008; KJÆR, 2014; SURI; GAGARI; VASTARDIS, 2004; WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002). Além disso, alterações patológicas nos folículos

dentários estão implicadas na origem das lesões odontogênicas, um amplo espectro de entidades que vão desde hamartomas, a neoplasias benignas e malignas.

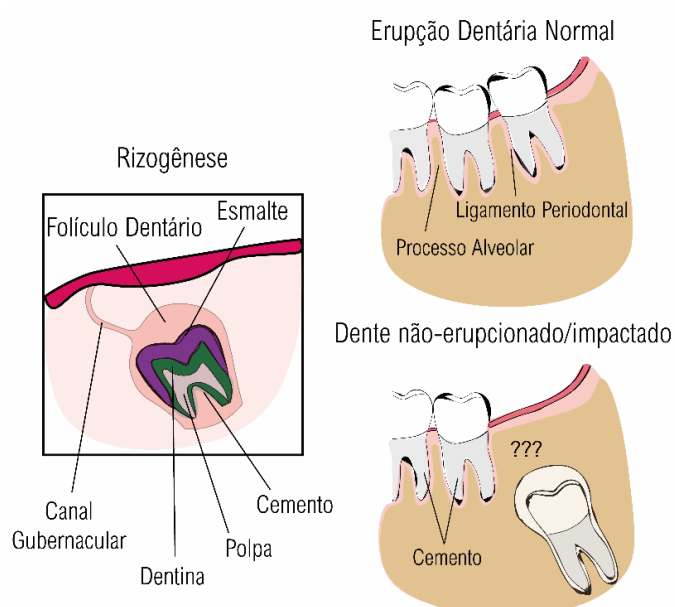
Na periodontogênese, enquanto a porção apical do folículo dentário se diferencia em cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, sua porção coronal permanece ligada à coroa do dente e conduz a erupção (CHO; GARANT, 2000; USSING, 1955). Concomitantemente, conforme os dentes erupcionam, o mesênquima perifolicular dá origem aos fibroblastos do tecido conjuntivo gengival, ao passo que o epitélio reduzido do esmalte se transforma, estabelecendo o epitélio juncional ao longo da junção dento-gengival (CHO; GARANT, 2000).

Após atingir o completo desenvolvimento de raiz, ligamento periodontal e osso alveolar, o tecido ectomesenquimal do folículo, bem como o mesênquima perifolicular frouxamente arranjado torna-se uma estrutura rica em fibras colágenas e aderida à coroa do dente (CHO; GARANT, 2000; USSING, 1955). O epitélio reduzido do esmalte, geralmente perdido após a erupção do dente após sua transformação em epitélio juncional ou apoptose (HYUN *et al.*, 2019), permanece preso à superfície do dente e ao tecido conjuntivo do folículo dentário (KIM, J.; ELLIS, 1993). A persistência deste tecido em associação à coroa do dente foi recentemente destacada por Consolaro & Cardoso, destacando potenciais implicações de tal permanência no manejo ortodôntico (2019): “a manutenção do tecido pericoronar protegeria o esmalte da atividade das células clásticas; evitaria a formação de osso diretamente na superfície do esmalte; atuaria como uma interface ao ambiente interno do corpo durante a erupção dentária, proporcionando proteção ao compartimento interno frente ao ambiente altamente contaminado da cavidade oral”(CONSOLARO; CARDOSO, 2019).

Está bem estabelecido que a formação do dente e a erupção do dente são eventos inter-relacionados, e que os dentes permanentes geralmente irrompem quando dois terços a três quartos da raiz são formados (KREIBORG; JENSEN, 2018). Alterações e perturbações durante a rizogênese podem levar ao retardo ou ausência da erupção dentária, embora distúrbios da erupção possam ocorrer mesmo em dentes que se desenvolvem normalmente (HANISCH *et al.*, 2018; LUDER, 2015; SHARMA *et al.*, 2016; SURI; GAGARI; VASTARDIS, 2004). A complexidade que permeia estes processos impõe diversas dificuldades ao manejo clínico, trazendo

consequências diretas nas funções mastigatórias, na oclusão e, conseqüentemente, na saúde bucal dos pacientes. Sobre os dentes impactados, as raízes podem se desenvolver normalmente, assim como o ligamento periodontal e o osso alveolar (FIGURA 2). Porém, persiste uma radiolucência na porção coronal do dente, às vezes ao longo da vida, inserida na junção cimento-esmalte, correspondendo ao folículo dentário e ao epitélio do esmalte reduzido ou, como alguns autores preferem designar, saco dentário (CONSOLARO; CARDOSO, 2019).

Figura 2 — Folículos dentários associados a dentes não erupcionados e impactados.



Legenda: À medida em que a raiz do dente é formada (rizogênese), o dente começa seu processo de erupção. No entanto, este processo pode não ocorrer, a exemplo de casos em que há uma barreira física, por limitação de espaço ou outros fatores anatômicos que levam à impactação dentária, ou a falhas diversas e desconhecidas, relacionadas à capacidade do folículo em comandar a erupção.

Fonte: Autoria própria (2021).

2.3 Alterações morfológicas, moleculares, e patológicas nos folículos dentários de dentes não erupcionados

Mudanças morfológicas relacionadas à idade no contexto dos folículos dentários têm sido investigadas por quase um século, principalmente motivadas pelo conhecimento de lesões císticas e tumorais que eventualmente se desenvolvem em

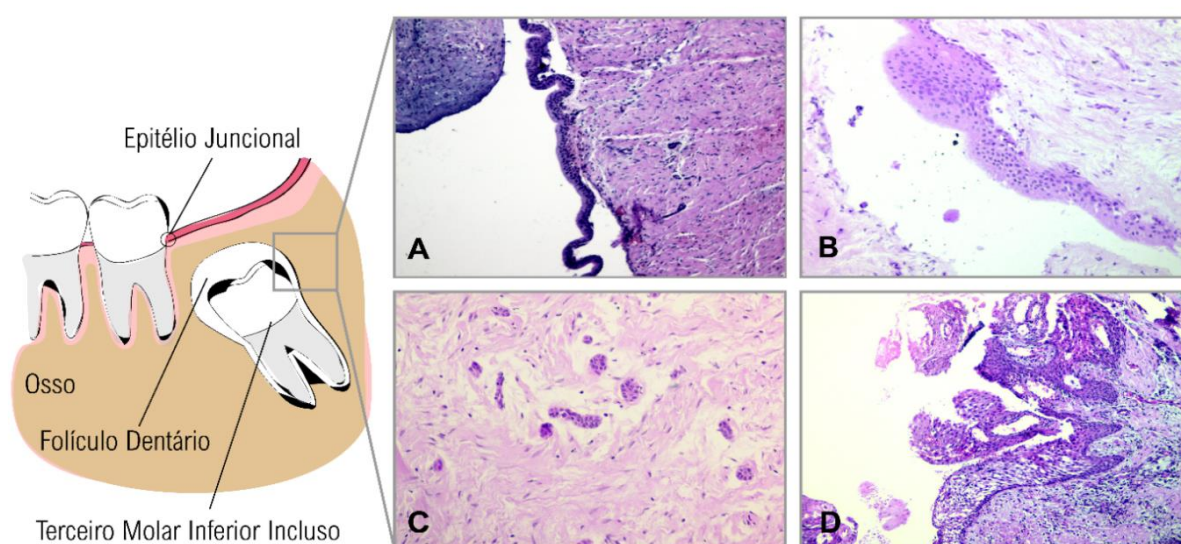
relação a dentes não-irrompidos ou impactados. Como exemplo destas lesões, podemos citar os cistos dentígeros, ceratocisto odontogênico, ameloblastoma, entre outros) (CONKLIN; STAFNE, 1949; CURRAN; DAMM; DRUMMOND, 2002; GETTINGER, 1940; MOHAMMED; MAHOMED; NGWENYA, 2019; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). Por outro lado, alterações moleculares só puderam ser investigadas mais recentemente, frente às possibilidades e avanços do campo da biologia molecular.

A avaliação de alterações morfológicas e moleculares se dá sobretudo nos tecidos pericoronais de terceiros molares inclusos, haja vista que estes são os últimos dentes a completarem seu desenvolvimento e a erupcionar. Além disso, estes são os dentes mais comumente associados a distúrbios eruptivos, impactações, e à lesões císticas e tumorais, ainda que estas últimas sejam bastante incomuns (GHAEMINIA *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2019). Considerando a frequência estimada (0,8-3,6%) de dentes impactados na população (KACZOR-URBANOWICZ; ZADURSKA; CZOCHROWSKA, 2016; MELLO *et al.*, 2019), poderíamos esperar que a caracterização das alterações morfológicas e moleculares em folículos dentários estivessem bem sedimentadas. No entanto, estas informações ainda são escassas.

Uma das mais consagradas alterações morfológicas observadas nos folículos dentários diz respeito à metaplasia escamosa do tecido epitelial que o reveste. Esta alteração parece se manifestar de maneira idade-dependente. O delgado epitélio cuboidal do órgão do esmalte (FIGURA 3A) se transforma em um epitélio estratificado escamoso, não queratinizado (FIGURA 3B). Com menor frequência, a metaplasia mucosa (algumas vezes referida como prosoplasia mucosa) pode ser observada (CURRAN; DAMM; DRUMMOND, 2002; DE MELLO PALMA *et al.*, 2018; KUCUKKOLBASI; ESEN; ERINANC, 2014; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). A metaplasia altera o padrão de fixação do epitélio, que antes se encontraria aderido à superfície do esmalte dentário e, uma vez metaplásico, passa a ser mais fortemente aderido ao tecido conjuntivo do folículo dentário (STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965; USSING, 1955). A inflamação nos tecidos foliculares, além de ser mais comumente observada em indivíduos acima dos 20 anos de idade, também se correlaciona com a metaplasia escamosa (DE MELLO PALMA *et al.*, 2018; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965) (FIGURA 3D). Tais alterações

morfológicas são descritas em associação a aspectos clínicos diversos, como relacionados à posição e angulação do dente no interior dos ossos maxilares (COSTA, F. W. G. *et al.*, 2014; DONGOL *et al.*, 2018; HAIDRY *et al.*, 2018; SATHEESAN *et al.*, 2016; SIMSEK-KAYA *et al.*, 2011; TAMB UWALA *et al.*, 2015), idade e sexo (ADAKI *et al.*, 2013; GLOSSER; CAMPBELL, 1999; MOHAMMED; MAHOMED; NGWENYA, 2019; RAKPRASITKUL, 2001; SARAVANA; SUBHASHRAJ, 2008; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965; WALI; SRIDHAR; SHYLA, 2012; YILDIRIM *et al.*, 2008), e a presença/ausência de sintomatologia associada (ESEN *et al.*, 2016; KOTRASHETTI *et al.*, 2010; NAMGYEL *et al.*, 2020). O clássico artigo de Stanley e colaboradores (1965), envolvendo 70 amostras de tecidos pericoronários, relata de maneira específica alguns destes achados morfológicos relacionados a idade. O revestimento epitelial escamoso do folículo se torna o predominante após os 22 anos de idade; ao passo que o típico revestimento por epitélio reduzido do órgão do esmalte não foi observado após os 26 anos de idade. Também de maneira idade dependente, nota-se a gradual perda de ilhotas de epitélio odontogênico que povoam o tecido conjuntivo do folículo (FIGURA 3C) (STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965).

Figura 3 — Características histológicas de folículos dentários associados a dentes não erupcionados.



Legenda: (A) Delgado epitélio do órgão do esmalte reduzido, cúbico, que reveste o tecido conjuntivo do folículo dentário. À medida que o indivíduo envelhece, esse epitélio é gradativamente substituído por outro, espesso, escamoso, estratificado e não queratinizado (B). Ilhotas típicas de epitélios odontogênicos povoam o tecido conjuntivo dos folículos (C) e desaparecem gradualmente de maneira idade-dependente. A inflamação nos folículos dentários pode levar a alterações morfológicas, aqui exemplificadas pela metaplasia escamosa e alterações degenerativas do

revestimento epitelial (D). O significado de tais alterações no desenvolvimento das lesões odontogênicas permanece controverso. Lâminas de tecido representativas foram coradas com H&E.

Fonte: Traduzido e Adaptado de BASTOS, V.C.; GOMEZ, R.S.; GOMES, C.C. 2021, *epub ahead of print*.

Em relação às alterações moleculares, estas também tem sido investigadas, sobretudo na tentativa de se estabelecer vínculos entre o balanço na expressão de marcadores de proliferação e morte celular e o desenvolvimento de lesões odontogênicas. Há estudos que avaliaram os padrões de expressão de marcadores de proliferação celular, a exemplo das proteínas Ki-67, PCNA, MCM-2, MCM-3 e AgNOR (ADELSPERGER *et al.*, 2000; CABBAR *et al.*, 2008; COŞARCĂ *et al.*, 2016; GÜLER; ÇOMUNOĞLU; CABBAR, 2012; KUCUKKOLBASI; ESEN; ERINANC, 2014); marcadores pró e anti-apoptóticos como Fas e Bcl-2 (EDAMATSU *et al.*, 2005; RAZAVI *et al.*, 2012); atividade oncogênica de p63 e do papel de supressão tumoral de p53 (COŞARCĂ *et al.*, 2016; MATSUMOTO *et al.*, 2006); além da participação de fatores de transcrição da família AP-1, tais como ATF-2 e FRA2 (BOLAT; KEKLIKOGU, 2010), receptores de fatores de crescimento, como o EGFR e da imunoreatividade anti-DNA de fita simples (ssDNA) (CIMADON *et al.*, 2014; EDAMATSU *et al.*, 2005). Como se constata, a maior parte destes estudos se concentra na avaliação de alvos específicos, denunciando a falta de análises de perfil global das alterações moleculares.

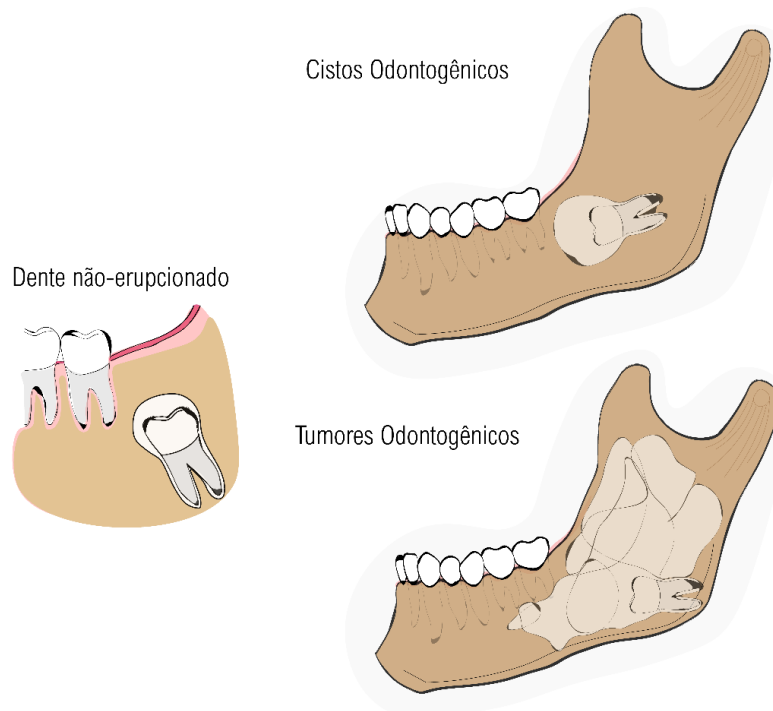
É difícil estabelecer onde as alterações que surgem com o tempo nos folículos dentários se posicionam ao longo do espectro saúde-doença. Enquanto alguns autores apoiam a ideia de que tais alterações representem alterações adaptativas normais, outros endossam sua interpretação como sinais precoces do desenvolvimento de lesões, sobretudo pela natureza das alterações moleculares mais comumente analisadas – marcadores de proliferação celular e fatores anti-apoptóticos (ADELSPERGER *et al.*, 2000; CABBAR *et al.*, 2008; COŞARCĂ *et al.*, 2016; DALEY; WY SOCKI, 1995; DE MELLO PALMA *et al.*, 2018; EDAMATSU *et al.*, 2005; SLATER, 2000; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). De fato, as dificuldades em se definir o que pode ser considerado normal ou patológico também impõe dificuldades ao diagnóstico (DALEY; WY SOCKI, 1995). Em algumas circunstâncias, tanto o folículo dentário quanto a papila dentária podem ser

erroneamente diagnosticados como cistos ou tumores odontogênicos, em proporções de até 20% dos casos (KIM, J.; ELLIS, 1993).

Além das alterações morfológicas e moleculares, é reconhecido que células do folículo dentário podem dar origem a cistos e tumores odontogênicos (FIGURA 4) (BRKIĆ, 2014; CURRAN; DAMM; DRUMMOND, 2002; DE MENEZES *et al.*, 2020). Estas lesões recapitulam, de maneira aberrante, os aspectos morfológicos e moleculares dos tecidos organizados nas diferentes fases da odontogênese, de certo modo revertendo a ontogênese dos dentes e tecido periodontal (DINIZ *et al.*, 2017; WRIGHT; SOLUK TEKKEŞIN, 2017). Embora a maioria das lesões sejam benignas, algumas exibem um comportamento localmente agressivo e altas taxas de recidiva (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Neoplasias odontogênicas malignas podem surgir *de novo*, enquanto outras podem se desenvolver a partir da transformação maligna de neoplasias benignas pré-existentes (ARAÚJO *et al.*, 2014; BODNER *et al.*, 2011; CHRETIEN *et al.*, 1970; COLBERT *et al.*, 2012; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; GAY-ESCODA *et al.*, 2015; IDE, F. *et al.*, 2008; IDE, FUMIO *et al.*, 2008; KRAMER; SCRIBNER, 1965; LEE; LOKE, 1967; MANGANARO; CROSS; STARTZELL, 1997; MEADOW, 1966; PANNEERSELVAM *et al.*, 2017; WALDRON; MUSTOE, 1989; WILLIAMS; NEWMAN, 1963; YASUOKA *et al.*, 2000). Grande parte das lesões odontogênicas acometem indivíduos durante o início e metade da fase adulta (entre terceira e quinta décadas de vida), ao passo que as lesões malignas apresentam um pico de incidência mais tardio (CURRAN; DAMM; DRUMMOND, 2002; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Em prol de se investigar assinaturas genéticas de tumores odontogênicos em folículos dentários associados a dentes não erupcionados, Coura e colaboradores (2020) analisaram a presença das mutações *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12R e *KRAS* p.G12V nestes tecidos (COURA; DE RESENDE; *et al.*, 2020). Estas são consideradas mutações *drivers* em ameloblastoma (*BRAF* p.V600E) e tumor odontogênico adenomatoide (*KRAS* p.G12R e *KRAS* p.G12V) (COURA *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2016; KURPPA *et al.*, 2014). No entanto, nenhuma das amostras de folículos dentários testou positivo para tais mutações.

Alterações patológicas em folículos dentários de dentes não erupcionados, que seriam compatíveis com o diagnóstico de lesões como cisto dentígero, ceratocisto odontogênico e ameloblastomas são frequentemente descri-

Figura 4 — Lesões odontogênicas associadas a dentes não erupcionados.



Legenda: As lesões odontogênicas compreendem uma ampla gama de entidades com comportamento clínico, características morfológicas e imaginológicas altamente variáveis. Essas lesões recapitulam o arranjo morfológico dos tecidos dentais/periodontais em desenvolvimento de forma aberrante. Aqui, estamos nos concentrando em lesões que surgem em associação com dentes não irrompidos, para os quais a fonte mais provável são os remanescentes dos folículos dentários. Radiograficamente, os cistos e tumores odontogênicos podem apresentar-se como imagens radiolúcidas uniloculares ou multiloculares, podendo levar à destruição óssea, reabsorção radicular, perda e deslocamento dentário, além de assimetrias faciais.

Fonte: Traduzido e Adaptado de BASTOS, V.C.; GOMEZ, R.S.; GOMES, C.C. 2021, *epub ahead of print*.

-tas, mesmo em associação a exames radiográficos compatíveis com a normalidade (ADAKI *et al.*, 2013; ADELSPERGER *et al.*, 2000; AL-KHATEEB; BATAINEH, 2006; BRKIĆ *et al.*, 2010; COSTA, F. W. G. *et al.*, 2014; CURRAN; DAMM; DRUMMOND, 2002; GLOSSER; CAMPBELL, 1999; KOTRASHETTI *et al.*, 2010; MELETI; VAN DER WAAL, 2013; MOHAMMED; MAHOMED; NGWENYA, 2019; RAKPRASITKUL, 2001; SARAVANA; SUBHASHRAJ, 2008; SATHEESAN *et al.*, 2016; STATHOPOULOS *et al.*, 2011; TAMB UWALA *et al.*, 2015; WALI; SRIDHAR; SHYLA, 2012; YILDIRIM *et al.*, 2008). Em menor frequência, outras lesões odontogênicas são descritas em associação ao folículo dentário de dentes não irrompidos, a exemplo de cisto odontogênico calcificante, mixoma odontogênico e até mesmo carcinoma odontogênico (KOTRASHETTI *et al.*, 2010; STATHOPOULOS *et al.*,

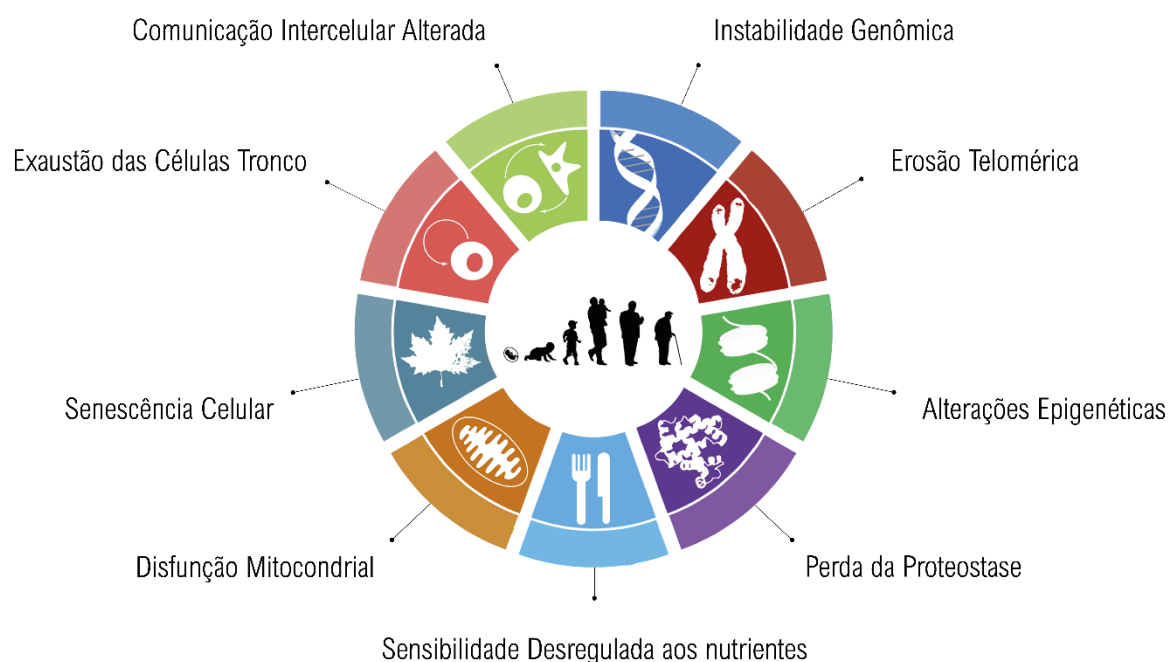
2011; YILDIRIM *et al.*, 2008). Ao encontro de tais achados, uma revisão sistemática e meta-análise revelou uma prevalência de 5,3% de cistos e tumores odontogênicos associados a um terceiro molar não erupcionado (MELLO *et al.*, 2019). Confirmando um possível efeito do envelhecimento subjacente ao surgimento destas lesões, a prevalência das lesões foi maior em pacientes acima dos 40 anos de idade (MELLO *et al.*, 2019). Apesar disso, nenhum consenso acerca da remoção profilática de terceiros molares está estabelecida, embora este seja um procedimento comumente realizados em estabelecimentos de saúde bucal ao redor do mundo (DE MELLO PALMA *et al.*, 2018; GHAEMINIA *et al.*, 2020).

2.4 Investigações sobre o metabolismo no contexto do envelhecimento

Apesar de ser passível de ser amenizado ou desacelerado, o envelhecimento é uma condição inevitável e inerente à espécie humana (MITTELDORF; FAHY, 2018; NELSON; MASEL, 2017, 2018). O envelhecimento se apresenta como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças que afetam diversos órgãos e sistemas (sarcopenia, insuficiência cardíaca, osteoporose, insuficiências pulmonar e renal, neurodegeneração e câncer, por exemplo) (CAMPISI, 2013). Neste sentido, a caracterização molecular de mudanças relacionadas ao avanço da idade observadas em folículos dentários pode favorecer a compreensão relacionados a fase de “declínio funcional tempo-dependente que afeta a maioria dos organismos”, que define o processo de envelhecimento em sua totalidade. Sabe-se que este processo está acoplado a uma série de alterações nos processos celulares, as quais resultam de/em interações célula-célula alteradas, perda da proteostase celular, erosão telomérica, senescência celular, disfunção mitocondrial, alterações epigenéticas, instabilidade genômica, exaustão das células tronco, entre outros que, conjuntamente compõem os *hallmarks* do envelhecimento (DA COSTA, J. P. *et al.*, 2016; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Estes encontram-se apresentados na Figura 5.

Para vários tecidos humanos, é possível encontrar uma caracterização clara acerca das alterações idade-dependente que ocorrem conforme os indivíduos envelhecem (ASPINALL, 2003; SRIVASTAVA, 2019). Todavia, em relação aos folículos dentários, conforme mencionado anteriormente, apenas alvos específicos têm sido mais robustamente investigados no campo molecular. Recentemente, nosso grupo investigou alterações epigenéticas através da avaliação do perfil global de metilação e hidroximetilação de DNA em folículos dentários, sendo capaz de observar uma diminuição da hidroximetilação em relação ao avanço da idade (DE MENEZES *et al.*, 2020). Contudo, o significado biológico e funcional desta alteração ainda carece de maiores estudos.

Figura 5 — *Hallmarks* do envelhecimento.



Fonte: Traduzido e adaptado de LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013, p. 1195.

Fenômenos como a senescência celular, alterações nas interações celulares, disfunção mitocondrial, alterações epigenéticas, na proteostase, entre vários outros, desempenham papel significativo nas alterações fenotípicas observadas com o aumento da idade e, de maneira singular, podem também revelar aspectos relevantes ao desenvolvimento de diversas doenças (CAMPISI, 2013; WILEY; CAMPISI, 2016). A complexidade subjacente ao processo de envelhecimento, tal como se observa através da descrição dos *hallmarks*, necessita

de ser considerada e analisada integralmente, observando-se todo o fluxo de informações que se estabelece em todas as interações moleculares que ocorrem nos tecidos que compõem o organismo. Neste sentido, visando o entendimento robusto/holístico acerca de diversos processos, associados ou não a doenças, a metabolômica baseada em espectrometria de massas se apresenta como uma técnica amplamente informativa para a caracterização do perfil metabólico associado a genótipos específicos, progressão de doenças, alvos terapêuticos, constituindo-se como ferramenta útil na elucidação de contextos biológicos diversos (KAUSHIK; DEBERARDINIS, 2018). Segundo Armitage e Barbas (2014), explorar o metaboloma pode ser considerado a melhor forma de se revelar alterações fenotípicas relacionadas às funções biológicas (ARMITAGE; BARBAS, 2014). De forma importante, o estudo do metaboloma no contexto de envelhecimento e do avanço da idade e suas influências em diferentes tecidos já foi conduzido por diferentes grupos, revelando diferentes aspectos causados pelo envelhecimento em amostras de pele, cérebro, plasma sanguíneo, entre outros tecidos e fluidos (CHENG *et al.*, 2017; IVANISEVIC *et al.*, 2016; KUEHNE *et al.*, 2017).

A partir desta abordagem, entender e caracterizar alterações morfológicas, celulares e moleculares de tecidos pericoronários em relação a idade poderia clarear e elucidar os papéis fisiológicos deste tecido embrionário remanescente. Assim, o presente trabalho visa descrever vias metabólicas que sofrem alterações relacionadas ao envelhecimento em amostras de folículos dentários de indivíduos adolescentes e adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

3.1.1 Investigar as vias metabólicas alteradas em folículos dentários.

3.2 Específicos:

3.2.1 Identificar e descrever as vias metabólicas que discriminam folículos dentários de indivíduos adolescentes e adultos.

3.2.2 Comparar o perfil metabolômico de folículos dentários de indivíduos adolescentes e adultos.

3.2.3 Explorar a participação das vias metabólicas discriminantes no contexto do envelhecimento.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção e obtenção das amostras

O presente estudo foi realizado sob aprovação do projeto em parecer (número:4.082.478) do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) (protocolo CAAE: 30697120.9.0000.5149). A documentação referente aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), Dispensa do TCLE e Parecer Consubstanciado são apresentados no Apêndice A.

Blocos de folículos dentários associados a terceiros molares inclusos fixados em formol e incluídos em parafina foram obtidos do arquivo do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial (FO-UFMG). Dois grupos amostrais ($n=15$ /grupo) foram estabelecidos com base na idade. Almejou-se a inclusão de amostras de indivíduos os mais jovens e mais velhos possível. Além disso, buscou-se incluir indivíduos com idade menor que 17 anos no grupo de indivíduos jovens e de idade maior que 26 anos no grupo indivíduos adultos, dado que a erupção de terceiros molares mandibulares geralmente ocorre durante esta faixa etária. Além destes, outros critérios de inclusão foram: apenas amostras de terceiros molares inferiores completamente inclusos foram incluídos; foram desconsideradas amostras apresentando alto grau de inflamação e/ou ausência completa de remanescentes epiteliais que caracterizam o folículo dentário, além de amostras contendo material mineralizado. Neste estudo, radiografias não foram avaliadas, e amostras cujo diagnóstico clínico considerou lesões odontogênicas também não foram incluídas nos grupos amostrais. O diagnóstico histopatológico foi revisado por três investigadores.

4.2 Preparo da Amostra

Uma vez selecionadas, as amostras de folículos dentário foram seccionadas em micrótomo, sendo os dois primeiros cortes de 20 μ m desprezados

(por estarem em maior contato com o meio externo, observa-se a oxidação de alguns compostos, o que poderia influenciar nas etapas subsequentes). Após esta etapa, cortes de 20µm foram coletados em microtubos previamente pesados, individualmente, em balança de alta precisão, dada a variabilidade de peso dos microtubos e necessidade de posterior normalização do volume de solução de extração pela biomassa obtida em cada amostra. Prosseguiu-se com a desparafinização dos cortes em 4 banhos de 1mL de xilol resfriado, cada banho intercalado com centrifugações a 15000×g, a 4°C por 5 minutos. O líquido associado ao *pellet* obtido foi então evaporado em banho seco a 37°C. As amostras foram pesadas e incubadas com a solução de extração de metabólitos, composta por metanol, água e clorofórmio, preparada na proporção 3:1:1, por 10 minutos em condições refrigeradas. A quantidade de solução de extração foi calculada proporcionalmente ao peso de cada amostra (1mg: 20µL). A amostra foi então sonicada em banho ultrassônico por 10 minutos e centrifugada a 15.000×g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa (13mm, 0,22µm de tamanho de poro), e coletado nos insertos contidos em *vials* de vidro, que foram selados após a adição da amostra. Um esquema resumido do modo de preparo da amostra pode ser observado na Figura 6A.

Deste extrato preparado, 10µL de cada amostra foram coletados e depositados em um novo *vial*, constituindo uma amostra combinada (*pooled sample*) que foi utilizada como controle de qualidade (QC). As amostras e o controle preparados foram acondicionados a -75°C até o momento da corrida.

4.3 Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

A instrumentação HPLC-MS consistiu em um cromatógrafo líquido com duas bombas binárias e um amostrador automático (Shimadzu HPLC System, LC 20A, Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (QTOF) (Bruker MicroTOF QII, Billerica, MA, EUA).

Neste sistema, os compostos diluídos na fase móvel são separados por afinidade no interior de uma coluna cromatográfica (fase estacionária): compostos

de menor afinidade pelas partículas da coluna e/ou menor massa eluem mais rapidamente, e compostos de maior afinidade e/ou maior massa permanecem por mais tempo em seu interior. Uma interface entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro de massas permite que estes compostos separados sejam identificados por sua razão massa/carga (m/z) e tenham sua abundância mensurada.

Como fase estacionária, uma coluna cromatográfica de fase reversa (C₁₈, 5cm × 2.1mm id., 1.9µm; Supelco Discovery HS, Bellefonte, PA, EUA) foi utilizada para separação de compostos a uma temperatura de 40°C. O sistema operou com vazão de 0,3 mL/min usando fases móveis variáveis para cada modo de ionização:

a) Modo positivo:

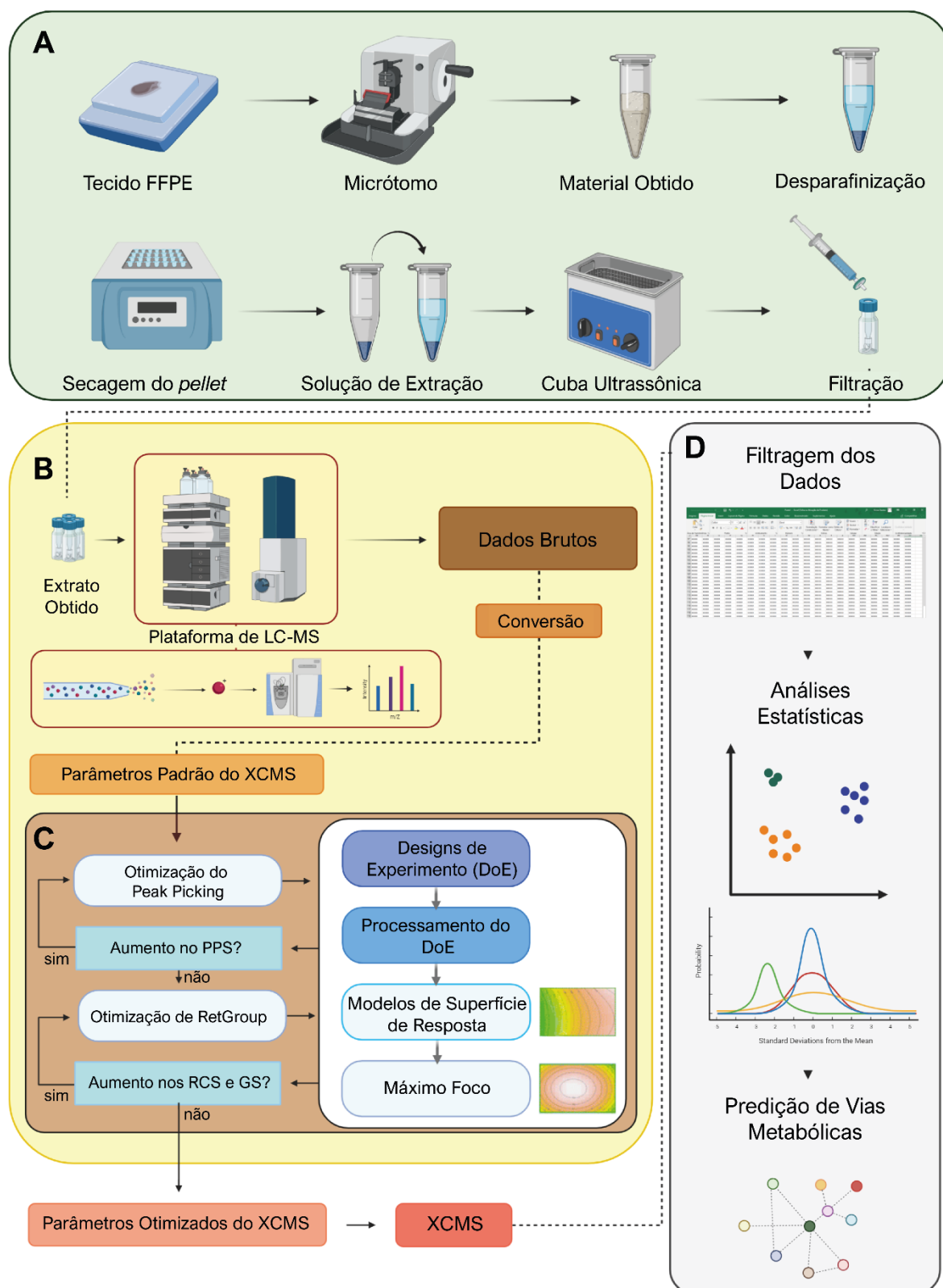
- Fase Móvel A: Água milliQ acidificada com 0,1% (v/v) ácido fórmico.
- Fase Móvel B: Acetonitrila (ACN) com ácido fórmico a 0,1% (v/v).

b) Modo negativo:

- Fase Móvel A: Água milliQ.
- Fase Móvel B: ACN.

Dez microlitros foram injetados a cada corrida. A separação foi realizada em modo gradiente, no qual a faixa de eluição foi: 25-95% B (20 min); 95% B (3 min); 95-20% B (2 min); e 20% B por 5 min. Os espectros de massa foram adquiridos usando ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo e negativo (ESI+ e ESI-, respectivamente). A tensão capilar foi de 4500V para ESI+ e 3500V para ESI-. O nitrogênio foi utilizado como gás de dessolvatação com pressão de 2bar e vazão de 7,0 L/h. A temperatura da fonte foi de 100°C e a temperatura de dessolvatação foi de 180°C. O nitrogênio também foi usado como gás de colisão e foi gerado por um gerador de nitrogênio (NM32LA, Peak Scientific, São Paulo-SP, Brasil). Uma varredura completa de 90-1200 m/z foi obtida usando formiato de sódio como calibrador. A amostra QC foi re-injetada a cada 5 injeções de amostras, que foi feita de maneira sequencialmente randomizada. Uma representação esquemática desta etapa pode ser vista Figura 6B.

Figura 6 — Representação esquemática de todo o fluxo de trabalho executado.



Legenda: A amostra foi preparada (A) e submetida à instrumentação analítica (B). Os dados brutos obtidos foram pré-processados até a obtenção de parâmetros ideais pelo *package* IPO (C). Finalmente, os dados foram preparados e analisados estatisticamente permitindo a análise preditiva de vias metabólicas (D). Imagem parcialmente elaborada no BioRender.

Fonte: Adaptado de LIBISELLER *et al.*, 2015 p.3.

4.4 Pré-processamento dos dados

A fim de melhor descrever cada etapa do pré-processamento, esta seção foi subdividida em tópicos. Um diagrama do fluxo de trabalho realizado pode ser visto na Figura 6C. A completa descrição dos *scripts* utilizados pode ser visualizada no Apêndice B.

4.4.1 Aquisição dos dados brutos

O *software* associado aos instrumentos analíticos traduz as informações obtidas, reduzindo-os a cromatogramas nos quais se pode observar as intensidades de sinal de cada íon ou *feature*, bem como sua razão m/z e tempo de retenção. Para que se possa conduzir as análises, estes dados precisam ser convertidos em um formato acessível a outros *softwares* que possibilitam o processamento de dados metabolômicos.

Os arquivos brutos oriundos das leituras do LC-MS foram convertidos em formato aberto “.mzXML” através do *software* MSConvert (*ProteoWizard*, versão 3.0), utilizando como parâmetro o argumento “vendor msLevel=1” no filtro “Peak Picking”.

4.4.2 Otimização dos parâmetros e obtenção das planilhas de trabalho

Para uma correta deconvolução dos picos cromatográficos e intensidade dos sinais, utilizou-se o pacote *Isotopologue Parameter Optimization* (IPO) (LIBSELLER *et al.*, 2015) para a obtenção dos parâmetros ideais para o pré-processamento dos dados. Neste pacote, parâmetros padrão (*default*) do XCMS – *ferramenta computacional que integra algoritmos para a tradução dos picos cromatográficos e alinhamento para gerar uma lista de features a partir dos dados*

brutos convertidos (DOMINGO-ALMENARA; SIUZDAK, 2020; SMITH *et al.*, 2006) – são carregados e otimizados de forma automatizada.

No IPO, as leituras obtidas a partir do QC, que foi injetado a cada 5 leituras de amostras, foram utilizadas para a otimização após a inspeção visual dos cromatogramas. “Designs de Experimento” (DoEs) são criados e calculados para cada parâmetro a ser otimizado, resultando em gráficos de modelo de superfície de resposta. Para cada valor ótimo encontrado e afixado, novos cálculos são executados até que todos os parâmetros mostrem convergência para valores ideais. Scores são calculados para cada etapa do processamento (*peak picking score – PPS*, *score* de correção do tempo de retenção - *RCS* e *Score* de Agrupamento - *GS*) e os valores ideais para serem utilizados no XCMS são liberados a partir do momento em que não há aumento destes *scores*. Em outras palavras, o processo de otimização continua enquanto as respectivas pontuações estiverem aumentando. A representação do fluxo de processamento do IPO pode ser visualizada na Figura 6C.

Uma vez obtidos os valores ideais, os arquivos correspondentes às amostras foram carregados no package XCMS. Após esta fase, duas planilhas de trabalho foram obtidas, uma para o ESI+ e outra para ESI-. Os pacotes IPO e XCMS foram executados dentro do programa R Statistics (R version 3.6.2 - "Dark and Stormy Night").

4.5 Tratamento e processamento dos dados

Uma vez obtidos os dados no XCMS, as tabelas em formato *.tsv* foram trabalhadas individualmente no Microsoft Excel (Microsoft Office) para cada modo de ionização, excluindo-se *features* detectados até 2,5 minutos da corrida cromatográfica e aqueles detectados após 20 minutos de corrida. Este tratamento elimina possíveis sinais que poderiam ser detectados no volume residual que persiste na coluna cromatográfica entre cada injeção de amostra (chamado “volume morto”) e *features* que seriam detectados após o período de separação dos compostos.

Após este tratamento inicial, os *features* foram organizados em ordem crescente de valores de razão m/z e inspecionados para avaliação de duplicidades. Estas ocorrem quando o software de pré-processamento interpreta determinado padrão de distribuição isotópica de determinada molécula como correspondente a duas ou mais moléculas distintas, ocasionando erros residuais na análise. Para esta avaliação, considerou-se como possíveis duplicidades, *features* com diferenças de M/z de até 0.0005, que tivessem tempos de eluição próximos em até 2,5 minutos. A suposta veracidade destas duplicidades foi mensurada através da correlação de Pearson observada para as intensidades de sinal observadas entre as amostras. *Features* que apresentaram correlação de intensidades com $r > 0.7$ foram eliminados.

O MetaboAnalyst 4.0 (CHONG; WISHART; XIA, 2019) foi utilizado para a análise estatística. Neste software online (<https://www.metaboanalyst.ca>), os dados são carregados e processados em um servidor hospedado na nuvem. Neste trabalho, a remoção de *features* com mais de 20% de valores perdidos (“missing values”) e substituição dos valores perdidos residuais por valores de intensidade igual à metade do mínimo valor observado entre as leituras para cada *feature* foi realizada.

A filtragem dos *features* também foi realizada nesta interface. Para esta etapa, *features* que apresentaram um desvio padrão relativo (RSD) superior a 25% dentro das leituras do QC foram eliminados, uma vez que esta variação elevada para moléculas derivadas de uma mesma amostra poderia indicar baixa reprodutibilidade. Variáveis não informativas, de acordo com os parâmetros do software, também foram filtradas. Estas podem ser caracterizadas como variáveis que mantêm valores quase constantes ao longo de quaisquer condições do experimento (homeostase) e foram filtradas e eliminadas através da avaliação do intervalo interquartil (IQR).

As etapas de normalização, transformação e escalonamento foram executadas como estratégia para aprimorar as análises univariadas, conduzidas no software IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, versão 26.0.0), e multivariadas (conduzidas no próprio MetaboAnalyst 4.0). Para as análises univariadas, os dados foram normalizados pela mediana de cada *feature* e log transformados para a aquisição de um perfil de distribuição mais próximo de uma distribuição normal. Para as análises multivariadas, além das operações de normalização e transformação logarítmica, os dados foram escalonados pela abordagem de Pareto. Este

escalonamento, no contexto das análises multivariadas, permite que todos os *features* sejam colocados numa mesma escala, permitindo as múltiplas avaliações dos modelos multivariados. Nas análises univariadas, contudo, a importância de cada *feature* é comparada individualmente, não sendo necessário que sejam colocados numa mesma escala.

4.6 Análise estatística

As análises multivariadas disponibilizadas pelo MetaboAnalyst consistiram na elaboração de modelos para a observação de resultados através da análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). As análises univariadas foram conduzidas após o download dos dados normalizados e log transformados pelo MetaboAnalyst e foram realizadas no *software* IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, versão 26). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para observação da normalidade de cada variável. Testes paramétricos e não paramétricos foram realizados, sendo empregados o Teste T de Amostras Independentes (teste T de Welch) para variáveis de distribuição normal, e o teste de Mann-Whitney (Mann-Whitney U Test) para variáveis de distribuição não-normal. A igualdade de variâncias foi levada em consideração para o teste T de Welch através da aplicação do teste de Levene para igualdade de variância. Foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. A análise de FDR (5%) para controle de falsos positivos foi realizada no *software* GraphPad Prism 8, utilizando o método de Benjamini-Hochberg.

4.6 Predição de vias metabólicas alteradas

Após a realização das análises estatísticas univariadas no *software* IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, versão 26.0.0.0), as tabelas foram importadas para o Microsoft Office Excel contendo informações sobre os valores de P para os

m/z *features* de cada modo de ionização, resultantes dos testes paramétricos e não paramétricos. O escore T foi gerado para cada um dos *features*, através da fórmula:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Onde X= média da abundância iônica de cada grupo (adolescentes e adultos, X₁ e X₂, respectivamente); S = desvio padrão da abundância de cada grupo e N= número de amostras de cada um dos grupos (7 para o grupo de indivíduos adolescentes e 13 para o grupo de indivíduos adultos, N₁ e N₂, respectivamente). Tal cálculo gera um valor, adimensional, denominado *t.score*, que quantifica o valor da diferença entre os grupos em relação à diferença intra-grupos.

A predição de vias foi executada com os algoritmos *mummichog* e *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), integrados à plataforma online MetaboAnalyst, em seu módulo “MS Peaks to Pathways”. Este módulo utiliza como critério para as identificações putativas a acurácia de massa dada pelos instrumentos, sendo inespecífico em relação às plataformas compatíveis (CHONG; XIA, 2020; LI, S. *et al.*, 2013; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). A abordagem do algoritmo *mummichog* assume que o comportamento coletivo de um grupo de m/z *features* é mais robusto contra certo grau de erros aleatórios individuais. Através de um método de Análise de Super-Representação (ORA – *Over Representation Analysis*), o algoritmo é capaz de fazer um enriquecimento dos dados, confrontando-os com bases de dados metabolômicos já estabelecidos, utilizando tanto uma lista de referência do usuário quanto uma lista de m/z *features* estatisticamente significativos, sendo necessário que se informe um valor P como *cut-off* (LI, S. *et al.*, 2013). Já a abordagem dada pelo GSEA utiliza os valores de expressão/abundância diferenciais, tais como t.score e fold change, em um método “*cut-off free*”, favorecendo a detecção de alterações sutis e consistentes que podem ser perdidas nos métodos de ORA .

Assim, uma tabela de 05 colunas foi preparada, com informações dos 2.068 *features* retidos após a aplicação dos filtros descritos na seção de tratamento e processamento dos dados. As *headers* utilizadas foram: “m.z” , com a massa/carga de cada um dos *features*; “r.t” com o tempo de retenção de cada

feature; “mode” , informando o modo de ionização de cada *feature*; “p.value” com os valores brutos de p, obtidos a partir dos testes paramétricos e não paramétricos; e “t.score” contendo o valor obtido após a execução dos cálculos no software Microsoft Excel 2016. Um erro de 10ppm foi utilizado para maior cobertura de possíveis matches com os valores de m/z informados, ajustando-se ao poder de resolução de espectrômetros do tipo QTOF. O valor de p utilizado como *cut-off* para a análise pelo algoritmo *mummichog* foi de 0.05 (não corrigidos por FDR), ou seja, *features* com valor de $p \leq 0,05$ constituíram a lista de *features* significativos, enquanto *features* com $p > 0,05$ constituíram a lista de referência utilizada pelo algoritmo em suas validações por permutação. A Figura 6D corresponde à representação esquemática destes processos.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da amostra de estudo

Em razão do número de amostras disponíveis que passaram por nossos critérios de inclusão e exclusão, nossos grupos amostrais iniciais se compuseram de 14 amostras para o grupo de indivíduos mais jovens, e 11 amostras de indivíduos mais velhos. Estas foram preparadas de acordo com o protocolo descrito para extração de metabólitos. No entanto, 5 destas foram perdidas devido a problemas técnicos durante a instrumentação analítica. Assim, nossa amostra final foi composta por 13 amostras no grupo de pacientes adolescentes (13-16 anos, mediana = 15 anos) e 7 no grupo de adultos (26-38 anos, mediana = 28 anos). O grupo de adolescentes foi composto por 6 indivíduos do sexo masculino e 7 do sexo feminino. O grupo de indivíduos adultos foi composto por 4 mulheres e 3 homens.

Tabela 1 — Dados clínicos, demográficos e histológicos dos pacientes e amostras analisadas.

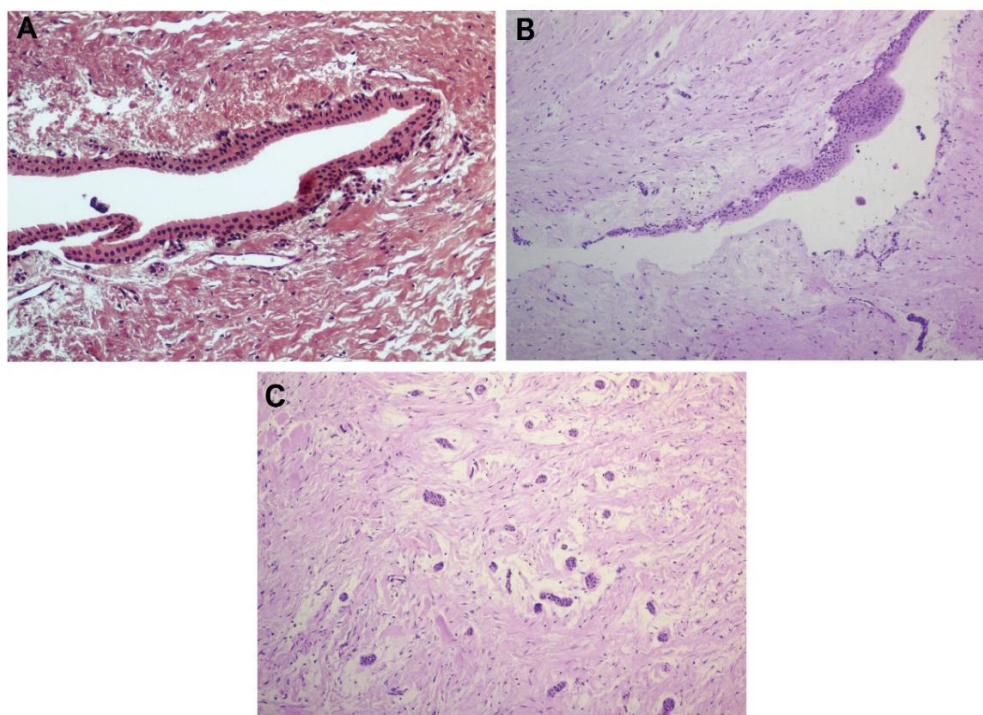
| Caso | Idade (anos) | Sexo | Tipo do Revestimento Epitelial |
|-------------|---------------------|-------------|---------------------------------------|
| #1 | 15 | Feminino | EROE |
| #2 | 13 | Masculino | EROE + EEE focal |
| #3 | 13 | Feminino | Ausente |
| #4 | 15 | Masculino | EROE |
| #5 | 16 | Masculino | Ausente |
| #6 | 16 | Masculino | Ausente |
| #7 | 15 | Feminino | EROE |
| #8 | 15 | Feminino | Ausente |
| #9 | 15 | Feminino | EROE |
| #10 | 16 | Feminino | Ausente |
| #11 | 16 | Masculino | Ausente |
| #12 | 16 | Feminino | EEE |
| #13 | 16 | Masculino | EROE + EEE focal |
| #14 | 38 | Feminino | EEE |
| #15 | 28 | Masculino | EEE |
| #16 | 27 | Feminino | Ausente |
| #17 | 26 | Feminino | EEE + EROE focal |
| #18 | 32 | Masculino | EROE |
| #29 | 30 | Feminino | Ausente |
| #20 | 27 | Masculino | EROE |

Epitélio: EROE – epitélio reduzido do órgão do esmalte; EEE – epitélio escamoso estratificado.

Fonte: Autoria própria (2021).

A presença de epitélio reduzido do órgão do esmalte foi observada em 6/13 amostras no grupo de adolescentes e foi observado em áreas focais em 2/7 amostras do grupo de indivíduos adultos. Outros 2 indivíduos do grupo de adultos exibiram epitélio reduzido do órgão do esmalte sem a presença concomitante de epitélio escamoso nos cortes histológicos analisados. Nem todas as amostras exibiram revestimento epitelial. No entanto, pequenas ilhotas e cordões de epitélio odontogênico foram observados em todas as amostras, e em maior quantidade em amostras do grupo de adolescentes. Epitélio escamoso foi observado em 3/7 amostras de indivíduos adultos e em áreas focais em 2/13 das amostras de adolescentes. A Tabela 1 compila tais dados. A Figura 7 ilustra os principais achados histológicos encontrados.

Figura 7 — Características histológicas dos folículos dentários incluídos no estudo.



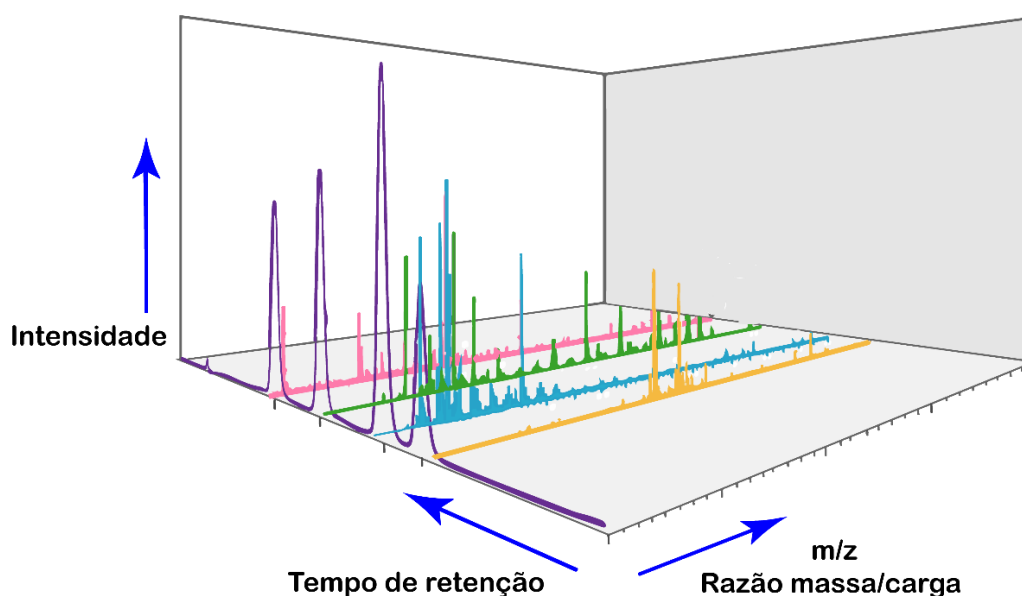
Legenda: (A) Epitélio reduzido do órgão do esmalte reduzido revestindo o tecido conjuntivo do folículo dentário (ampliação de x20). (b) Epitélio escamoso estratificado com área espessamento focal (aumento de x10). (c) Ilhotas típicas de epitélio odontogênico, comumente observadas em folículos dentários de indivíduos jovens (aumento de x10). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina.

Fonte: Autoria própria (2021).

5.2 Instrumentação no HPLC-MS e pré-processamento dos dados

A metabolômica representa um campo em expansão, lidando com uma análise “holística” – uma vez que busca o entendimento integral dos fenômenos –, dos metabólitos. Basicamente, este perfil “holístico” objetiva produzir uma imagem de um fenótipo metabólico (metabotipo) e monitorar alterações do perfil endógeno frente a um determinado estímulo biológico ou manipulação genética (BEGOU *et al.*, 2018). Nesse sentido, a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas se apresenta como uma técnica analítica bem estabelecida e amplamente utilizada, capaz de combinar o potencial de separação de compostos possibilitado pela cromatografia líquida e agregá-lo ao potencial de quantificar intensidades iônicas através da espectrometria de massas (BEGOU *et al.*, 2018) .

Figura 8 — Representação esquemática dos conjuntos de dados tridimensionais produzidos.

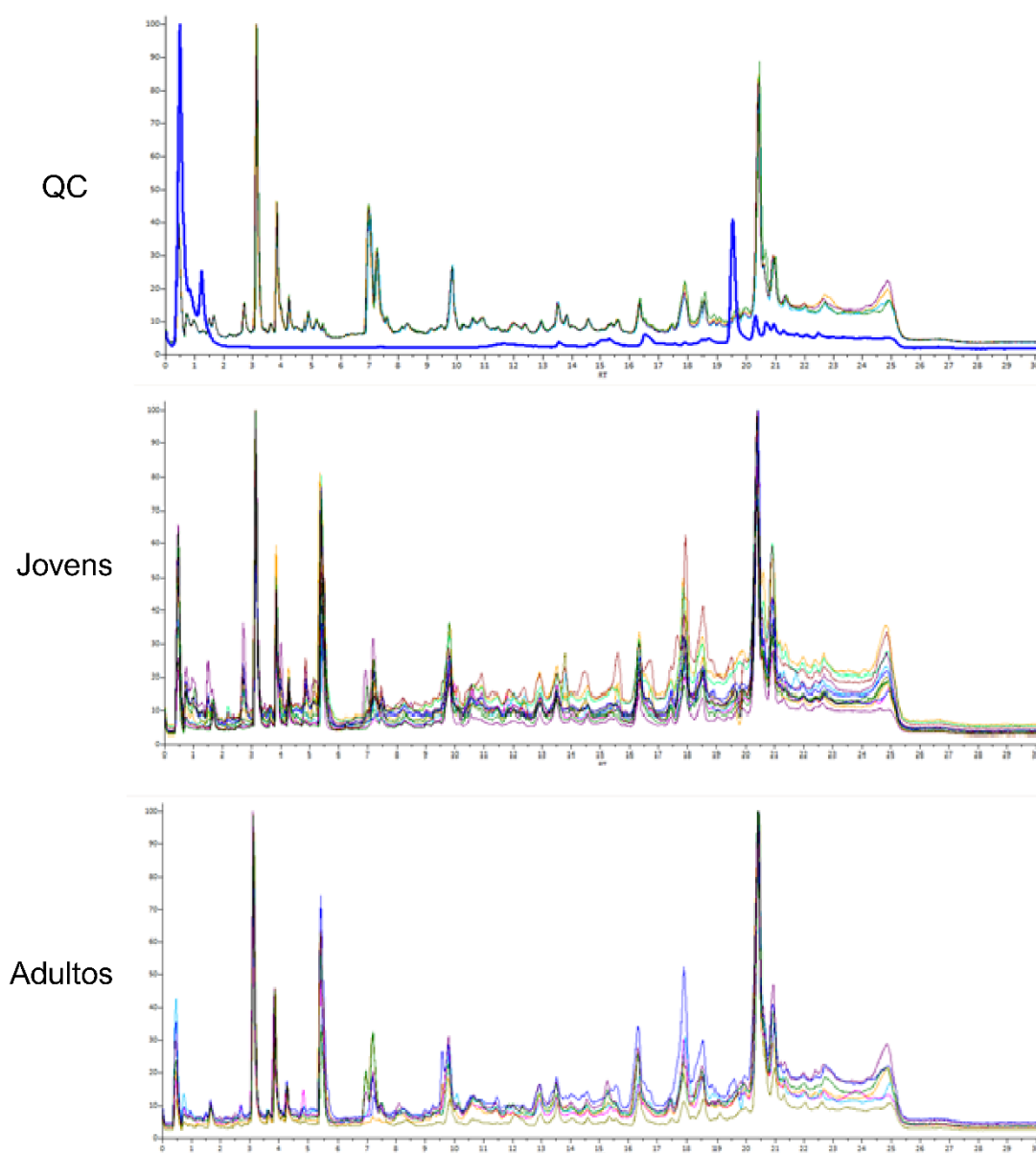


Fonte: Traduzido e adaptado de SENAN *et. al.*, 2019. Original disponível em: <http://seeslab.info/publications/cliquems-computational-tool-annotating-source-metabolite-ions-lc-ms-untargeted-metabolomics-data-based-coelution-similarity-network/> < acesso em 07/2020 >)

A LC-MS produz conjuntos de dados (“*datasets*”) tridimensionais onde cada íon gerado na fonte de ionização é caracterizado por um valor de m/z, tempo de retenção e intensidade (ARDREY, 2003; RICCADONNA; FRANCESCHI, 2018).

Uma representação esquemática do produto da instrumentação analítica pode ser vista na Figura 8. Imagens dos cromatogramas obtidos podem ser observada nas Figuras 9 e 10.

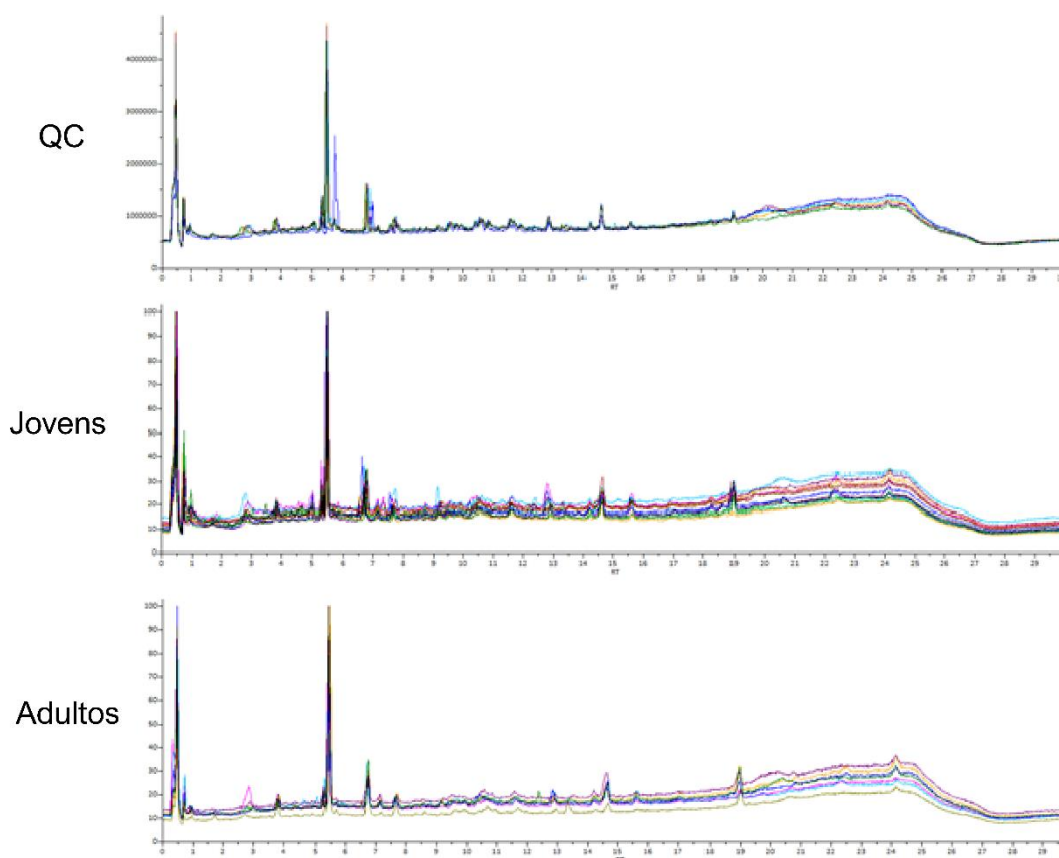
Figura 9 — Cromatogramas obtidos pelo modo positivo de ionização (ESI+).



Legenda: Cromatogramas obtidos durante a instrumentação analítica na plataforma HPLC-MS. Após a inspeção visual dos cromatogramas, constatou-se erro de leitura (provavelmente causado pela não injeção da amostra) em um dos controles de qualidade (QC), conforme evidenciado pela linha espessa na cor azul, que permaneceu próxima ao limite de detecção durante praticamente toda a corrida cromatográfica.

Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 10 — Cromatogramas obtidos pelo modo negativo de ionização (ESI-).



Fonte: Autoria própria (2021).

Para um correto pré-processamento dos dados, a otimização automatizada de parâmetros foi realizada pelo package IPO, executado no *software* R (APÊNDICE B). A otimização automatizada dos parâmetros é um passo considerado crucial para o correto processamento dos dados, uma vez que escolha de parâmetros sub-ótimos pode levar facilmente a falsos resultados.

Um fluxo de trabalho de duas etapas foi empregado: a primeira consistiu em uma otimização padrão dos parâmetros iniciais do XCMS, seguida pela otimização de todo o conjunto de parâmetros para as funções de 'peak picking' e 'retgroup'. Editamos os parâmetros *minfrac* e *minsamples* (definidos para 0,7 e 2, respectivamente), uma vez que contribuem para a concordância das características *m/z* dentro de cada grupo, aumentando a robustez analítica (DOMINGO-ALMENARA; SIUZDAK, 2020). Válido ressaltar que previamente a esta etapa, realizou-se a inspeção visual dos cromatogramas obtidos, na qual verificou-se um perfil de corrida diferente durante a primeira injeção do QC em modo de ionização

positiva (destacado em azul na Figura 9). Desta forma, o *dataset* correspondente a esta injeção não foi considerado para compor o conjunto de leituras que serviram de base para a aquisição dos parâmetros ótimos. O Quadro 01 sintetiza os valores encontrados após cada etapa de otimização realizada para cada um dos modos de ionização.

Após a obtenção de parâmetros ideais, estes foram devidamente aplicados no software XCMS, resultando em tabelas individuais, para cada um dos modos de ionização. Ao todo, 5.570 *features* foram detectados (5.013 em ESI+, 557 em ESI-). Destes, 2.068 se mantiveram após a aplicação de todos os filtros e normalizações realizados no Microsoft Excel e no MetaboAnalyst, como o descrito na metodologia, e foram analisados nas etapas subsequentes.

5.3 Análise da estabilidade instrumental e análise estatística

A análise multivariada por análise de componentes principais (PCA) indicou uma boa estabilidade analítica durante a execução de HPLC-MS, para os modos de ionização positivo e negativo. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi capaz de mostrar algum grau de separação de grupos. Contudo, os modelos gerados não puderam ser interpretados como preditivos e foram considerados hiper-ajustados, dado os índices de qualidade dos modelos construídos. A Figura 11 apresenta os gráficos obtidos por tais análises.

A análise univariada resultou em um total de 287 *features* moleculares estatisticamente significativos ($p < 0,05$, não significativo após a correção de FDR) de um total de 2.068 *features* nos modos de ionização positivo e negativo, na comparação entre os grupos. Destes, apenas dois foram retidos após a correção de FDR 5% (m/z 647,2999, valor p-ajustado $< 0,0001$; m/z 379,1334, valor p-ajustado $< 0,0001$, ambos detectados no modo ESI+). Uma vez que um único m/z *feature* pode corresponder a vários compostos de classes químicas diferentes (LI, S. *et al.*, 2013), eles não foram examinados individualmente. Também por este motivo, para análise preditiva de vias metabólicas, utilizamos os valores de p não ajustados, conforme descrito na metodologia.

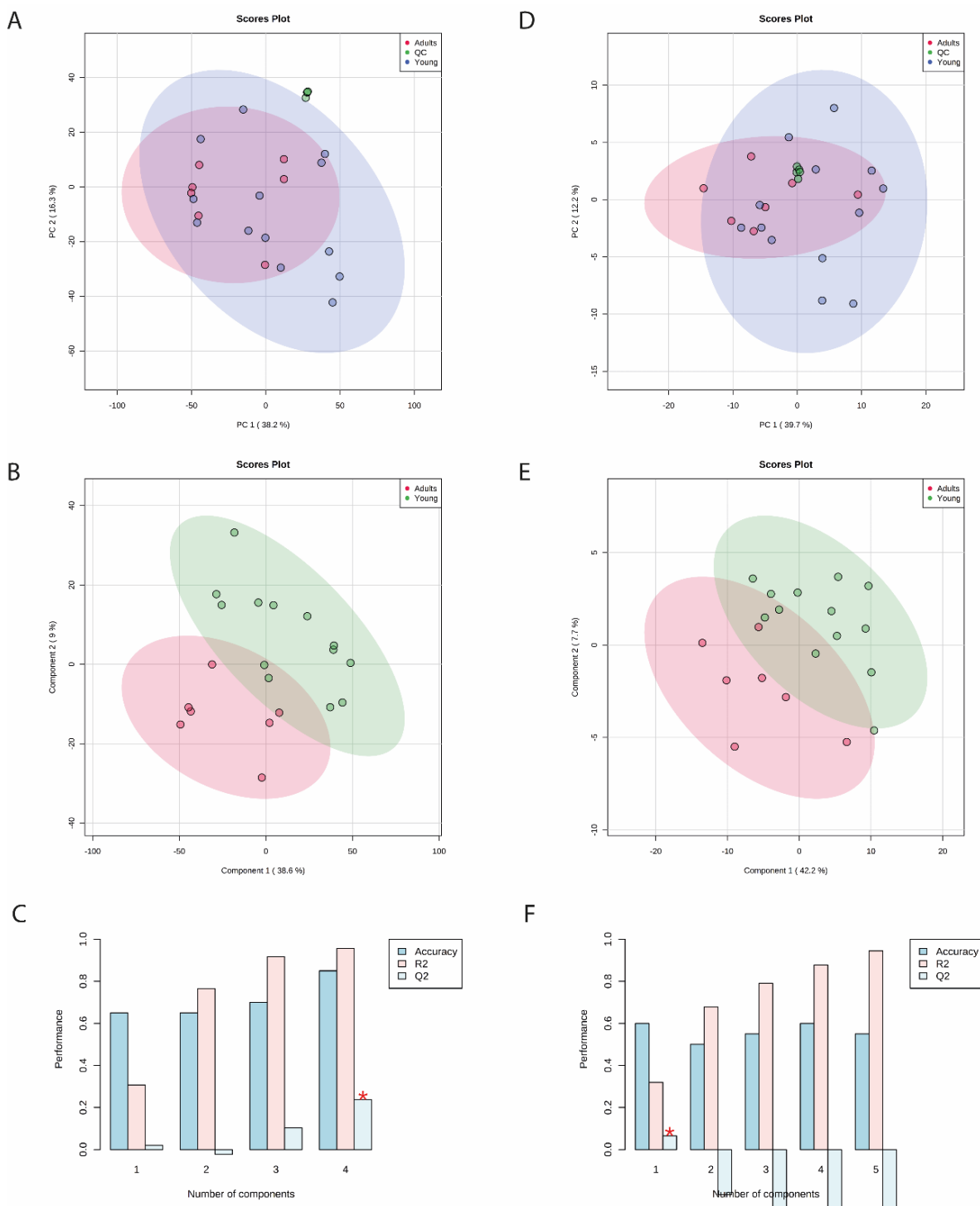
Quadro 01. Síntese da otimização de parâmetros pelo package IPO.

| ESI+ | | | | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
| Peak Picking | | | | | | | |
| Default | | | | Otimização Completa * | | | |
| Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Sub-Ótimo | Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Ótimo |
| min_peakwidth | 12 | 28 | 22.4 | min_peakwidth | 21 | 23 | 20.8 |
| max_peakwidth | 35 | 65 | 61.4 | max_peakwidth | 60 | 62 | 62.6 |
| ppm | 17 | 32 | 32.75 | ppm | 30 | 34 | 31.28 |
| mzdiff | -0.001 | 0.01 | 0.0001 | mzdiff | 0.00009 | 0.00011 | 0.0001 |
| snthresh | — | — | 10 | snthresh | 7 | 10 | 6.1 |
| noise | — | — | 0 | noise | 0 | 150 | 46 |
| prefilter | — | — | 3 | prefilter | 2 | 5 | 7 |
| value_of_prefilter | — | — | 100 | value_of_prefilter | 50 | 150 | 100 |
| RetGroup | | | | | | | |
| Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Ótimo | | | | |
| gaplnit | 0 | 0.4 | 0.44 | | | | |
| gapExtend | 2.1 | 2.7 | 2.16 | | | | |
| profStep | 0.7 | 0.1 | 0.583 | | | | |
| bw | 22 | 38 | 0.88 | | | | |
| minfrac | 0.3 | 0.7 | 1 -> 0.7 | | | | |
| mzwid | 0.015 | 0.035 | 0.032 | | | | |
| distFunc | | "cor_opt" | | | | | |
| plottype | | "none" | | | | | |
| response | | 1 | | | | | |
| factorDiag | | 2 | | | | | |
| factorGap | | 1 | | | | | |
| localAlignment | | 0 | | | | | |
| retcorMethod | | "obiwarp" | | | | | |
| minsamp | | 1 -> 2 | | | | | |
| max | | 50 | | | | | |
| center | | 3 | | | | | |

| ESI- | | | | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
| Peak Picking | | | | | | | |
| Default | | | | Otimização Completa * | | | |
| Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Sub-Ótimo | Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Ótimo |
| min_peakwidth | 12 | 28 | 15.072 | min_peakwidth | 14 | 15 | 14.26 |
| max_peakwidth | 35 | 65 | 72.5 | max_peakwidth | 68 | 70 | 70.4 |
| ppm | 17 | 32 | 51.5 | ppm | 50.5 | 52 | 51.25 |
| mzdiff | -0.001 | 0.01 | 0.0188 | mzdiff | 0.008 | 0.009 | 0.0095 |
| snthresh | — | — | 10 | snthresh | 7 | 10 | 7.9 |
| noise | — | — | 0 | noise | 245 | 255 | 251.8 |
| prefilter | — | — | 3 | prefilter | 2.5 | 3.5 | 3.3 |
| value_of_prefilter | — | — | 100 | value_of_prefilter | 375 | 385 | 385 |
| RetGroup | | | | | | | |
| Parâmetros | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Ótimo | | | | |
| gaplnit | 0 | 0.4 | 0.528 | | | | |
| gapExtend | 2.1 | 2.7 | 1.968 | | | | |
| profStep | 0.7 | 0.1 | 0.77 | | | | |
| bw | 22 | 38 | 0.88 | | | | |
| minfrac | 0.3 | 0.7 | 1 -> 0.7 | | | | |
| mzwid | 0.015 | 0.035 | 0.052 | | | | |
| distFunc | | "cor_opt" | | | | | |
| plottype | | "none" | | | | | |
| response | | 1 | | | | | |
| factorDiag | | 2 | | | | | |
| factorGap | | 1 | | | | | |
| localAlignment | | 0 | | | | | |
| retcorMethod | | "obiwarp" | | | | | |
| minsamp | | 1 -> 2 | | | | | |
| max | | 50 | | | | | |
| center | | 2 | | | | | |

Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 11 — Modelos gerados pela análise estatística multivariada.



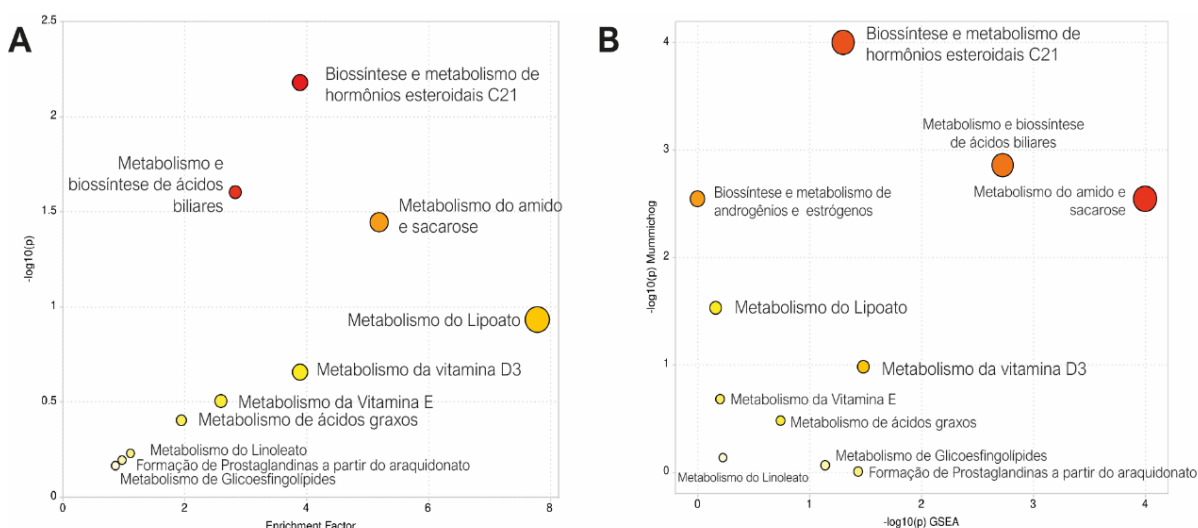
Legenda: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). As variâncias explicadas são apresentadas entre parênteses (**A**, **B**, **D**, **E**), para os modos de ionização positivo (**A-C**) e negativo (**D-F**). O agrupamento de amostras de QC (pontos verdes nos gráficos de PCA) indicam uma boa estabilidade analítica (**A** e **D**). Embora ambos PLS-DA (**B** para ESI+ e **E** para ESI-) sugiram diferenças entre os grupos, seus respectivos R2 e Q2 foram pobres (**C** e **F**, para ESI+ e ESI-, respectivamente). Os gráficos foram gerados no MetaboAnalyst 4.0.

Fonte: Autoria própria (2021).

5.4 Enriquecimento e análise das vias metabólicas

A fim de evidenciarmos quais vias metabólicas diferenciariam os folículos dentários de nossos grupos experimentais, foi realizado o enriquecimento de vias com base nos algoritmos *mummichog* e sua integração com a abordagem GSEA, atualmente disponíveis no módulo “MS peaks to pathways” do MetaboAnalyst 4.0. Os algoritmos de predição foram utilizados exclusivamente como ferramentas para apontar as vias metabólicas, sem propósito de identificação de metabólitos.

Figura 12 — Gráficos de dispersão da análise de enriquecimento das vias metabólicas.



Legenda: Gráficos de dispersão da análise de enriquecimento das vias metabólicas fornecidos por *mummichog* (A) e por sua integração com GSEA (B). A cor e o tamanho de cada círculo correspondem ao seu valor p e fator de enriquecimento, respectivamente. Tons mais escuros indicam as vias previstas de maior significância estatística. O tamanho de cada círculo representa a razão entre o número de metabólitos significativos encontrados e o número de metabólitos que seriam esperados dentro de cada via.

Fonte: Autoria própria (2021).

A versão 2 do algoritmo *mummichog* foi utilizada, uma vez que inclui informações de tempo de retenção para aumentar a confiança e robustez da determinação de compostos potenciais dentro das vias metabólicas (PANG *et al.*, 2020), o que resultou em 248 compostos compatíveis. Esta análise identificou várias vias, incluindo biossíntese e metabolismo de hormônios esteroidais C21, biossíntese de ácidos biliares, metabolismo de galactose, biossíntese e metabolismo de amido e sacarose, e metabolismo do lipoato (valores Γ - $p < 0,05$) na abordagem

mummichog. A Figura 12 apresenta os gráficos de dispersão correspondentes aos abordagem *mummichog* sozinha (FIGURA 12A) e integrada com GSEA (FIGURA 12B), respectivamente. As Tabelas 2 e 3 fornecem os dados estatísticos relacionados.

Tabela 2 — Resultados da análise de vias produzido pelo *mummichog*.

| Vias Enriquecidas | Pathway total | Hits.total | Hits.sig. | Expected | FET | EASE | Gamma-p |
|--|---------------|------------|-----------|----------|--------|--------|---------------|
| Biossíntese e Metabolismo de hormônios esteroidais C21 | 8 | 8 | 4 | 1.0256 | 0.0066 | 0.0423 | 0.0436 |
| Biossíntese de ácidos biliares | 11 | 11 | 4 | 1.4103 | 0.0250 | 0.1016 | 0.0443 |
| Metabolismo da Galactose | 3 | 3 | 2 | 0.3846 | 0.0360 | 0.2956 | 0.0447 |
| Biossíntese e metabolismo de androgênios e estrógenos | 3 | 3 | 2 | 0.3846 | 0.0360 | 0.2956 | 0.0447 |
| Metabolismo de amido e sacarose | 3 | 3 | 2 | 0.3846 | 0.0360 | 0.2956 | 0.0447 |
| Metabolismo do lipoato | 1 | 1 | 1 | 0.1282 | 0.1171 | 1 | 0.0477 |
| Metabolismo de Vitamina D3 (colecalfiferol) | 2 | 2 | 1 | 0.2564 | 0.2214 | 1 | 0.0522 |
| Metabolismo de vitamina E | 3 | 3 | 1 | 0.3846 | 0.3141 | 1 | 0.0569 |
| Metabolismo de ácidos graxos | 4 | 4 | 1 | 0.5128 | 0.3964 | 1 | 0.0616 |
| Metabolismo do linoleato | 7 | 7 | 1 | 0.8974 | 0.5914 | 1 | 0.0766 |
| Geração de prostaglandinas a partir do araquidonato | 8 | 8 | 1 | 1.0256 | 0.6420 | 1 | 0.0818 |
| Metabolismo de glicosfingolípides | 9 | 9 | 1 | 1.1538 | 0.6868 | 1 | 0.0871 |

Legenda: Os resultados desta análise consistem no número total de Hits, o valor de p bruto (derivado do Teste Exato de Fisher – FET, e do EASE, uma versão mais conservadora desta análise) e o valor de p ajustado (Gamma P), que significa o valor de P do FET (que fora calculado usando a lista de compostos estatisticamente significativos) ajustado pela distribuição normal de valores de p permutados. “Pathway total” representa o número total de compostos empíricos dentro das vias metabólicas, e “hits total” o número de compostos empíricos encontrados na lista carregada pelo usuário. “Expected” significa o número de hits de compostos empíricos dentro das vias. Valores de $p < 0.05$ (Gamma-P) estatisticamente significativos destacados em negrito.

Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 3 — Resultados da análise de vias produzido pelo *mummichog*+GSEA.

| Vias Enriquecidas | Total Size | Hits | Hits Sig. | <i>Mummichog</i> <i>p</i> -valor | GSEA <i>p</i> -valor | Valor de P Combinado |
|--|------------|------|-----------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Metabolismo da Galactose | 3 | 3 | 2 | 0.0360 | 0.07143 | 0.0179 |
| Metabolismo de amido e sacarose | 3 | 3 | 2 | 0.0360 | 0.07143 | 0.0179 |
| Biossíntese e Metabolismo de hormônios esteroidais C21 | 8 | 8 | 4 | 0.0066 | 0.4362 | 0.0198 |
| Biossíntese de ácidos biliares | 11 | 11 | 4 | 0.0250 | 0.1979 | 0.0313 |
| Biossíntese e metabolismo de androgênios e estrógenos | 3 | 3 | 2 | 0.0360 | 0.7143 | 0.1201 |
| Metabolismo de Vitamina D3 (colecalfiferol) | 2 | 2 | 1 | 0.2215 | 0.2698 | 0.2281 |
| Metabolismo do lipoato | 1 | 1 | 1 | 0.1172 | 0.5192 | 0.2312 |
| Geração de prostaglandinas a partir do araquidonato | 8 | 8 | 1 | 0.6421 | 0.125 | 0.2827 |
| Metabolismo de ácidos graxos | 4 | 4 | 1 | 0.3964 | 0.4286 | 0.4711 |
| Metabolismo de vitamina E | 3 | 3 | 1 | 0.3141 | 0.6857 | 0.5461 |
| Metabolismo de glicoesfingolípidos | 9 | 9 | 1 | 0.6868 | 0.3656 | 0.5981 |
| Metabolismo do linoleato | 7 | 7 | 1 | 0.5914 | 0.5568 | 0.6951 |

Legenda: Resultados integrados da análise de vias pelo *mummichog* e GSEA. GSEA considera as classificações gerais dos *features* sem usar um corte de significância (*p*-value cut-off). O módulo usa o método de Fisher para combinar valores-*p* brutos de abordagens *mummichog* e GSEA. Valores de $p < 0.05$ (Valor de P Combinado), estatisticamente significativos destacados em negrito.

Fonte: Autoria própria (2021).

6 DISCUSSÃO

Metabólitos, pequenas moléculas (tipicamente pesando <1500 Da), compreendem os intermediários e/ou produtos finais de processos celulares regulatórios. Seus níveis podem ser interpretados como uma resposta definitiva dos sistemas biológicos frente a alguma alteração genética ou ambiental (FIEHN, 2002). Assim, ao se explorar o metaboloma, considerando todas as alterações moleculares sutis e subjacentes a eventos mutacionais, epigenéticos, pós-transcricionais e pós-translacionais, em conjunção a eventos derivados de fatores ambientais, torna-se possível capturarmos uma imagem do fenótipo apresentado por determinado sistema biológico (SRIVASTAVA, 2019).

A depender do grau e quantidade de conhecimento acumulado acerca de determinado processo biológico ou doença, diferentes estratégias de investigação metabolômica podem ser realizadas, dividindo-se entre aquelas direcionadas (*targeted*) e aquelas globais (*untargeted*) (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Enquanto as primeiras objetivam a identificação e quantificação de analitos específicos, as últimas, *untargeted*, objetivam a caracterização de todo o conjunto de analitos, dentre os quais pode-se incluir compostos químicos ainda desconhecidos (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Nas ciências biomédicas, análises metabolômica podem revelar inúmeros aspectos do curso das doenças, além de possibilitar a descoberta de biomarcadores e auxiliar no desenvolvimento de tratamentos eficazes.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar alterações metabólicas relacionadas ao envelhecimento em folículos dentários de terceiros molares impactados/não-erupcionados. Estes são os últimos dentes a alcançar o plano oclusal, geralmente erupcionando entre os 17-26 anos de idade (GHAEMINIA *et al.*, 2020). Além disso, em 5,3% dos casos de inclusão de 3os molares inferiores, há associação com o desenvolvimento de lesões odontogênicas, (GHAEMINIA *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2019). Corroborando com a literatura, é válido mencionar que houve dificuldade na aquisição de amostras de folículos dentários de indivíduos mais velhos (sobretudo acima dos 30 anos de idade), sendo esta uma limitação

compartilhada com outros trabalhos que utilizaram folículos dentários. Outros estudos também reportam esta dificuldade, haja vista que a maioria dos procedimentos cirúrgicos para extração de terceiros molares é realizada em indivíduos mais jovens (KAUTTO; VEHKALAHTI; VENTÄ, 2018; VENTÄ; KYLÄTIE; HILTUNEN, 2015; VENTÄ; TURTOLA; YLIPAAVALNIEMI, 1999).

Em relação às alterações microscópicas dos folículos dentários, observou-se que o epitélio reduzido do órgão do esmalte foi mais frequente em adolescentes, assim como a presença de ilhotas e cordões de epitélio odontogênico que permeiam o tecido conjuntivo dos folículos dentários. A presença de metaplasia escamosa foi mais frequentemente observada nos folículos dentários de indivíduos adultos, em concordância com a literatura vigente (STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). Debate-se se a metaplasia escamosa do epitélio reduzido do órgão do esmalte representa um sinal patológico precoce, dada a baixa frequência na ocorrência de lesões odontogênicas, de forma geral. Adicionalmente, alterações morfológicas podem ocorrer em decorrência da necessidade de adaptação dos tecidos a alguma circunstância (ADELSPERGER *et al.*, 2000; DALEY; WYSOCKI, 1995; GALLUZZI; YAMAZAKI; KROEMER, 2018; KIM, J.; ELLIS, 1993; STANLEY; KROGH; PANNKUK, 1965). Ressalta-se que, apesar da prevalência de terceiros molares inclusos ser de até 24% em população adulta, há ausência de protocolos clínicos bem estabelecidos acerca da necessidade ou justificativa para a remoção cirúrgica profilática de terceiros molares assintomáticos e livres de indícios patológicos (GHAEMINIA *et al.*, 2020).

Diferenças entre nossos grupos experimentais foram observadas envolvendo várias vias metabólicas, tais como biossíntese e metabolismo de hormônios esteroidais C21, biossíntese de ácidos biliares, metabolismo de galactose, biossíntese e metabolismo de amido e sacarose, e metabolismo do lipoato. Embora não tenha sido possível observar de que maneira tais diferenças tenham ocorrido, seja aumento ou diminuição da atividade das vias em determinado grupo, o papel destas já foi avaliado em relação ao envelhecimento. É importante mencionar que a puberdade, assim como o envelhecimento, compreende um complexo processo acoplado a inúmeras alterações hormonais e fisiológicas (WOOD; LANE; CHEETHAM, 2019). A complexidade deste processo deve ser considerada em estudos metabólicos envolvendo pacientes jovens, e podem

explicar, por exemplo, o fato de diferenças na biossíntese e metabolismo de androgênicos e estrógenos terem sido encontradas entre nossos grupos amostrais.

A via de biossíntese e metabolismo de hormônios esteroidais C21 compreende os eixos progesterona-aldosterona e progesterona-cortisol/cortisona, os quais medeiam uma ampla variedade de processos biológicos. Tal via está envolvida na função reprodutiva, desenvolvimento sexual, balanço eletrolítico, pressão sanguínea e respostas ao estresse (ACKERMANN *et al.*, 2019). O metaboloma esteroidal já foi previamente descrito como influenciado por fatores como sexo biológico, idade e pelo ciclo circadiano (ACKERMANN *et al.*, 2019; SCHIFFER *et al.*, 2019; VAN CAUTER, 1990).

Ácidos biliares compreendem um grupo importante de agentes fisiológicos envolvidos no metabolismo de colesterol, absorção intestinal de nutrientes, secreção biliar de lipídios, metabólitos nocivos e xenobióticos (XIE *et al.*, 2015). Por meio da ativação de vias de sinalização desencadeadas pela ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) ou receptores nucleares de ácidos biliares (incluindo o receptor farnesoide-X, FXR, também conhecido por NR1H4), ácidos biliares tem se mostrado capazes de regular não apenas sua própria síntese e circulação enteropática: tais moléculas estão envolvidas na manutenção da homeostase de triglicerídeos, colesterol, energia e glicose (THOMAS *et al.*, 2008). Mudanças nos níveis séricos e plasmáticos de tais ácidos biliares já foram descritas a ocorrer de maneira idade-dependente e sexo-específica (FROMMHERZ *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2015). Destaca-se que genes relacionados a vias de secreção de bile foram recentemente reportados como participantes do desenvolvimento de germes dentários de ratos, tanto a nível de RNA quanto a nível proteico (YANG, J. *et al.*, 2020).

A principal via do metabolismo de galactose em humanos envolve sua conversão da galactose em glicose pela galactoquinase e pela galactose-1-fosfato uridil-transferase para a glicólise (LI, H. *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 1999). Em modelos animais, a exposição prolongada a D-galactose induz a aquisição de um fenótipo envelhecido que tem sido reconhecido como semelhante àquele observado em ratos e camundongos envelhecidos naturalmente (SHWE *et al.*, 2020). Tais animais envelhecidos de forma induzida exibem níveis aumentados na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução na ação de enzimas antioxidantes no cérebro,

respostas imunológicas comprometidas, disfunções cognitivas, prejuízos nas funções motoras e menor expectativa de vida (LI, H. *et al.*, 2019; ZHOU, Y. Y. *et al.*, 2015), eventos compatíveis com o acúmulo de células senescentes observado em animais envelhecidos naturalmente (CAMPISI, 2013; CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007; HE; SHARPLESS, 2017; HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018). Nestes modelos, os impactos do metabolismo alterado da galactose foram investigados no cérebro, fígado, pulmões, coração, rins, pele, sistema reprodutor e outros (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Outros carboidratos também causam estresse oxidativo por meio da ativação do metabolismo mitocondrial da glicose, levando à produção de ROS (UMBAYEV *et al.*, 2020). Neste contexto, o metabolismo do amido e sacarose podem estar relacionados. Neste caso, a geração de ROS se daria através das enzimas que compõem a cadeia respiratória mitocôndria, xantina-oxidases, lipoxigenases, cicloxigenases, sintases de óxido nítrico e peroxidases (UMBAYEV *et al.*, 2020).

O metabolismo do lipoato desempenha um papel chave na função mitocondrial (CRONAN, 2020). O lipoato é um cofator de ligação covalente essencial a cinco reações redox em humanos, participando em quatro 2-oxoácido desidrogenases e no sistema de clivagem da glicina (GCS) (MAYR *et al.*, 2014). Duas enzimas são do metabolismo energético (alfa-cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase); e três são do metabolismo de aminoácidos (desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, 2-oxoadipato desidrogenase, e o GCS) (MAYR *et al.*, 2014). O lipoato é a base conjugada do ácido lipoico, e também a forma mais facilmente encontrada de tal ácido em condições fisiológicas. Apresenta um potencial de redução altamente negativo, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e participa da reciclagem das vitaminas C e E. Por conta de tais propriedades, o ácido lipoico é reconhecido como um “antioxidante universal” (MOURA *et al.*, 2015). O lipoato também exhibe propriedades anti-apoptóticas e anti-inflamatórias em estudos *in vivo* e *in vitro*. Notavelmente, o ácido lipoico tem demonstrado potencial na reversão da perda progressiva de neurotransmissores (e seus receptores) que acompanha o envelhecimento, o que pode justificar seus efeitos nas funções cognitivas (MOLZ; SCHRÖDER, 2017).

Embora vários fatores, incluindo fatores celulares, genéticos, endócrinos, moleculares e ambientais, estejam envolvidos na erupção dentária, nosso desenho

experimental não possibilitou a inclusão dos mesmos. No entanto, ressalta-se que todos os folículos dentários incluídos no estudo estavam associados a terceiros molares mandibulares inclusos, minimizando eventuais interferências em relação à localização e ao processo eruptivo. De maneira importante, alterações no metabolismo dos folículos dentários são candidatas a influenciar e a guiar a erupção dentária. As causas da falha primária de erupção e de atrasos neste processo não são estabelecidas, apesar de fatores relacionados à habilidade do folículo dentário em desencadear a reabsorção óssea ao longo do canal gubernacular ser discutida (ALMONAITIENE; BALCIUNIENE; TUTKUVIENE, 2010; KJÆR, 2014). Neste sentido, fatores como *status* nutricional, índice de massa corporal (IMC), fatores socioeconômicos, reconhecidos por afetarem tanto o metaboloma quanto a dinâmica de erupção dentária, poderiam ser estratificados em estudos com um maior número de amostras. Além de oferecer maior robustez às análises, tal estratificação poderia prover evidências acerca dos processos biológicos subjacentes às falhas na erupção dentária (ALMONAITIENE; BALCIUNIENE; TUTKUVIENE, 2010; RATTRAY *et al.*, 2018; ROBINSON *et al.*, 2020; WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002). Além disso, é necessário destacar que as predições das vias alteradas descritas derivam de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina submetidas a uma plataforma de análise metabolômica (HPLC-MS) *untargeted*, que apenas recentemente se tornaram valorizadas na área, permitindo que protocolos fossem desenvolvidos e aperfeiçoados (DONCZO; GUTTMAN, 2018; KELLY *et al.*, 2011; NEEF *et al.*, 2020). Estudos metabolômicos do tipo *targeted* e estudos com outras técnicas moleculares devem também ser considerados na intenção de validar nossos achados.

À medida em que entendemos a fisiologia dos tecidos, melhoramos nossa capacidade de reformular as muitas questões da biologia, mudar o *status quo*, e trazer à luz novas perspectivas. Recentemente, a partir de abordagens genéticas, observou-se que tecidos normais e livres de doença também podem apresentar mutações patogênicas, implicando em um novo olhar para as alterações genéticas (LAC *et al.*, 2019; MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER, 2014; MARTINCORENA *et al.*, 2015). Neoplasias benignas podem exibir mutações consagradas para diversos tipos de câncer e ainda assim possuem um comportamento clínico indolente (COURA *et al.*, 2019; COURA; BERNARDES; *et al.*, 2020; MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER,

2014). Nenhuma mutação *hotspot* foi descrita em folículos dentários até o momento (COURA; DE RESENDE; *et al.*, 2020). Haja vista os intrincados sinais moleculares que definem o curso das interações entre genótipo-fenótipo, a metabolômica pode guiar um entendimento mais profundo sobre estes processos.

Diferentes respostas celulares e teciduais dos organismos podem ser desencadeadas por inúmeras variáveis. A metabolômica pode preencher alguns destes vazios, reconciliando os diversos paradoxos existentes. Recentemente, o metabolismo de uma ampla quantidade de fontes (por exemplo, álcool e microorganismos) foi descrita como capaz de modificar o DNA e alterar histonas, exercendo efeitos específicos na biologia celular, fisiológica sistêmica e patologias (DAI; RAMESH; LOCASALE, 2020). Polifenismo, um subtipo de plasticidade fenotípica presente em várias espécies de animais foi recentemente proposto a ocorrer em humanos a nível metabólico (YANG, C.-H.; ANDREW POSPISILIK, 2019). Neste estudo de cunho gerador de hipóteses, apresentamos alguns aspectos da fisiologia de folículo dentários. Estes são tecidos únicos no corpo humano, uma herança das interações teciduais estabelecidas durante a odontogênese, e que permanece hermeticamente isolada no interior dos ossos gnáticos

7 CONCLUSÃO

Alterações metabólicas relacionadas ao envelhecimento foram encontradas nos folículos dentários, algumas das quais já foram descritas como relacionadas ao envelhecimento em outros tecidos e fluidos humanos. Este trabalho é pioneiro na análise de tais diferenças em folículos dentários, destacando que tal tecido também demonstra alterações metabólicas em relação ao avanço da idade. Baseado em nossos achados, encoraja-se novas investigações sobre este tecido, aproveitando seu potencial como modelo de estudo para responder diferentes questões nas áreas de fisiologia, biologia do desenvolvimento e patologia. Adicionalmente, os resultados do presente trabalho foram redigidos em formato de artigo científico, tendo sido aceito e publicado no periódico internacional *Frontiers in Oral Health* (**APÊNDICE C**). Os dados coletados e descritos na seção de revisão de literatura foram também redigidos em formato de artigo científico, o qual foi aceito e publicado no periódico internacional *Developmental Dynamics* (**APÊNDICE D**).

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, D. *et al.* Reference intervals for the urinary steroid metabolome: The impact of sex, age, day and night time on human adult steroidogenesis. *PLOS ONE*, v. 14, n. 3, p. e0214549, 29 mar. 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0214549>>.

ADAKI, S. R. *et al.* Incidence of cystic changes in impacted lower third molar. *Indian Journal of Dental Research*, v. 24, n. 2, p. 183–187, 2013. Disponível em: <<http://www.ijdr.in/text.asp?2013/24/2/183/116674>>.

ADELSPERGER, J. *et al.* Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 89, n. 4, p. 402–406, abr. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210400701193>>.

AL-KHATEEB, T. H.; BATAINEH, A. B. Pathology Associated With Impacted Mandibular Third Molars in a Group of Jordanians. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 64, n. 11, p. 1598–1602, nov. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239106014066>>.

ALMONAITIENE, R.; BALCIUNIENE, I.; TUTKUVIENE, J. Factors influencing permanent teeth eruption. Part one--general factors. *Stomatologija*, v. 12, n. 3, p. 67–72, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063135>>.

ARAÚJO, J. P. *et al.* Malignant Transformation of an Odontogenic Cyst in a Period of 10 Years. *Case Reports in Dentistry*, v. 2014, n. c, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/crid/2014/762969/>>.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. [S.l.]: Wiley, 2003. v. 1. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470867299>>. (Analytical Techniques in the Sciences).

ARMITAGE, E. G.; BARBAS, C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 1–11, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.041>>.

ASPINALL, R. *Aging of the Organs and Systems*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-0673-5>>.

AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*, v. 20, n. 6, p. 763–782, 20 dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10522-019-09837-y>>.

BASTOS, V. C.; GOMEZ, R. S.; GOMES, C. C. Revisiting the human dental follicle: from tooth development to its association with unerupted or impacted teeth and pathological changes. *Developmental Dynamics*, p. dvdy.406, 29 jul. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.406>>.

BEGOU, O. *et al.* Quality Control and Validation Issues in LC-MS Metabolomics. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2018. v. 1738. p. 15–26. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7643-0_2>.

BODNER, L. *et al.* Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in an odontogenic cyst - a clinicopathologic analysis of 116 reported cases. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 40, n. 10, p. 733–738, nov. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.2011.01058.x>>.

BOLAT, I.; KEKLIKOGU, N. Immunoreactivity of ATF-2 and Fra-2 in human dental follicle. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 48, n. 2, p. 197–201, 3 ago. 2010. Disponível em: <<http://czasopisma.viamedica.pl/fhc/article/view/4229>>.

BRKIĆ, A. Dental follicle: role in development of odontogenic cysts and tumours. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, v. 48, n. 1, p. 89–96, 2014.

BRKIĆ, A. *et al.* Pathological Changes and Immunoexpression of p63 Gene in Dental Follicles of Asymptomatic Impacted Lower Third Molars. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 21, n. 3, p. 854–857, maio 2010. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00001665-201005000-00053>>.

CABBAR, F. *et al.* Determination of Potential Cellular Proliferation in the Odontogenic Epithelia of the Dental Follicle of the Asymptomatic Impacted Third Molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 66, n. 10, p. 2004–2011, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239108010537>>.

CAHILL, D. R. Eruption pathway formation in the presence of experimental tooth impaction in puppies. *The Anatomical Record*, v. 164, n. 1, p. 67–77, maio 1969. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091640105>>.

CAHILL, D. R.; MARKS, S. C. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 9, n. 4, p. 189–200, jul. 1980. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.1980.tb00377.x>>.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, v. 75, n. 1, p. 685–705, 10 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>>.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 9, p. 729–740, set. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2233>>.

CATE, A. R. TEN; MILLS, C.; SOLOMON, G. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. *The Anatomical Record*, v. 170, n. 3, p. 365–379, jul. 1971. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091700312>>.

CHENG, S. *et al.* Potential Impact and Study Considerations of Metabolomics in Cardiovascular Health and Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, v. 10, n. 2, p. 139–148, abr. 2017. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HCG.0000000000000032>>.

CHO, M.-I.; GARANT, P. R. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, v. 24, n. 1, p. 9–27, out. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x>>.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 68, n. 1, p. 1–128, 20 dez. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpbi.86>>.

CHONG, J.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Metabolomics Data Analysis, Interpretation, and Integration with Other Omics Data. In: LI, S. (Org.). *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics. Methods in Molecular Biology*. eds ed. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2104. p. 337–360. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-0239-3_17>.

CHRETIEN, P. B. *et al.* Squamous carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 30, n. 6, p. 809–816, 1 dez. 1970. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422070903452>>. Acesso em: 21 abr. 2021.

CIMADON, N. *et al.* Analysis of the Proliferative Potential of Odontogenic Epithelial Cells of Pericoronal Follicles. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 15, n. 6, p. 761–765, dez. 2014. Disponível em: <<https://www.thejcdp.com/doi/10.5005/jp-journals-10024-1613>>.

COBOURNE, M. T.; SHARPE, P. T. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 21, n. 3, p. 314–324, maio 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.01.007>>.

COLBERT, S. *et al.* Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cysts. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 40, n. 8, p. e355–e357, dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2012.01.020>>.

CONKLIN, W. W.; STAFNE, E. C. A Study of Odontogenic Epithelium in the Dental Follicle. *The Journal of the American Dental Association*, v. 39, n. 2, p. 143–148,

ago. 1949. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.1949.0145>>.

CONSOLARO, A.; CARDOSO, M. DE A. Impacted teeth: Their place is in the dental arch. *Dental Press Journal of Orthodontics*, v. 24, n. 6, p. 20–26, dez. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-94512019000600020&tlng=en>.

COȘARCĂ, A. S. *et al.* The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, v. 57, n. 2, p. 407–12, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516012>>.

COSTA, F. W. G. *et al.* A Clinicoradiographic and Pathological Study of Pericoronal Follicles Associated to Mandibular Third Molars. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 25, n. 3, p. e283–e287, maio 2014. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00001665-201405000-00153>>.

COURA, B. P.; DE RESENDE, T. A. C.; *et al.* Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis. *Archives of Oral Biology*, v. 113, n. September, p. 104523, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104523>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

COURA, B. P. *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Modern Pathology*, v. 32, n. 6, p. 799–806, 14 jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0194-4>>.

COURA, B. P.; BERNARDES, V. F.; *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing and Allele-Specific Quantitative PCR of Laser Capture Microdissected Samples Uncover Molecular Differences in Mixed Odontogenic Tumors. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 22, n. 12, p. 1393–1399, dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.005>>.

CRONAN, J. E. Progress in the Enzymology of the Mitochondrial Diseases of Lipoic Acid Requiring Enzymes. *Frontiers in Genetics*, v. 11, n. May, p. 1–6, 21 maio 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2020.00510/full>>.

CURRAN, A. E.; DAMM, D. D.; DRUMMOND, J. F. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: Histopathologic evaluation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 60, n. 6, p. 613–617, jun. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239102172132>>.

DA COSTA, J. P. *et al.* A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Research Reviews*, v. 29, p. 90–112, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>>.

DAI, Z.; RAMESH, V.; LOCASALE, J. W. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, v. 21, n. 12, p. 737–753, 9 dez. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>>.

DALEY, T. D.; WYSOCKI, G. P. The small dentigerous cyst - A diagnostic dilemma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 79, n. 1, p. 77–81, jan. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210405800782>>.

DE MELLO PALMA, V. *et al.* Study of Pathological Changes in the Dental Follicle of Disease-Free Impacted Third Molars. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, v. 17, n. 4, p. 611–615, 25 dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12663-018-1131-2>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

DE MENEZES, V. C. B. *et al.* Effects of aging on DNA hydroxymethylation and methylation in human dental follicles. *Archives of Oral Biology*, v. 118, p. 104856, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104856>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

DESAI, R. S. *et al.* Multiple Calcifying Hyperplastic Dental Follicles: A Case Report and Literature Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 75, n. 8, p. 1702–1705, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239117300800>>.

DIEKWISCH, T. G. H. Pathways and Fate of Migratory Cells During Late Tooth Organogenesis. *Connective Tissue Research*, v. 43, n. 2–3, p. 246–256, 6 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008200290001221>>.

DIEP, L. *et al.* Contribution of the tooth bud mesenchyme to alveolar bone. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, v. 312B, n. 5, p. 510–517, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jez.b.21269>>.

DINIZ, M. G. *et al.* Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncology*, v. 72, p. 165–173, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837517302129>>.

DOMINGO-ALMENARA, X.; SIUZDAK, G. Metabolomics Data Processing Using XCMS. In: LI, S. (Org.). *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics*. New York, NY: Springer US, 2020. p. 11–24. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_2>.

DONCZO, B.; GUTTMAN, A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 155, p. 125–134, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065>>.

DONGOL, A. *et al.* Dentigerous Cystic Changes in the Follicles Associated with Radiographically Normal Impacted Mandibular Third Molars. *International Journal of Dentistry*, v. 2018, p. 1–5, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijd/2018/2645878/>>.

EDAMATSU, M. *et al.* Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 99, n. 1, p. 17–23, jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210404002938>>.

EL-NAGGAR, A. *et al.* (Org.). Odontogenic and maxillofacial bone tumours. *WHO classification of Head and Neck Tumours*. 4th. ed. Lyon: IARC, 2017. p. 203–260.

ESEN, A. *et al.* Histopathological evaluation of dental follicles of clinically symptomatic and asymptomatic impacted third molars. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v. 19, n. 5, p. 616–621, 2016. Disponível em: <<http://www.njcponline.com/text.asp?2016/19/5/616/188700>>.

FIEHN, O. Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes. In: TOWN, C. (Org.). *Functional Genomics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. p. 155–171. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11>.

FROMMHERZ, L. *et al.* Age-Related Changes of Plasma Bile Acid Concentrations in Healthy Adults—Results from the Cross-Sectional KarMeN Study. *PLOS ONE*, v. 11, n. 4, p. e0153959, 19 abr. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153959>>.

GAENGLER, P.; METZIER, E. The periodontal differentiation in the phylogeny of teeth—an overview. *Journal of Periodontal Research*, v. 27, n. 3, p. 214–225, maio 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0765.1992.tb01671.x>>.

GALLUZZI, L.; YAMAZAKI, T.; KROEMER, G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 11, p. 731–745, 10 nov. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>>.

GAY-ESCODA, C. *et al.* Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in dentigerous cyst: Report of 2 cases and review of the literature. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 7, n. 5, p. e665–e670, 2015. Disponível em: <<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/52689.pdf>>.

GETTINGER, R. Relationship of odontogenic epithelium to cystic and other diseases of mouth and jaw: The follicular sacs of unerupted and partially erupted teeth. *Arch. clin. oral pathol.*, v. 4, p. 198–239, 1940.

GHAEMINIA, H. *et al.* Surgical removal versus retention for the management of asymptomatic disease-free impacted wisdom teeth. *Cochrane Database of*

Systematic Reviews, v. 5, n. 5, p. CD003879, 4 maio 2020. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003879.pub5>>.

GLOSSER, J. W.; CAMPBELL, J. H. Pathologic change in soft tissues associated with radiographically 'normal' third molar impactions. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 37, n. 4, p. 259–260, ago. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026643569990061X>>.

GOMES, C. C. *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncology*, v. 56, p. e3–e5, maio 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837516000440>>.

GOMEZ, R. S. *et al.* Multiple calcifying hyperplastic dental follicles. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 27, n. 7, p. 333–334, 27 fev. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.1998.tb01965.x>>.

GORSKI, J. P. *et al.* Biochemical analysis of the extracellular matrix of the dental follicle at different stages of tooth eruption. In: Z, D. (Org.). *The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. Birmingham, AL: EBSCO Media, 1988. p. 251–260. Disponível em: <<http://ci.nii.ac.jp/naid/10011488124/en/>>. Acesso em: 1 dez. 2020.

GORSKI, J. P. *et al.* Production and characterization of antibodies against DF-95, a dental follicle protein selectively degraded at onset of tooth eruption. In: DAVIDOVITCH, Z. (Org.). *The biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants*. Birmingham, AL: EBSCO Media, 1994. p. 397–406.

GUARDADO-LUEVANOS, I. *et al.* Multiple calcifying hyperplastic dental follicles: a major diagnostic consideration in multiple pericoronar lesions - report of two cases. *BMC Oral Health*, v. 20, n. 1, p. 159, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-020-01146-y>>.

GÜLER, N.; ÇOMUNOĞLU, N.; CABBAR, F. Ki-67 and MCM-2 in Dental Follicle and Odontogenic Cysts: The Effects of Inflammation on Proliferative Markers. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/946060/>>.

HAIDRY, N. *et al.* Histopathological evaluation of dental follicle associated with radiographically normal impacted mandibular third molars. *Annals of Maxillofacial Surgery*, v. 8, n. 2, p. 259–264, 2018. Disponível em: <<http://www.amsjournal.com/text.asp?2018/8/2/259/248592>>.

HANISCH, M. *et al.* Primary failure of eruption (PFE): a systematic review. *Head & Face Medicine*, v. 14, n. 1, p. 5, 15 dez. 2018. Disponível em: <<https://head-face-med.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13005-018-0163-7>>.

HE, S.; SHARPLESS, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell*, v. 169, n. 6,

p. 1000–1011, jun. 2017. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>>.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 6, p. 436–453, 2018. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>>.

HOFFMAN, R. L. Bone formation and resorption around developing teeth transplanted into the femur. *American Journal of Anatomy*, v. 118, n. 1, p. 91–102, jan. 1966. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001180106>>.

HONDA, M. J. *et al.* Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of Oral Science*, v. 52, n. 4, p. 541–552, 2010. Disponível em:
<<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/josnusd/52.541?from=CrossRef>>.

HYUN, S.-Y. *et al.* Amelogenic transcriptome profiling in ameloblast-like cells derived from adult gingival epithelial cells. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 3736, 6 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-40091-x>>.

IDE, F. *et al.* Unsuspected small ameloblastoma in the alveolar bone: a collaborative study of 14 cases with discussion of their cellular sources. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 37, n. 4, p. 221–227, 21 jan. 2008. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.2007.00628.x>>.

IDE, FUMIO *et al.* Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin from reduced enamel epithelium. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 28, n. 9, p. 420–422, 28 jun. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.1999.tb02114.x>>.

IVANISEVIC, J. *et al.* Metabolic drift in the aging brain. *Aging*, v. 8, n. 5, p. 1000–1020, 5 maio 2016. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.100961>>.

KACZOR-URBANOWICZ, K.; ZADURSKA, M.; CZOCHROWSKA, E. Impacted Teeth: An Interdisciplinary Perspective. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 25, n. 3, p. 575–585, 2016. Disponível em:
<<http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2016/25/3/575/>>.

KAUSHIK, A. K.; DEBERARDINIS, R. J. Applications of metabolomics to study cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1870, n. 1, p. 2–14, ago. 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>>.

KAUTTO, A.; VEHKALAHTI, M. M.; VENTÄ, I. Age of patient at the extraction of the third molar. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 7, p. 947–951, jul. 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502718301061>>.

KELLY, A. D. *et al.* Metabolomic Profiling from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue Using Targeted LC/MS/MS: Application in Sarcoma. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. e25357, 3 out. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025357>>.

KIM, J.; ELLIS, G. L. Dental follicular tissue: Misinterpretation as odontogenic tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 51, n. 7, p. 762–767, jul. 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391\(10\)80417-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391(10)80417-3)>.

KIM, S.-G. *et al.* Downregulation of matrix metalloproteinases in hyperplastic dental follicles results in abnormal tooth eruption. *BMB Reports*, v. 41, n. 4, p. 322–327, 30 abr. 2008. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2008&vnc=v41n4&sp=322>>.

KJÆR, I. Mechanism of Human Tooth Eruption: Review Article Including a New Theory for Future Studies on the Eruption Process. *Scientifica*, v. 2014, n. 3, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/341905/>>.

KOTRASHETTI, V. *et al.* Histopathologic changes in soft tissue associated with radiographically normal impacted third molars. *Indian Journal of Dental Research*, v. 21, n. 3, p. 385–390, 2010. Disponível em: <<http://www.ijdr.in/text.asp?2010/21/3/385/70809>>.

KRAMER, H. S.; SCRIBNER, J. H. Squamous-cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. Report of a case. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 19, n. 4, p. 555–561, 1965.

KREIBORG, S.; JENSEN, B. L. Tooth formation and eruption – lessons learnt from cleidocranial dysplasia. *European Journal of Oral Sciences*, v. 126, n. S1, p. 72–80, 3 out. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eos.12418>>.

KUCUKKOLBASI, H.; ESEN, A.; ERINANC, O. Immunohistochemical analysis of Ki-67 in dental follicle of asymptomatic impacted third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 18, n. 2, p. 189–193, 2014. Disponível em: <<http://www.jomfp.in/text.asp?2014/18/2/189/140737>>.

KUEHNE, A. *et al.* An integrative metabolomics and transcriptomics study to identify metabolic alterations in aged skin of humans in vivo. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 169, 15 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3547-3>>.

KURPPA, K. J. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *The Journal of Pathology*, v. 232, n. 5, p. 492–498, abr. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4317>>.

LAC, V. *et al.* Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal? *The Journal of Pathology*, v. 249, n. 2, p. 173–181, 22 out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/path.5314>>.

LANDOVA SULCOVA, M. *et al.* Developmental mechanisms driving complex tooth shape in reptiles. *Developmental Dynamics*, v. 249, n. 4, p. 441–464, abr. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dvdy.138>>.

LARSON, E. K. *et al.* The effect of removing the true dental follicle on premolar eruption in the dog. *Archives of Oral Biology*, v. 39, n. 4, p. 271–275, abr. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003996994901163>>.

LEE, K. W.; LOKE, S. J. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Cancer*, v. 20, n. 12, p. 2241–2244, dez. 1967. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(196712\)20:12%3C2241::AID-CNCR2820201226%3E3.0.CO;2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(196712)20:12%3C2241::AID-CNCR2820201226%3E3.0.CO;2-F)>.

LI, H. *et al.* Brain Senescence Caused by Elevated Levels of Reactive Metabolite Methylglyoxal on D-Galactose-Induced Aging Mice. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, n. September, p. 1–11, 18 set. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.01004/full>>.

LI, S. *et al.* Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. *PLoS Computational Biology*, v. 9, n. 7, p. e1003123, 4 jul. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1003123>>.

LIBISELLER, G. *et al.* IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics*, v. 16, n. 1, p. 118, 16 dez. 2015. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-015-0562-8>>.

LIU, H. *et al.* Daughters of the Enamel Organ: Development, Fate, and Function of the Stratum Intermedium, Stellate Reticulum, and Outer Enamel Epithelium. *Stem Cells and Development*, v. 25, n. 20, p. 1580–1590, 15 out. 2016. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2016.0267>>.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The Hallmarks of Aging. *Cell*, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, jun. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413006454>>.

LUDER, H. U. Malformations of the tooth root in humans. *Frontiers in Physiology*, v. 6, n. OCT, p. 1–16, 27 out. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2015.00307/abstract>>.

MANGANARO, A. M.; CROSS, S. E.; STARTZELL, J. M. Carcinoma arising in a dentigerous cyst with neck metastasis. *Head & Neck*, v. 19, n. 5, p. 436–439, ago. 1997. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0347\(199708\)19:5%3C436::AID-HED12%3E3.0.CO;2-5](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0347(199708)19:5%3C436::AID-HED12%3E3.0.CO;2-5)>.

MARINO-ENRIQUEZ, A.; FLETCHER, C. D. M. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nature Reviews Cancer*, v. 14, n. 11, p. 701–702, 16 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3845>>.

MARKS, S. C.; GORSKI, J. P.; WISE, G. E. The mechanisms and mediators of tooth eruption - Models for developmental biologists. *International Journal of Developmental Biology*, v. 39, n. 1, p. 223–230, 1995.

MARKS, SANDY C. The Basic and Applied Biology of Tooth Eruption. *Connective Tissue Research*, v. 32, n. 1–4, p. 149–157, 7 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03008209509013718>>.

MARKS, SANDY C.; CAHILL, D. R.; WISE, G. E. The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption in the dog. *American Journal of Anatomy*, v. 168, n. 3, p. 277–289, nov. 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001680303>>.

MARKS, SANDY C.; SCHROEDER, H. E. Tooth eruption: Theories and facts. *The Anatomical Record*, v. 245, n. 2, p. 374–393, jun. 1996. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2%3C374::AID-AR18%3E3.0.CO;2-M](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2%3C374::AID-AR18%3E3.0.CO;2-M)>.

MARTINCORENA, I. *et al.* High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*, v. 348, n. 6237, p. 880–886, 22 maio 2015. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaa6806>>.

MATSUMOTO, M. A. *et al.* Expression of cell cycle regulatory proteins in epithelial components of dental follicles. *Journal of Molecular Histology*, v. 37, n. 3–4, p. 127–131, 10 out. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10735-006-9048-3>>.

MAYR, J. A. *et al.* Lipoic acid biosynthesis defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 37, n. 4, p. 553–563, 29 jul. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-014-9705-8>>.

MCCOLLUM, M.; SHARPE, P. T. Evolution and development of teeth. *Journal of Anatomy*, v. 199, n. 1–2, p. 153–159, jul. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-7580.2001.19910153.x>>.

MEADOW, S. R. Malignant change in a dental cyst. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 21, n. 3, p. 282–285, mar. 1966. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422066900582>>.

MELETI, M.; VAN DER WAAL, I. Clinicopathological evaluation of 164 dental follicles and dentigerous cysts with emphasis on the presence of odontogenic epithelium in the connective tissue. The hypothesis of focal ameloblastoma.

Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal, v. 18, n. 1, p. e60–e64, jan. 2013. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv18_i1_p60.pdf>.

MELLO, F. W. *et al.* Prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 6, p. 996–1002, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.03.026>>.

MILETICH, I. Normal and abnormal dental development. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 90001, p. 69R – 73, 2 abr. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddg085>>.

MITTELDORF, J.; FAHY, G. M. Questioning the inevitability of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 4, p. E558–E558, 23 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1720331115>>.

MOHAMMED, M.; MAHOMED, F.; NGWENYA, S. A survey of pathology specimens associated with impacted teeth over a 21-year period. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 24, n. 5, p. 0–0, 2019. Disponível em: <<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/22873.pdf>>.

MOLZ, P.; SCHRÖDER, N. Potential Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Memory Deficits Related to Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, n. DEC, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00849/full>>.

MOURA, F. *et al.* Lipoic Acid: Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Role and Clinical Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 5, p. 458–483, 23 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=15&issue=5&page=458>>.

NALBANTOGLU, S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. *Molecular Medicine*. [S.l.]: IntechOpen, 2019. v. i. p. 13. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>>.

NAMGYEL, T. *et al.* Histopathological features assessment of suspected pathologic pericoronar tissue of embedded teeth. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, v. 32, n. 4, p. 316–322, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2020.02.002>>.

NEEF, S. K. *et al.* Optimized protocol for metabolomic and lipidomic profiling in formalin-fixed paraffin-embedded kidney tissue by LC-MS. *Analytica Chimica Acta*, v. 1134, p. 125–135, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267020308242>>.

NELSON, P.; MASEL, J. Intercellular competition and the inevitability of multicellular aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 49, p. 12982–12987, 5 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1618854114>>.

NELSON, P.; MASEL, J. Reply to Mitteldorf and Fahy: Aging is still inevitable. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 4, p. E559–E559, 23 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1720890115>>.

ORTIZ, A. *et al.* Evo-devo models of tooth development and the origin of hominoid molar diversity. *Science Advances*, v. 4, n. 4, p. eaar2334, 11 abr. 2018. Disponível em: <<https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aar2334>>.

PALMER, R. M.; LUMSDEN, A. G. S. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Archives of Oral Biology*, v. 32, n. 4, p. 281–289, 1987. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003996987900227>>.

PANG, Z. *et al.* MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites*, v. 10, n. 5, p. 186, 7 maio 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/10/5/186>>.

PANNEERSELVAM, K. *et al.* Primary intraosseous squamous cell carcinoma in a dentigerous cyst. *South Asian Journal of Cancer*, v. 06, n. 03, p. 105–117, 22 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.4103/2278-330X.214579>>.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3314>>.

RAGHOEBAR, G. M. *et al.* Eruption disturbances of permanent molars: a review. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 20, n. 4, p. 159–66, abr. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.1991.tb00913.x>>.

RAKPRASITKUL, S. Pathologic changes in the pericoronal tissues of unerupted third molars. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, v. 32, n. 8, p. 633–8, set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526892>>.

RATTRAY, N. J. W. *et al.* Beyond genomics: understanding exposotypes through metabolomics. *Human Genomics*, v. 12, n. 1, p. 4, 26 dez. 2018. Disponível em: <<https://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-018-0134-x>>.

RAZAVI, S. M. *et al.* The relation of pericoronal third molar follicle dimension and bcl-2/ki-67 expression: An immunohistochemical study. *Dental research journal*, v.

9, n. Suppl 1, p. S26-31, dez. 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814558>>.

RENVOISÉ, E.; MICHON, F. An Evo-Devo perspective on ever-growing teeth in mammals and dental stem cell maintenance. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 1–12, 28 ago. 2014. Disponível em:
<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00324/abstract>>.

RICCADONNA, S.; FRANCESCHI, P. Data Treatment for LC-MS Untargeted Analysis. In: THEODORIDIS, G. A.; GIKA, H. G.; WILSON, I. D. (Org.). . *Metabolic Profiling. Methods in Molecular Biology*. [S.l: s.n.], 2018. p. 27–39. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7643-0_3>.

ROBINSON, O. *et al.* Metabolic profiles of socio-economic position: a multi-cohort analysis. *International Journal of Epidemiology*, p. 1–15, 21 nov. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ije/advance-article/doi/10.1093/ije/dyaa188/5998283>>.

ROTHOVÁ, M.; PETERKOVÁ, R.; TUCKER, A. S. Fate map of the dental mesenchyme: Dynamic development of the dental papilla and follicle. *Developmental Biology*, v. 366, n. 2, p. 244–254, jun. 2012. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160612001832>>.

SARAVANA, G. H. L.; SUBHASHRAJ, K. Cystic changes in dental follicle associated with radiographically normal impacted mandibular third molar. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 46, n. 7, p. 552–553, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266435608000582>>.

SARRAFPOUR, B. *et al.* Tooth Eruption Results from Bone Remodelling Driven by Bite Forces Sensed by Soft Tissue Dental Follicles: A Finite Element Analysis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e58803, 15 mar. 2013. Disponível em:
<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058803>>.

SATHEESAN, E. *et al.* Histopathological and Radiographic Analysis of Dental Follicle of Impacted Teeth Using Modified Gallego's Stain. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, v. 10, n. 5, p. ZC106-11, maio 2016. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437341>>.

SCHIFFER, L. *et al.* Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 194, n. May, p. 105439, nov. 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>>.

SCHROEDER, H. E. Development, Structure, and Function of Periodontal Tissues. *The Periodontium*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986a. v. 5/5. p. 23–323. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-71261-6_4>.

SCHROEDER, H. E. Periodontium, a Developmental and Functional Unit. *The Periodontium*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986b. p. 12–22. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-71261-6_3>.

SEPPALA, M. *et al.* Tooth Development: 1. Generating Teeth in the Embryo. *Dental Update*, v. 33, n. 10, p. 582–591, 2 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/denu.2006.33.10.582>>.

SHARMA, G. *et al.* Failure of eruption of permanent molars: a diagnostic dilemma. *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 26, n. 2, p. 91–99, mar. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ipd.12163>>.

SHWE, T. *et al.* D-galactose-induced aging does not cause further deterioration in brain pathologies and cognitive decline in the obese condition. *Experimental Gerontology*, v. 138, n. February, p. 111001, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111001>>.

SIMSEK-KAYA, G. *et al.* Soft tissue pathosis associated with asymptomatic impacted lower third molars. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 16, n. 7, p. e929–e936, 2011. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv16_i7_p929.pdf>.

SLATER, L. J. Dentigerous cyst versus dental follicle. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 38, n. 4, p. 402, ago. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266435699902152>>.

SMITH, C. A. *et al.* XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 3, p. 779–787, fev. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac051437y>>.

SONG, X. *et al.* Advanced glycation in d-galactose induced mouse aging model. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 108, n. 3, p. 239–251, maio 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637499000226>>.

SRIVASTAVA, S. Emerging Insights into the Metabolic Alterations in Aging Using Metabolomics. *Metabolites*, v. 9, n. 12, p. 301, 13 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/9/12/301>>.

STANLEY, H. R.; KROGH, H.; PANNKUK, E. Age changes in the epithelial components of follicles (dental sacs) associated with impacted third molars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 19, n. 1, p. 128–139, jan. 1965. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422065902264>>.

STATHOPOULOS, P. *et al.* Cysts and Tumors Associated With Impacted Third Molars: Is Prophylactic Removal Justified? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 69, n. 2, p. 405–408, fev. 2011. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239110005690>>.

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.

SURI, L.; GAGARI, E.; VASTARDIS, H. Delayed tooth eruption: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. A literature review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 126, n. 4, p. 432–445, out. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088954060400530X>>.

TAMBUWALA, A. A. *et al.* An evaluation of pathologic changes in the follicle of impacted mandibular third molars. *Journal of international oral health : JIOH*, v. 7, n. 4, p. 58–62, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954073>>.

THOMAS, C. *et al.* Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 8, p. 678–693, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd2619>>.

UMBAYEV, B. *et al.* Galactose-Induced Skin Aging: The Role of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, p. 1–15, 17 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/7145656/>>.

USSING, M. J. The Development of the Epithelial Attachment. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 13, n. 2, p. 123–154, 2 jan. 1955. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00016355509041608>>.

VAN CAUTER, E. Diurnal and Ultradian Rhythms in Human Endocrine Function: A Minireview. *Hormone Research*, v. 34, n. 2, p. 45–53, 1990. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/181794>>.

VENTÄ, I.; KYLÄTIE, E.; HILTUNEN, K. Pathology related to third molars in the elderly persons. *Clinical Oral Investigations*, v. 19, n. 8, p. 1785–1789, 17 nov. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00784-014-1395-y>>.

VENTÄ, I.; TURTOLO, L.; YLIPAAVALNIEMI, P. Change in clinical status of third molars in adults during 12 years of observation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 57, n. 4, p. 386–389, abr. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239199902732>>.

WALDRON, C. A.; MUSTOE, T. A. Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin in an odontogenic cyst. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 67, n. 6, p. 716–724, jun. 1989. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422089900145>>.

- WALI, G. G.; SRIDHAR, V.; SHYLA, H. N. A study on dentigerous cystic changes with radiographically normal impacted mandibular third molars. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, v. 11, n. 4, p. 458–65, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293941>>.
- WILEY, C. D.; CAMPISI, J. From Ancient Pathways to Aging Cells—Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 6, p. 1013–1021, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116302285>>.
- WILLIAMS, I. E.; NEWMAN, C. W. Squamous-cell carcinoma associated with a dentigerous cyst of the maxilla. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 16, n. 8, p. 1012–1016, ago. 1963. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422063902068>>.
- WISE, G. E. The Biology of Tooth Eruption. *Journal of Dental Research*, v. 77, n. 8, p. 1576–1579, 8 ago. 1998. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00220345980770080401>>.
- WISE, G. E.; FRAZIER-BOWERS, S.; D'SOUZA, R. N. Cellular, Molecular, and Genetic Determinants of Tooth Eruption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 13, n. 4, p. 323–335, jul. 2002. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/154411130201300403>>.
- WOOD, C. L.; LANE, L. C.; CHEETHAM, T. Puberty: Normal physiology (brief overview). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 33, n. 3, p. 101265, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.03.001>>.
- WRIGHT, J. M.; SOLUK TEKKEŞİN, M. Odontogenic tumors: where are we in 2017? *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, v. 51, n. 3, p. 10–30, 17 nov. 2017. Disponível em: <<http://eor.istanbul.edu.tr/tr/yazi/10-17096-jiufd-52886-320055006E004A004B005100350076004A00540077003100>>.
- XIE, G. *et al.* Profiling of Serum Bile Acids in a Healthy Chinese Population Using UPLC–MS/MS. *Journal of Proteome Research*, v. 14, n. 2, p. 850–859, 6 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr500920q>>.
- YANG, C.-H.; ANDREW POSPISILIK, J. Polyphenism – A Window Into Gene-Environment Interactions and Phenotypic Plasticity. *Frontiers in Genetics*, v. 10, n. FEB, 26 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00132/full>>.
- YANG, J. *et al.* The involvement of genes related to bile secretion pathway in rat tooth germ development. *Journal of Molecular Histology*, v. 51, n. 1, p. 99–107, 24 fev. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10735-020-09861-0>>.

YASUOKA, T. *et al.* Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 58, n. 8, p. 900–905, ago. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239100664303>>.

YELICK, P. C.; SHARPE, P. T. Tooth Bioengineering and Regenerative Dentistry. *Journal of Dental Research*, v. 98, n. 11, p. 1173–1182, 20 out. 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034519861903>>.

YILDIRIM, G. *et al.* Pathologic changes in soft tissues associated with asymptomatic impacted third molars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 106, n. 1, p. 14–18, jul. 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439856>>.

YOSHIKAWA, D. K.; KOLLAR, E. J. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Archives of Oral Biology*, v. 26, n. 4, p. 303–307, 1981. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003996981900510>>.

ZHANG, Y. D. *et al.* Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell research*, v. 15, n. 5, p. 301–16, maio 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/7290299>>.

ZHOU, T. *et al.* Dental Follicle Cells: Roles in Development and Beyond. *Stem Cells International*, v. 2019, p. 1–17, 15 set. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2019/9159605/>>.

ZHOU, Y. Y. *et al.* Gene transcriptional and metabolic profile changes in mimetic aging mice induced by d-galactose. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.

APÊNDICE A – Documentação apresentada junto ao Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a indivíduos maiores de 18 anos)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica”**. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do tecido coletado. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar, em outros futuros. O material em questão não se trata de uma lesão bucal específica, mas sim de de um tecido considerado normal com potencial para se transformar em lesões. Neste projeto, pretende-se analisar alterações moleculares que podem ser observadas em relação ao avanço da idade, numa tentativa de entender melhor o potencial deste tecido para se transformar em lesões e avaliar possíveis biomarcadores que possam explicar este fenômeno.

Caso você autorizar sua participação nesta pesquisa, iremos utilizar o material anteriormente coletado em cirurgia que se encontra atualmente armazenado no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. Este fragmento encontra-se embebido por parafina e será desparafinado e posteriormente será feita o preparo da amostra para que possamos estudar o ocasiona o desenvolvimento dela. Ressaltamos que não será necessária nova intervenção cirúrgica, iremos utilizar o material coletado no passado.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo, apenas os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa terão acesso aos dados. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar, garantindo o seu anonimato ao publicar os resultados desta pesquisa.

Estamos à sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa você terá a liberdade para se recusar a participar ou para retirar seu consentimento sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento. Este estudo não oferecerá riscos além daqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você.

Esta pesquisa ajudará a entender melhor os processos que podem levar ao desenvolvimento de cistos e tumores orais e isso será muito importante para melhorar as condutas de tratamento no futuro.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Biologia Molecular (sala 3205) da Faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será fornecida ao Sr. (a). Neste mesmo local, os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão sua com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de
Identidade

_____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "**Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

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

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

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

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

| | |
|---|------|
| Nome completo do participante/responsável legal | Data |
|---|------|

Assinatura do participante/responsável legal

Carolina Cavalieri Gomes

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627
CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG
Telefones: (31) 34092895
E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

| | |
|---------------------------------------|------|
| Assinatura do pesquisador responsável | Data |
|---------------------------------------|------|

Victor Coutinho Bastos

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627
CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG
Telefones: (31) 9 9162-8989
E-mail: coutinhobvictor@gmail.com

| | |
|---------------------------------------|------|
| Assinatura do pesquisador (mestrando) | Data |
|---------------------------------------|------|

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

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

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

Tel: (31) 3409-4592.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a pais de indivíduos menores de 18 anos)

O seu/sua filho (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica”**. Pedimos a sua autorização para utilização de material previamente coletado, que se encontra armazenado no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar, em outros futuros.

O material em questão não se trata de uma lesão bucal específica, mas sim de de um tecido considerado normal com potencial para se transformar em lesões. Neste projeto, pretende-se analisar alterações moleculares que podem ser observadas em relação ao avanço da idade, numa tentativa de entender melhor o potencial deste tecido para se transformar em lesões e avaliar possíveis biomarcadores que possam explicar este fenômeno.

Ressaltamos que o método de coleta do material a ser pesquisado não requer intervenção adicional, além do procedimento cirúrgico o qual o seu/sua filho(a) foi submetido para tratamento no passado. O estudo oferecerá riscos mínimos a saúde do seu/sua filho (a), sendo que um dos possíveis riscos poderá ser a perda de sigilo das informações. Para minimizar esse risco apenas os pesquisadores terão acesso aos dados, garantindo o anonimato, e serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Quanto aos benefícios, a pesquisa ajudará a entender melhor os processos que podem levar ao desenvolvimento de cistos e tumores orais e isso será muito importante para melhorar as condutas de tratamento no futuro.

Para participar deste estudo o seu/sua filho (a) não terá nenhum, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico coletado, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir do material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. O nome do seu/sua filho (a) ou o material que indique a participação não será liberado sem a sua permissão. O seu/sua filho/filha não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no laboratório de biologia molecular (sala 3205) da faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será fornecida ao Sr. (a). Neste mesmo local, os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade do seu/sua filho (a) com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o material biológico do meu/minha filho (a) seja utilizado somente para esta pesquisa.

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

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

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

Nome completo do responsável pelo participante

Data

Assinatura do responsável pelo participante

Carolina Cavalieri Gomes

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Victor Coutinho Bastos

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 9 9162-8989

E-mail: coutinhobvictor@gmail.com

Assinatura do pesquisador (mestrando)

Data

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

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

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

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

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

Tel: (31) 3409-4592.

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a indivíduos entre 8 a 17 anos)

Convidamos você a participar do projeto de pesquisa “**Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica**”. Seus pais ou responsáveis autorizaram sua participação.

Para este estudo, utilizaremos o material que foi coletado durante a cirurgia e arquivado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Esse pedaço do material que vamos estudar já foi coletado e está armazenado no Laboratório de Patologia da Faculdade, e você não terá que passar por mais nenhum tipo de procedimento. Vamos utilizar parte desse material neste estudo e depois que nós terminarmos, iremos devolvê-lo para o arquivo.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas. Para evitar esse possível risco, todas as informações que estão no seu registro somente serão utilizadas para pesquisa e ensino, evitando que ninguém saiba de nada que você nos contar.

Se você tiver qualquer dúvida, pode nos perguntar.

Caso você queira desistir, você pode fazer e não terá nenhum problema ou sofrerá qualquer tipo de consequência.

Este documento será assinado em duas vias e uma delas ficará com você onde constam os dados do pesquisador responsável, e a qualquer momento você poderá esclarecer as suas dúvidas quanto à pesquisa e a sua participação com os pesquisadores ou com o COEP, nos telefones abaixo.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.

Entendi que posso aceitar participar, mas que, a qualquer momento, posso desistir e que nada vai acontecer comigo.

Os pesquisadores tiraram todas as minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar desta pesquisa.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

Carolina Cavaliéri Gomes

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Victor Coutinho Bastos

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 9 9162-8989

E-mail: coutinhobvictor@gmail.com

Assinatura do pesquisador (mestrando)

Data

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

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

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

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br.

Tel: 34094592

Justificativa de dispensa de TCLE

TÍTULO DA PESQUISA: “Comparação do perfil metabólico de folículos pericoronários em relação à idade cronológica”.

PESQUISADORES:

Prof. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes (pesquisador responsável)

Victor Coutinho Bastos (mestrando)

Em concordância com a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011, solicita-se a **dispensa condicional** dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido. Prévio ao acionamento deste recurso, serão realizadas três tentativas de contato com os participantes, por telefone e/ou endereço eletrônico (e-mail), quando estes estiverem presentes na ficha de registro. O compromisso com a confidencialidade dos dados dos pacientes encontra-se descrito e devidamente assinado pelos pesquisadores envolvidos no Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD).

Ressalta-se que o presente estudo utilizará blocos parafinizados contendo amostras fixadas em formalina já disponíveis no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Não serão efetuadas intervenções adicionais em humanos com a finalidade de aquisição deste material.

Data: 28/05/2020.



Prof^a. Carolina Cavaliéri Gomes
Responsável pelo projeto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DE FOLÍCULOS PERICORONÁRIOS EM RELAÇÃO À IDADE CRONOLÓGICA

Pesquisador: Carolina Cavalieri Gomes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30697120.9.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.082.478

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 10 de Junho de 2020

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE B – Scripts executados e gráficos gerados nos packages IPO e XCMS

Os scripts IPO (versão 1.14.0) e XCMS (versão 3.8.1) foram executados dentro do programa R Statistics (R version 3.6.2 2019-12-12) -- "Dark and Stormy Night").

- Instalação do XCMS:

```
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")

BiocManager::install("xcms")
```

- Instalação do IPO:

```
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")

BiocManager::install("IPO")
```

Após a instalação dos pacotes, diretórios/pastas foram criadas contendo os dados convertidos em formato aberto .mzXML para cada um dos modos de ionização.

A otimização do IPO processou-se através de duas etapas: a primeira foi conduzida com a obtenção dos valores ideais para os parâmetros “*min_peakwidth*”, “*max_peakwidth*”, “*ppm*” e “*mzdiff*”.

Uma vez obtidos os valores ideais, uma segunda rodada de otimização foi executada, desta vez com intervalos englobando estes valores ótimos, e com a adição dos parâmetros “*snthresh*”, “*noise*”, “*prefilter*” e “*value_of_prefilter*”. A otimização destes parâmetros foi realizada, uma vez que eles também influenciam na interpretação e resolução dos picos cromatográficos, além de impactar na listagem final de *features* detectados.

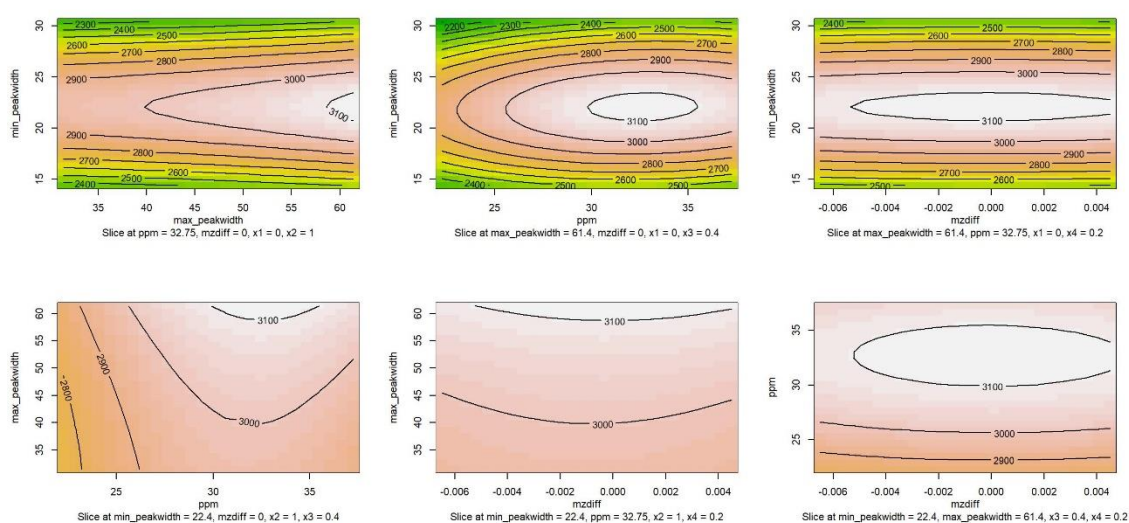
Para o modo positivo, os seguintes comandos foram utilizados:

```
> library(IPO)
> ppParams<-getDefaultXcmsSetStartingParams()
```

```
> ppResult<-optimizeXcmsSet(params=ppParams,nSlaves=1)
```

Ao final da execução deste comando, o seguinte gráfico de superfície de resposta foi gerado, possibilitando o ajuste de valores para a segunda otimização, conforme o script descrito abaixo.

Gráfico 01 – Default da função peak picking (ESI+).



```
> library(IPO)
```

```
> ppParams<-getDefaultXcmsSetStartingParams()
```

```
> ppParams$min_peakwidth<-c(21,23)
```

```
> ppParams$max_peakwidth<-c(60,62)
```

```
> ppParams$ppm<-c(30,34)
```

```
> ppParams$snthresh<-c(7,10)
```

```
> ppParams$mzdiff<-c(0.00009,0.00011)
```

```
> ppParams$noise<-c(0,150)
```

```
> ppParams$prefilter<-c(2,5)
```

```
> ppParams$value_of_prefilter<-c(50,150)
```

```
> ppResult<-optimizeXcmsSet(params=ppParams,nSlaves=1)
```

```
> rgResult<-optimizeRetGroup(xset=ppResult$best_settings$xset,nSlaves=1)
```

```
> writeRScript(ppResult$best_settings$parameters, rgResult$best_settings)
```

Ao longo da execução deste script, gráficos de superfície de resposta vão sendo gerados:

Gráfico 04. Primeiro gráfico gerado para a função RetGroup (ESI+).

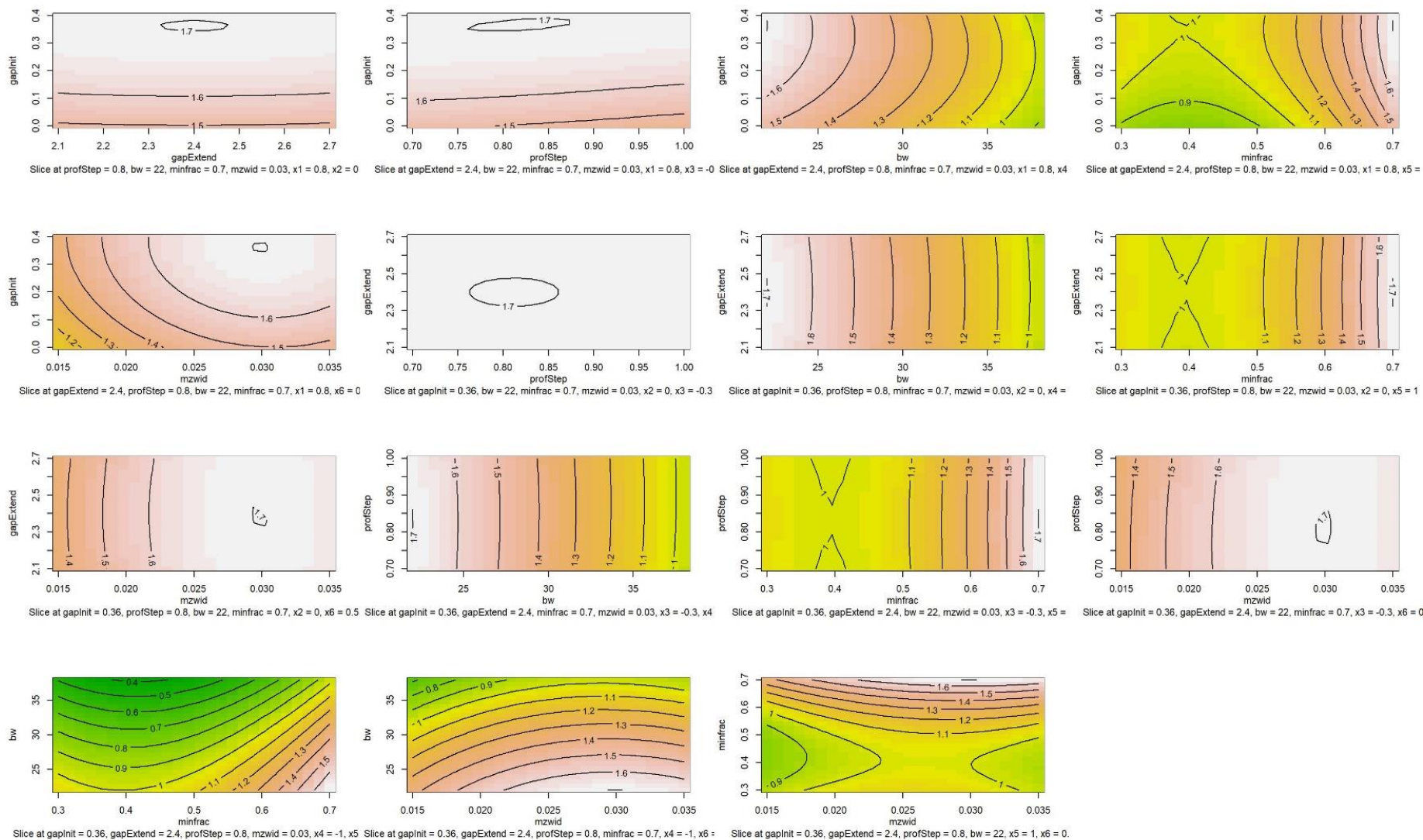
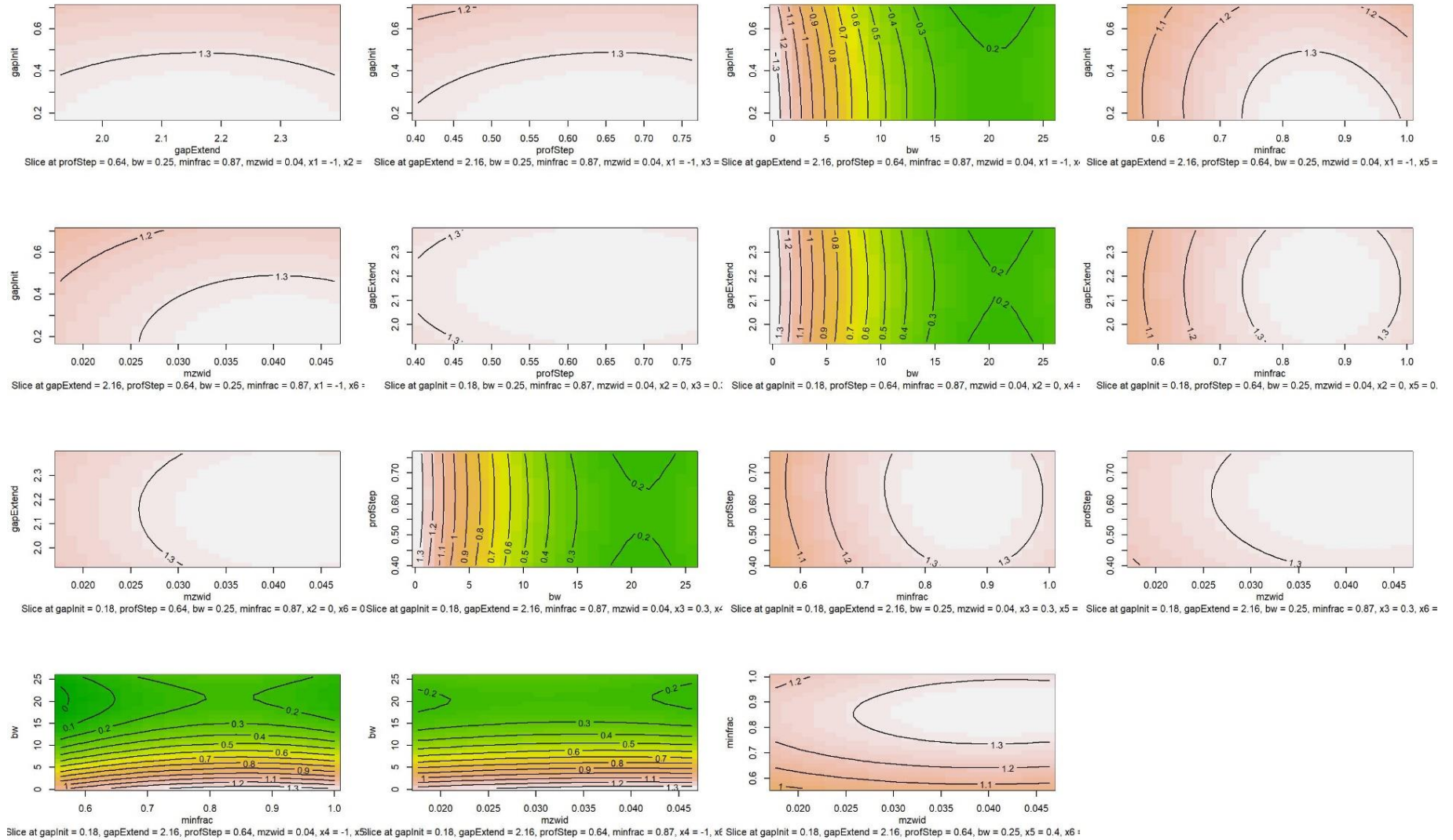


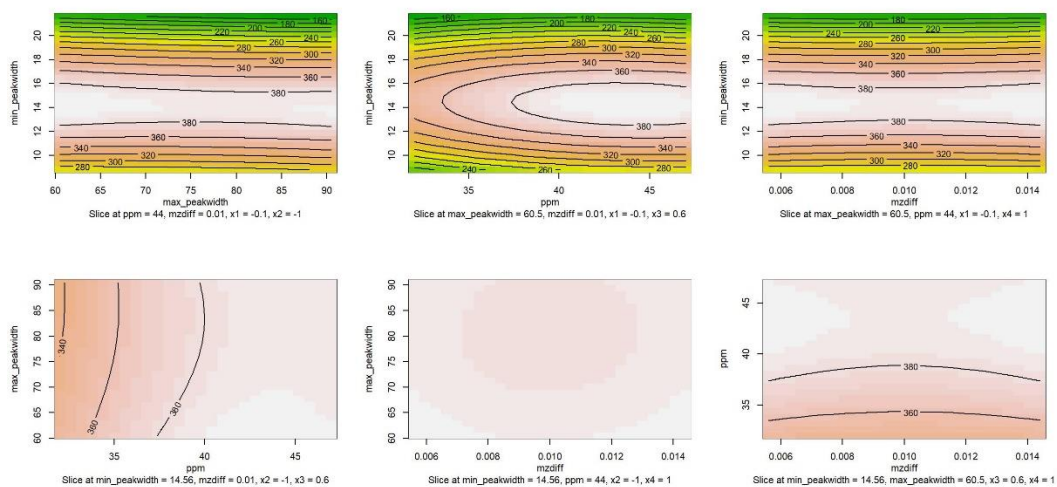
Gráfico 05. Último gráfico gerado para a função RetGroup (ESI+).



Do mesmo modo, a otimização foi realizada também para o modo negativo de ionização. Os scripts e gráficos gerados são mostrados a seguir:

```
> library(IPO)
> ppParams<-getDefaultXcmsSetStartingParams()
> ppResult<-optimizeXcmsSet(params=ppParams,nSlaves=1)
```

Gráfico 06 – Default da função Peak picking (ESI-).



Após a análise destes modelos, os seguintes comandos foram dados:

```
> library(IPO)
> ppParams<-getDefaultXcmsSetStartingParams()

> ppParams$min_peakwidth<-c(14,15)
> ppParams$max_peakwidth<-c(68,70)
> ppParams$ppm<-c(50.5,52)
> ppParams$snthresh<-c(7,10)
> ppParams$mzdiff<-c(0.008,0.009)
> ppParams$noise<-c(245,255)
> ppParams$prefilter<-c(2.5,3.5)
> ppParams$value_of_prefilter<-c(375,385)

> ppResult<-optimizeXcmsSet(params=ppParams,nSlaves=1)
> rgResult<-optimizeRetGroup(xset=ppResult$best_settings$xset,nSlaves=1)
> writeRScript(ppResult$best_settings$parameters,rgResult$best_settings)
```

Os gráficos do tipo superfície de resposta podem ser vistos a seguir:

Gráfico 09. Primeiro gráfico gerado para a função RetGroup (ESI-).

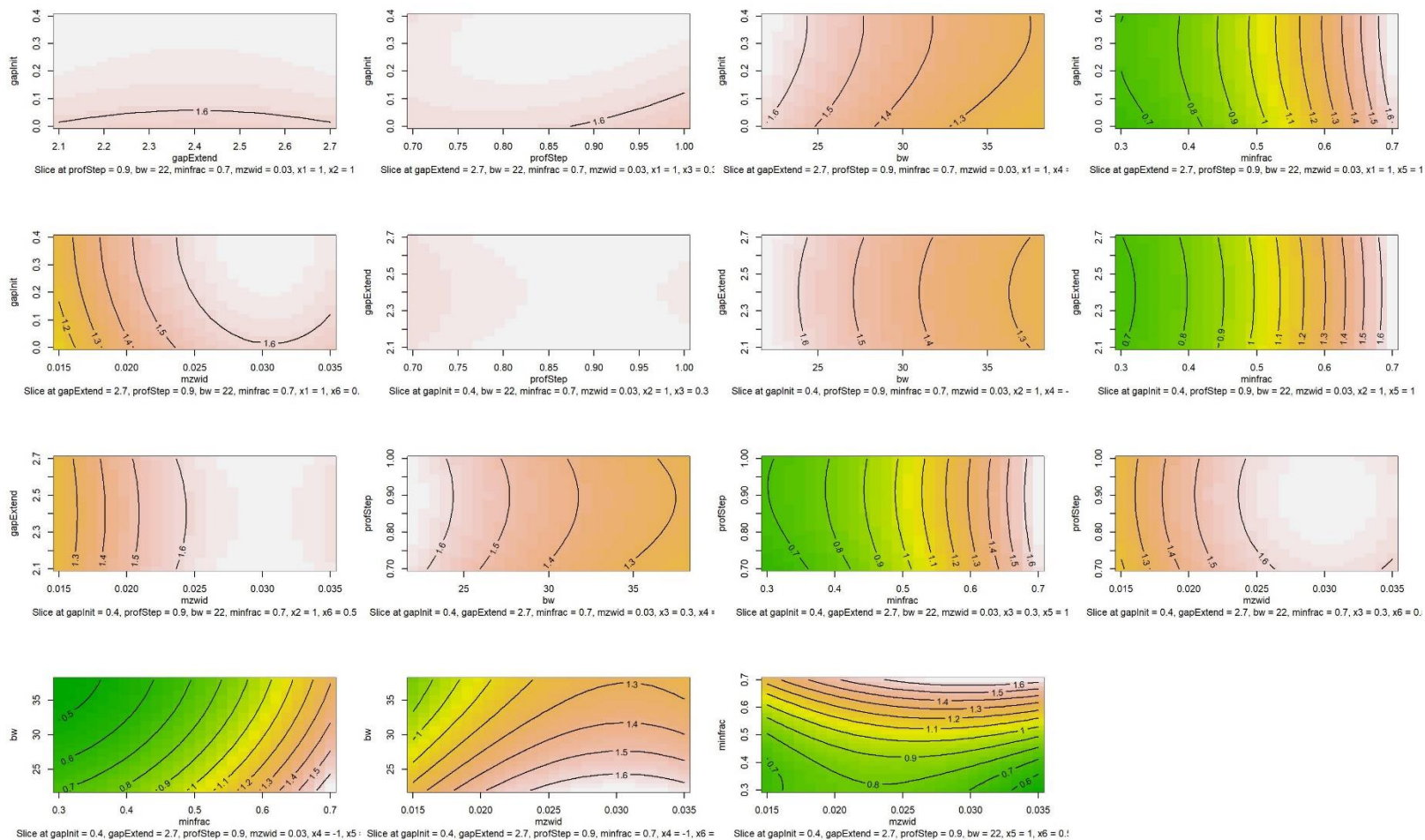
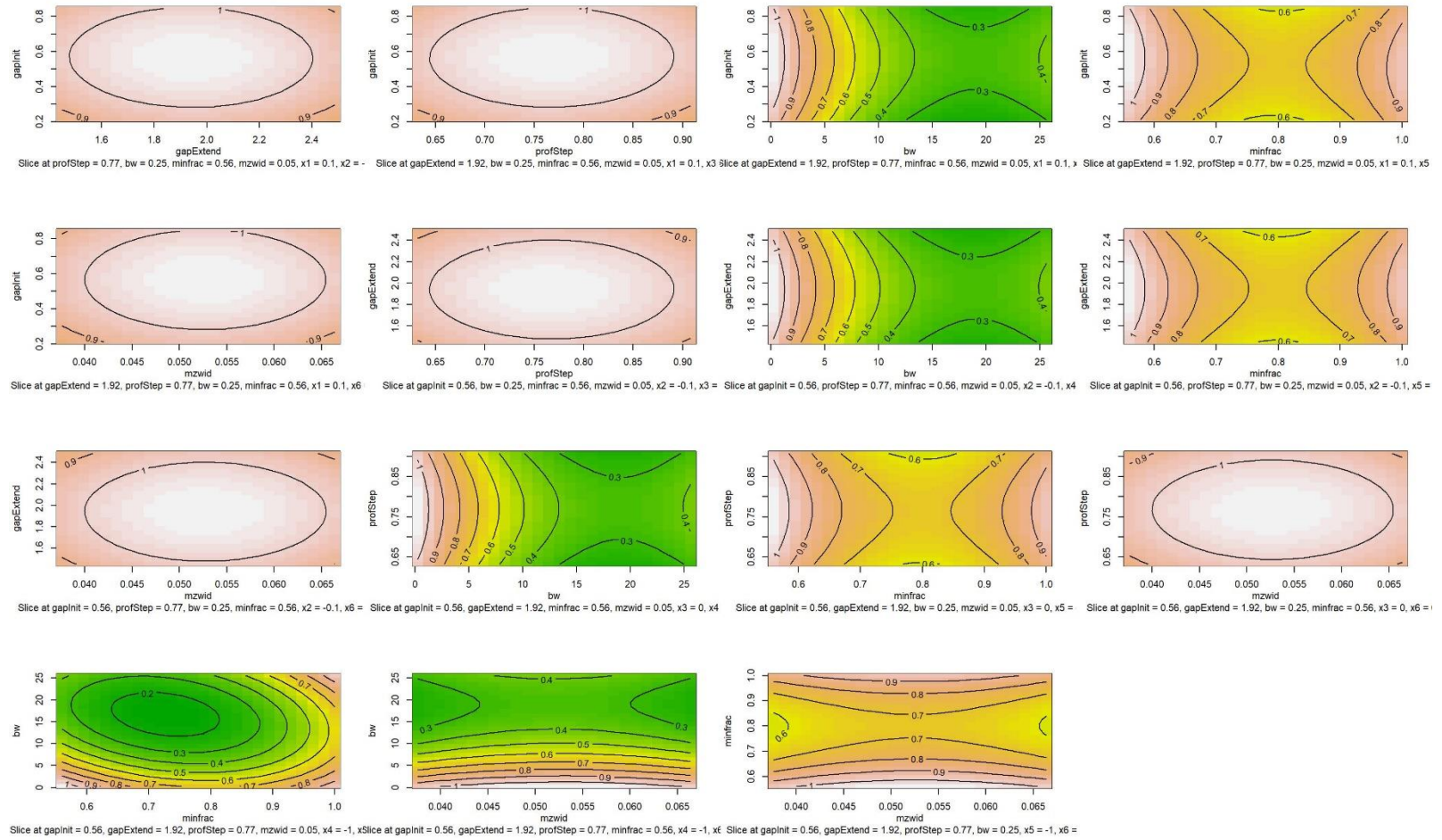


Gráfico 10. Último gráfico gerado para a função RetGroup (ESI-).



Após a obtenção dos parâmetros ideais, demonstrados no **Quadro 01**, prosseguiu-se com a execução do script do XCMS. Ajustes foram realizados para dois parâmetros: '*minfrac*' e '*minsamp*'. O primeiro afirma que, para qualquer grupo (Jovens ou Adultos) um determinado *feature* deve estar presente em pelo menos uma fração das amostras. Assim este valor foi corrigido para 0,7, de forma que para um íon de m/z e RT específicos, este deveria estar presente em 70% das amostras de um mesmo grupo. Já o parâmetro "*minsamp*" ignora a distinção de grupos, e seu valor determina o número mínimo de amostras em que determinado *feature* deve estar presente dentro de todo o universo de amostras (QC, Jovens e Adultos, conjuntamente). Este valor foi corrigido para 2. Com estas alterações, para ser considerado válido, um *feature* deveria estar presente em no mínimo 2 amostras (excluindo-se, desse modo, grandes variações individuais) e em 70% das amostras de qualquer um dos grupos.

O valor do parâmetro '*center*' também foi corrigido de forma a utilizar como amostra de referência aquela apontada como a maior número de picos dentro do grupo dos QC. Verificou-se menores desvios no tempo de retenção desta forma.

Desta forma, levando-se em consideração os parâmetros observados na otimização e as correções realizadas, o XCMS foi executado dentro dos scripts:

a) Para o modo positivo de ionização:

```
> library(xcms)

> data1<-xcmsSet(method="centWave", peakwidth=c(20.8,62.6), ppm=31.28, noise=46,
snthresh=6.1, mzdif=1e-04, prefilter=c(7,100), mzCenterFun="wMean", integrate=1, fitgauss=
FALSE, verbose.columns=FALSE)

> data2<-retcor(data1, method="obiwarp", plotype="deviation", distFunc="cor_opt",profStep=
0.583,center= 23,response= 1,gapInit= 0.44,gapExtend= 2.16,factorDiag= 2,factorGap=
1,localAlignment= 0)

> data 3<- group(data2, method="density", bw=0.8799999999999999, mzwid=0.032, minfrac=0.7,
minsamp=2, max= 50)

>data4 <- fillPeaks(data3)

>reporttab<-diffreport(data4,"Adultos","Jovens","QC",100)
```

b) Para o modo negativo de ionização:

```
> library(xcms)
```

```
>data1<-xcmsSet(method="centWave", peakwidth=c(14.26,70.4), ppm=51.25,noise=251.8,  
snthresh=7.9, mzdif=0.0095, prefilter=c(3.3, 385), mzCenterFun="wMean", integrate=1,  
fitgauss=FALSE, verbose.columns= FALSE)
```

```
>data2<-retcor(data1, method="obiwarp", plottype="deviation", distFunc="cor_opt",  
profStep=0.77, center=22, response=1, gapInIt=0.528,gapExtend=1.968, factorDiag=2,  
factorGap=1, localAlignment=0)
```

```
>data3<-group(data2, method="density", bw=0.8799999999999999, mzwid=0.052, minfrac=0.7,  
minsamp=2, max=50)
```

```
>data4<-fillPeaks(data3)
```

```
>reporttab<-diffreport(data4,'Adultos','Jovens','QC',100)
```

APÊNDICE C – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico *Frontiers in Oral Health*.



Age-Related Metabolic Pathways Changes in Dental Follicles: A Pilot Study

Victor Coutinho Bastos^{1,2}, Jéssica Gardone Vítório¹, Roberta Rayra Martins-Chaves¹, Flávia Leite-Lima¹, Yuri Abner Rocha Lebron³, Victor Rezende Moreira³, Filipe Fideles Duarte-Andrade¹, Thaís dos Santos Fontes Pereira¹, Lucilaine Valéria de Souza Santos³, Liséte Celina Lange³, Adriana Nori de Macedo⁴, Gisele André Baptista Canuto⁵, Carolina Cavaliéri Gomes^{2†} and Ricardo Santiago Gomez^{1*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Eliete Neves Da Silva Guerra,
University of Brasília, Brazil

Reviewed by:

Elena Riet Correa Rivero,
Federal University of Santa
Catarina, Brazil
Rogelio González-González,
Juárez University of the State of
Durango, Mexico
Celeste Sanchez-Romero,
University of the Republic, Uruguay

*Correspondence:

Ricardo Santiago Gomez
rsgomez@ufmg.br

[†] These authors have contributed
equally to this work and share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Oral Cancers,
a section of the journal
Frontiers in Oral Health

Received: 08 March 2021

Accepted: 12 May 2021

Published: xx June 2021

Citation:

Bastos VC, Vítório JG,
Martins-Chaves RR, Leite-Lima F,
Lebron YAR, Moreira VR,
Duarte-Andrade FF, Pereira TSF,
Santos LVS, Lange LC, Macedo AN,
Canuto GAB, Gomes CC and
Gomez RS (2021) Age-Related
Metabolic Pathways Changes in
Dental Follicles: A Pilot Study.
Front. Oral. Health 2:677731.
doi: 10.3389/froh.2021.677731

¹ Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Department of Sanitary and Environmental Engineering, School of Engineering, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Department of Chemistry, Exact Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

Aging is not a matter of choice; it is our fate. The “time-dependent functional decline that affects most living organisms” is coupled with several alterations in cellular processes, such as cell senescence, epigenetic alterations, genomic instability, stem cell exhaustion, among others. Age-related morphological changes in dental follicles have been investigated for decades, mainly motivated by the fact that cysts and tumors may arise in association with unerupted and/or impacted teeth. The more we understand the physiology of dental follicles, the more we are able to contextualize biological events that can be associated with the occurrence of odontogenic lesions, whose incidence increases with age. Thus, our objective was to assess age-related changes in metabolic pathways of dental follicles associated with unerupted/impacted mandibular third molars from young and adult individuals. For this purpose, a convenience sample of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) dental follicles from young (<16 y.o., $n = 13$) and adult (>26 y.o., $n = 7$) individuals was selected. Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)-based untargeted metabolomics. Multivariate and univariate analyses were conducted, and the prediction of altered pathways was performed by *mummichog* and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) approaches. Dental follicles from young and older individuals showed differences in pathways related to C21-steroid hormone biosynthesis, bile acid biosynthesis, galactose metabolism, androgen and estrogen biosynthesis, starch and sucrose metabolism, and lipoate metabolism. We conclude that metabolic pathways differences related to aging were observed between dental follicles from young and adult individuals. Our findings support that similar to other human tissues, dental follicles associated with unerupted tooth show alterations at a metabolic level with aging, which can pave the way for further studies on oral pathology, oral biology, and physiology.

Keywords: aging, dental follicle, dental sac, developmental biology, oral pathology, untargeted metabolomics, LC-MS

**APÊNDICE D – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico
*Developmental Dynamics***



REVIEW

Dev Dynamics
DOI10.1002/dvdy.406

**Revisiting the human dental follicle: from tooth development to its association
with unerupted or impacted teeth and pathological changes**

Running title: The dental follicle

Victor Coutinho **Bastos**^{1,2} <https://orcid.org/0000-0003-0360-4179>

Ricardo Santiago **Gomez**¹ <https://orcid.org/0000-0001-8770-8009>

Carolina Cavaliéri **Gomes**^{2*} <https://orcid.org/0000-0003-1580-4995>

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

² Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

***Correspondence:**

Dr. Carolina Cavaliéri Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, ICB, 3rd floor, block G, room 60, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 31270-901.
E-mail: carolinacgomes@ufmg.br

Keywords: dental follicle; dental sac; odontogenesis; tooth development; tooth eruption; aging; pathological changes

Conflict of interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Data Availability Statement: Not applicable.

Accepted Articles are accepted, unedited articles for future issues, temporarily published online in advance of the final edited version. © 2021 Wiley Periodicals, Inc.
Received: May 04, 2021; Revised: Jun 18, 2021; Accepted: Jul 22, 2021

This article is protected by copyright. All rights reserved.