

MICHELLE DANIELLE PORTO MATIAS

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ALDH1 EM LÍQUEN
PLANO ORAL, LESÃO LIQUENOIDE E LEUCOPLASIA EM EPITÉLIO
E NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO LIQUENOIDE**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
2022**

MICHELLE DANIELLE PORTO MATIAS

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ALDH1 EM LÍQUEN
PLANO ORAL, LESÃO LIQUENOIDE E LEUCOPLASIA EM EPITÉLIO
E NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO LIQUENOIDE**

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

Orientador (a): Prof. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Coorietador (a): Karine Duarte da Silva

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

M433e Matias, Michelle Danielle Porto.
2022 Estudo comparativo da expressão de ALDH1 em líquen plano oral, lesão liquenoide e leucoplasia em epitélio e no infiltrado inflamatório liquenoide / Michelle Danielle Porto Matias. -- 2022.

83 f. : il.

Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar.
Coorientadora: Karine Duarte da Silva.

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

1. Líquen plano bucal. 2. Leucoplasia. 3. Inflamação. 4. Imuno-histoquímica. 5. Família aldeído desidrogenase 1. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de . II. Silva, Karine Duarte da . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Sérgio Barbosa dos Santos - CRB 6/3182.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE ALDH1 EM LÍQUEN PLANO ORAL, LESÃO LIQUENOIDE E LEUCOPLASIA EM EPITÉLIO E NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO LIQUENOIDE

MICHELLE DANIELLE PORTO MATIAS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL

Aprovada em 18 de outubro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Maria Cássia Ferreira de Aguiar - Orientador
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Karine Duarte da Silva
UFMG

Prof(a). Giovanna Ribeiro Souto
PUC - MINAS

Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa
Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte, 18 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Karine Duarte da Silva, Usuária Externa**, em 18/10/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Cassia Ferreira de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 18/10/2022, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovanna Ribeiro Souto, Usuário Externo**, em 18/10/2022, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Ferreira de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 18/10/2022, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1813246** e o código CRC **85E365DE**.

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Augusto de Oliveira Matias e Jaqueline Porto Matias pelo constante apoio, incentivo e estímulo que me impulsionaram a buscar o conhecimento e crescimento, concedendo a mim a oportunidade de me realizar como profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho, me dar sabedoria, clareza e proteção. Todos passamos por um período bem turbulento com muitas perdas físicas e pessoais. Obrigada, Deus, pela oportunidade de crescimento, pois sem sua infinita bondade e amor, talvez, eu nem estaria aqui. Nestes tempos de COVID pudemos ver o quanto Deus nos fez fortes e resilientes.

Meus exemplos de vida e de amor, Luiz Augusto de Oliveira Matias (pai) e Jaqueline Porto Matias (mãe) dedico este trabalho a vocês que tanto abdicaram e dedicaram por nós. Sou o que sou porque os tenho como meus guias e meu alicerce, eu os amo infinitamente! Não menos importante, dedico este momento feliz em minha vida ao meu marido, Alessandro, que esteve ao meu lado em todos os momentos me dando motivação, apoio, que me impulsionou quando era necessário. Obrigada pai, mãe e Alessandro pelo carinho e amor sempre dedicado a mim, minha vida se torna mais leve com vocês ao meu lado. Deixo aqui registrado minhas alegrias diárias como o Bob, minha irmã Pâmella, meu irmão Gustavo, e meu sobrinho lindo, o Dylan, meus amores! Todos vocês enchem meu coração de amor! Obrigada por existirem!

Agradeço à Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar pela imensa paciência, dedicação e carinho desde a graduação. Sempre muito delicada em todas as diversas vezes que eu precisava de uma orientação. Obrigada por me ajudar, considero a senhora um exemplo de pessoa e pesquisadora! Aprendi e aprendo cada dia mais com a senhora.

À Karine Duarte, gostaria de dizer que você foi essencial em meu mestrado, como fiquei feliz e orgulhosa em tê-la como minha co-orientadora! Inicialmente, fiquei bem perdida e com toda doçura do mundo você sempre mostrava de um jeito mais simples a visão de tudo. Obrigada pelo carinho! Daniela Meirelles, agradeço também a você pelo companheirismo nas imunos, pela dedicação e boa disposição em sempre me ajudar!

Muitas pessoas se passaram por mim nestes 2 anos. Conheci novas pessoas, me aproximei de amigos distantes e me afastei de outros. Mas, tudo foi um

aprendizado muito bom para meu crescimento pessoal e profissional. Aos colegas de pós graduação obrigada pelo companheirismo e aprendizado mútuo.

Obrigada a todos meus amigos, amigas, familiares, colegas de trabalho que de forma direta ou até mesmo indireta me ajudaram. Sou imensamente grata por tudo!

“O Crescimento Espiritual Não Cessa Quando o Ser Se Entrega à Conquista dos
Relevantes Valores do Bem.”

Joanna de Ângelis

RESUMO

O líquen plano oral é uma doença potencialmente maligna e compartilha muitas características clínicas e histopatológicas com outras lesões semelhantes. O ALDH1 é um biomarcador específico na identificação de células-tronco, porém seu papel nas células estromais do infiltrado inflamatório imune não foi explorado. O objetivo deste estudo foi investigar a imunexpressão de ALDH1 em células epiteliais e estromais de Líquen Plano Oral e outras lesões liquenóides. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o parecer nº 5.410.374, CAAE: 52763021.0.0000.5149. Foi realizada uma busca no arquivo do laboratório de Patologia Oral e Bucomaxilofacial da UFMG em um período de 10 anos (2011 – 2021) de casos diagnosticados como Líquen Plano oral, Lesão Liquenoide, Leucoplasia e Processo Inflamatório Inespecífico (controle). Foram selecionados 633 casos e após a utilização dos critérios de inclusão e exclusão, a expressão imuno-histoquímica do ALDH1 foi investigada em 64 casos, 16 de cada diagnóstico. O ALDH1 foi avaliado tanto no epitélio quanto nas células estromais do infiltrado inflamatório liquenóide. Um percentual de 5% de células ALDH1+ foi considerado positivo no epitélio. A avaliação das células estromais foi feita de forma semiquantitativa. Os campos foram classificados em escores, segundo os critérios: 1 (0 a 10%); 2 (11 a 50%) e 3 (mais de 51%). O valor médio da soma dos campos foi o escore final. Diferenças estatísticas entre os grupos foram investigadas e a significância foi estabelecida considerando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software: SPSS – Statistical Package for the Social Science® (versão 26.0, 2019, Chicago, IL, USA). A expressão de ALDH1 no epitélio foi baixa em todos os grupos sem diferença entre eles, embora a maioria dos casos tenha sido encontrada na amostra de inflamação crônica inespecífica. O escore de células ALDH1+ na lâmina própria foi maior para LPO (2,0), seguido por Leucoplasia (1,3), LLO (1,2) e processo inflamatório inespecífico (1,1) ($p < 0,05$). A imunexpressão do ALDH1 no epitélio de lesões com um infiltrado liquenóide não mostrou uma ferramenta contributiva, porém o ALDH1 em células estromais no infiltrado inflamatório do líquen plano merece atenção, pois pode estar envolvido no complexo processo de regulação imune associado à patogênese desta doença.

Palavras-chave: ALDH1, Líquen Plano Oral, Leucoplasia, Lesão Liquenoide, Inflamação, Imunoistoquímica

ABSTRACT

Comparative study of aldh1 expression in oral lichen plane, lichenoid lesion and leucoplasia in epithelial and lichenoid inflammatory infiltrate

Oral lichen planus (OLP) is a potentially malignant lesion and shares clinical and histopathological features with similar lesions. ALDH1 is a specific biomarker in the identification of stem cells, but its role in the stromal cells of the immune inflammatory infiltrate has not been elucidated yet. The aim of this study was to investigate the ALDH1 immunoexpression in epithelial and stromal cells from OLP and other lichenoid lesions. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under protocol nº 5.410.374, CAAE: 52763021.0.0000.5149. An search of the biopsy records of the Oral and Maxillofacial Pathology Laboratory at UFMG in a period of 10 years (2011 - 2021) was performed including the diagnosis of Oral Lichen Planus (OLP), Oral Lichenoid Lesion (OLL), Oral Leukoplakia (OLK) and Unspecific Inflammatory Process (UIP) – as control. Initially were obtained 633 cases. After inclusion and exclusion criteria a total of 64 cases were investigated for the ALDH1 immunohistochemical expression, 16 cases of each diagnose. ALDH1 was evaluated both in the epithelium and in the stromal cells. A percentage of $\leq 5\%$ of ALDH1+ cells was considered positive in the epithelium. The evaluation of stromal cells was performed semi-quantitatively. The fields were classified into scores, according to the following criteria: 1 (0 to 10%); 2 (11 to 50%) and 3 (more than 51%). The mean value of the sum of the fields represented the final score. Statistical differences between groups were investigated and significance was established considering $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the software: SPSS – Statistical Package for the Social Science® (version 26.0, 2019, Chicago, IL, USA). The expression of ALDH1 in the epithelium was low in all groups with no difference between them, although most cases were found in the UIP samples. ALDH1+ cells in the lamina propria was higher for OLP (2.0) than others followed by OLK (1.3), OLL (1.2) and UIP (1.1) ($p < 0.05$). The ALDH1 immunoexpression in the epithelium of lichenoid diseases did not prove to be contributory to show a malignant potential, but ALDH1 in stromal cells from OLP infiltrate might be involved in the complex immune regulation process associated with the pathogenesis of this disease.

Keywords: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Oral Lichen Planus, Leukoplakia, Lichenoid Lesions, Inflammation, Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Diagrama 1 – Esquema do Estudo primário desenvolvido

Figuras contidas no artigo científico:

Figura 1 – Aspectos histopatológicos das lesões. Aumento de 10x na coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) (A, C, E, G). Imunoexpressão do ALDH1 no infiltrado inflamatório subepitelial no aumento de 60x (B, D) e 40x (Polímero- HRP) (F, H). Liquen plano oral corado em H&E (A), no aumento de 60x pode-se observar células estreladas no estroma com vacúolos no citoplasma (seta vermelha) e células redondas (estrela vermelha) (Polímero- HRP) (B). Lesão liquenóide oral corada em H&E (C). Presença de células redondas e vacúolos no citoplasma (estrela vermelha) e células estreladas (seta vermelha) no estroma evidenciadas através de imunohistoquímica - Polímero- HRP (D). Leucoplasia corada em H&E (E). Processo inflamatório inespecífico corado em H&E (G). Tanto a leucoplasia (F), quanto o infiltrado inflamatório inespecífico (H) apresentam células confluentes no epitélio imunomarcadas pelo ALDH1 (Polímero- HRP).

Figura 2 – Comparação da média de células ALDH1+ no infiltrado liquenóide das lesões estudadas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificação do anticorpo primário utilizado.

Tabelas contidas no artigo científico:

Tabela 1 – Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Tabela 2 – Aspectos clínicos-demográficos dos 64 casos das lesões estudadas.

Tabela 3 – Análise morfológicas da marcação celular ALDH1+ em epitélio e lâmina própria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|------------------------------------------|
| AINES | Anti inflamatório não esteroideal |
| ALDH | Aldeído Desidrogenase Humano |
| ALDH1 | Aldehyde Dehydrogenase 1 Family |
| ALDH1+ | Aldehyde Dehydrogenase 1 Family positive |
| APC | Antigen-presenting cells |
| BIS-GMA | Bisfenol-A glicidil metacrilato |
| COX-2 | Cicloxigenase – 2 |
| DC | Dendritic Cell |
| DL | Displasia liqueinoide |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DOPM | Doenças orais potencialmente malignas |
| FOXP3 | Forkhead box protein P3 |
| HCV | Vírus da Hepatite C |
| HEMA | Hidroxietil metacrilato |
| IL-1 | Interleucina - 1 |
| IL-4 | Interleucina - 4 |
| IL-6 | Interleucina - 6 |
| IL-10 | Interleucina - 10 |
| IL-12 | Interleucina - 12 |
| LCO | Leucoplasia |
| LL | Lesão liquenoide |

| | |
|------------|------------------------------------------------|
| LLO | Lesão liquenoide oral |
| LPO | Líquen Plano Oral |
| MTR | Malignant transformation rate |
| OLK | Oral Leukoplakia |
| OLL | Oral Lichenoid Lesion |
| OLP | Oral Lichen Planus |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPMD | Oral Potentially Malignant Disorders |
| OSCC | Oral squamous cell carcinoma |
| PGE2 | Prostaglandina 2 |
| RA | Retinoic acid |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| TGF BETA 1 | Fator de crescimento transformante beta tipo 1 |
| TM | Transformação maligna |
| TTM | Taxa de transformação maligna |
| UCI | Unspecific Chronic Inflammation |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 Desordens Potencialmente Malignas..... | 17 |
| 2.2 Potencial de transformação maligna e o papel da inflamação..... | 20 |
| 2.3 ALDH1 | 22 |
| 2.4 Relação: ALDH1, inflamação e ácido retinoico..... | 24 |
| 3 HIPÓTESES | 27 |
| 4 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 5 OBJETIVOS | 29 |
| 5.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 5.2 Objetivos específicos | 29 |
| 6 METODOLOGIA | 30 |
| 6.1 Considerações éticas..... | 30 |
| 6.2 Recrutamento de casos..... | 30 |
| 6.3 Seleção de casos e obtenção da amostra | 30 |
| 6.4 Reações Imunoistoquímicas..... | 33 |
| 6.5 Avaliação da marcação do ALDH1 | 34 |
| 6.6 Análise estatística | 35 |
| 6.7 Publicação dos resultados..... | 36 |
| 7 RESULTADOS | 44 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 7.1 Artigo científico..... | 44 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 68 |
| REFERÊNCIAS | 69 |

1 INTRODUÇÃO

O termo desordens orais potencialmente malignas compreende um grupo de lesões e condições da mucosa oral associadas a um maior risco de desenvolvimento de câncer na boca e no lábio. O risco de transformação maligna entre estas alterações é muito variável, e um grande desafio no manejo dos pacientes com doenças orais potencialmente malignas (DOPM) é reconhecer aqueles que terão mais chance de desenvolver lesões malignas (WARNAKULASURIYA; KUJAN; AGUIRRE-URIZAR; BAGAN *et al.*, 2020).

Um simpósio sobre DOPM realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou uma revisão sobre estas desordens, com a inclusão de novas entidades (GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019). A leucoplasia oral (LCO) é destacada, além do líquen plano oral (LPO) e da lesão liquenoide oral (LLO) também lesões consideradas como potencialmente malignas (WARNAKULASURIYA; KUJAN; AGUIRRE-URIZAR; BAGAN *et al.*, 2020).

O LPO, LLO e LCO apresentam semelhanças clínicas e histopatológicas (GIULIANI; TROIANO; CORDARO; CORSALINI *et al.*, 2019), exigindo, portanto, bastante critério para a distinção e diagnóstico de cada uma delas (SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019). A OMS, em 1978 propôs critérios para o diagnóstico clínico e histopatológico do LPO e estes critérios foram posteriormente aperfeiçoados (VAN DER MEIJ; SCHEPMAN; VAN DER WAAL, 2003). Nesta proposta, os autores deixam claro que para o diagnóstico de LPO devem ser excluídas quaisquer lesões com evidência de displasia, bem como aquelas em que há uma discordância entre a avaliação clínica e histopatológica. Este critério difere de conceitos anteriores que usavam o termo displasia liquenoide para descrever lesão com características de líquen e exibindo displasia (KRUTCHKOFF; EISENBERG, 1985). Por outro lado, o diagnóstico de LLO abrange outros critérios incluindo a demonstração de um agente causal associado. A American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology fez ainda outras modificações nestes critérios (CHENG; GOULD; KURAGO; FANTASIA *et al.*, 2016). Em comum estas lesões, incluindo por vezes a leucoplasia, apresentam um infiltrado inflamatório subepitelial que tem sido associado à patogenia destas lesões (SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019).

O LPO é uma doença mucocutânea crônica, que pode afetar as superfícies flexoras das extremidades entre outras áreas da pele, assim como as mucosas

(CHENG; KIRTSCHIG; COOPER; THORNHILL *et al.*, 2012). Pode se manifestar clinicamente com o aspecto de estrias brancas entrelaçadas principalmente nas mucosas jugais bilateralmente, sendo chamadas de “Estrias de Wickham”, outras formas clínicas de manifestação são: a erosiva, a reticular e a atrófica (PEKINER; DEMIREL; BORAHAN; OZBAYRAK, 2012). É uma lesão que acomete mais mulheres adultas, de meia idade com a prevalência de 0,1% a 4% na população (ISMAIL; KUMAR; ZAIN, 2007). A LLO se manifesta clinicamente de forma muito semelhante ao LPO nas formas: estriada, reticular, eritematosa, erosiva, vesiculosa e ulcerativa (ISSA; BRUNTON; GLENNY; DUXBURY, 2004). Pode haver sintomas associados como ardências e gosto metálico. O aspecto histopatológico é muito semelhante ao do LPO e o principal fator de diferenciação entre estas lesões é a identificação de um fator causal. Além disso, enquanto as lesões de LPO costumam ser bilaterais e simétricas, as LLO são em geral unilaterais e associadas ao fator causal, podendo regredir quando o mesmo é removido, o que não acontece com o LPO (BOLEWSKA; REIBEL, 1989). A leucoplasia oral pode histologicamente apresentar um infiltrado inflamatório subepitelial semelhante ao do LPO. A presença de displasia e ausência de características específicas como corpos de Civatte permitem a diferenciação entre estas lesões (LIU; WU; SHEN; SHI *et al.*, 2013; MÜLLER, 2018).

A OMS classifica o LPO como uma lesão potencialmente maligna e trabalhos recentes tem apontado que também as LLO apresentam risco de malignização (GEORGAKOPOULOU; ACHTARI; ACHTARIS; FOUKAS *et al.*, 2012; GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019). Na maioria destes trabalhos, a falta de uma padronização nos critérios diagnósticos geram resultados controversos, e a literatura vem apontando que a taxa de transformação maligna (TTM) entre as LLO pode ser maior do que entre os casos de LPO, e que os casos de LPO que contribuem para estas altas taxas, são casos com displasia que no sentido estrito do diagnóstico não deveriam ser incluídas (AGHBARI; ABUSHOUK; ATTIA; ELMARAEZY *et al.*, 2017; PATIL; RAO; SANKETH; WARNAKULASURIYA, 2015).

Vários fatores tem sido apontados como responsáveis pela transformação maligna no LPO e incluem o cigarro, infecção e hepatite C (AGHBARI; ABUSHOUK; ATTIA; ELMARAEZY *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019). Os mecanismos desta indução não são bem entendidos,

entretanto, o desequilíbrio da resposta imune e o processo inflamatório crônico tem papel importante nestes mecanismos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). A inflamação crônica pode proporcionar um microambiente que contribui para a transformação maligna (MIGNOGNA; FEDELE; LO RUSSO; LO MUZIO *et al.*, 2004). No microambiente da inflamação ocorrem alterações locais na produção de citocinas e fatores de crescimento, conseqüentemente, influenciando no comportamento proliferativo e invasivo das células tumorais (PUPA; MÉNARD; FORTI; TAGLIABUE, 2002). Além disso, o estresse oxidativo neste ambiente gerado por macrófagos, células dendríticas, citocinas inflamatórias e quimiocinas, são capazes de produzir radicais potencialmente danosos ao genoma, contornando a função de supressão do tumor p53, influenciando o crescimento, a sobrevivência, a angiogênese e a invasão, aumentando as chances de mutações e cânceres dos tecidos (DE FREITAS FILHO; COUTINHO-CAMILLO; OLIVEIRA; BETTIM *et al.*, 2021; HILDEBRAND; CARVALHO; LAUXEN; NÖR *et al.*, 2014). Dessa forma, lesões como o LPO, a LLO e a LCO caracterizadas histopatologicamente por um persistente infiltrado inflamatório subepitelial podem ter como mecanismo comum na etiopatogênese da transformação maligna a inflamação crônica.

Muitos marcadores biológicos são empregados na avaliação do potencial de malignização. ALDH1 é uma isoforma de aldeído dehidrogenase que é expressa em humanos como uma isoenzima detoxificante que oxida aldeídos intracelulares e é essencial para a oxidação do retinol para ácido retinóico na diferenciação precoce das células tronco, ou seja um biomarcador de oxidação de aldeídos, específico na identificação de células tronco (CHEN; CHEN; HSU; TSENG *et al.*, 2009; WU; LUO; ZHANG; YANG *et al.*, 2013). Além de ter um papel importante no desenvolvimento de tumores e células-tronco cancerígenas sua ação, através do ácido retinoico, pode contribuir para a obesidade, diabetes, inflamação, e controle da resposta imune no intestino e em diferentes tecidos. Esta função ainda não foi avaliada na mucosa oral. (LI; YANG; LIANG; JIANG *et al.*, 2021; OLIVEIRA; TEIXEIRA; SATO, 2018). A avaliação desta proteína em lesões malignas e potencialmente malignas de boca têm sido restrita ao epitélio (OTA; OHNO; SENO; TANIGUCHI *et al.*, 2014). Desta forma é interessante avaliar a expressão do ALDH1 em lesões com potencial de malignidade, tanto pela possível identificação de células tronco tumorais, quanto pela avaliação indireta do papel do potencial de oxidação tecidual, tanto no epitélio quanto no infiltrado inflamatório destas lesões.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desordens potencialmente malignas

Desordens orais potencialmente malignas (DOPM) são um grupo de lesões e condições da mucosa oral associadas a um maior risco de desenvolvimento de câncer na boca e no lábio. O risco de transformação maligna entre estas alterações é muito variável, e um grande desafio no manejo dos pacientes com DOPM é reconhecer aqueles que terão mais chance de desenvolver lesões malignas (WARNAKULASURIYA; KUJAN; AGUIRRE-URIZAR; BAGAN *et al.*, 2020). Recentemente, um simpósio sobre DOPM organizado pela OMS apresentou uma revisão sobre estas desordens, com a inclusão de novas entidades. A leucoplasia oral (LCO) é destacada, além do líquen plano oral (LPO) e da lesão liquenoide (LL) também serem lesões consideradas como potencialmente malignas (GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019).

O LPO acomete mais mulheres, adultas de meia idade com prevalência entre 0,1% e 4%. Apresenta-se clinicamente como: estrias brancas denominadas “estrias de Wickham” (bilateralmente), pápulas, placas, atrofia das mucosas, erosões ou bolhas, sendo os sítios anatômicos mais acometidos: mucosa jugal, língua, gengiva e lábios (ISMAIL; KUMAR; ZAIN, 2007; OLSON; ROGERS; BRUCE, 2016; WANG; LU; TU; GE *et al.*, 2016). Pode ainda ser classificado e agrupado em: reticular, que abrange as formas de pápula e placa; erosivo, que pode se manifestar como uma gengivite descamativa; bolhoso, que apresenta uma forma mais grave (ERTUGRUL; ARSLAN; DURSUN; HAKKI, 2013; OLSON; ROGERS; BRUCE, 2016; PEKINER; DEMIREL; BORAHAN; OZBAYRAK, 2012).

A patogênese do LPO ainda não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que a lesão seja resultado de uma resposta inflamatória a uma reação autoimune (RHODUS; CHENG; MYERS; BOWLES *et al.*, 2005). Existem evidências de que o LPO seja uma consequência do dano autoimune aos queratinócitos basais, os quais apresentam antígenos alterados na sua superfície. Dessa forma, os queratinócitos afetados liberam citocinas e juntamente com o infiltrado inflamatório realizam o recrutamento seletivo de linfócitos T (CHENG; GOULD; KURAGO; FANTASIA *et al.*,

2016; SUGERMAN; SAVAGE; ZHOU; WALSH *et al.*, 2000; THORNHILL, 2001). Estudos sugerem que pode haver diversos fatores que funcionam como gatilhos para o início do LPO, como: os indutores locais e sistêmicos de hipersensibilidade mediada por células, o estresse, a resposta autoimune a antígenos epiteliais e microrganismos (CHENG; GOULD; KURAGO; FANTASIA *et al.*, 2016; WANG; KE; YANG; WANG, 2020).

O diagnóstico definitivo para LPO é realizado através de biópsia incisional confirmando o diagnóstico clínico. O exame histopatológico revela hiperqueratose, com cristas epiteliais com aspecto semelhante a “dentes de serra” (mais comum nas lesões de pele) e presença de um intenso infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos dispostos em faixa subjacente ao epitélio. Há também presença de queratinócitos em degeneração localizados tanto no epitélio quanto na interface do tecido conjuntivo (DENG; XU; WANG; LIU *et al.*, 2020; DIKOVA; PRINCIPE; BAGAN, 2019; FARTHING; CRUCHLEY, 1989; SUGERMAN; SAVAGE; ZHOU; WALSH *et al.*, 2000).

A Lesão liquenoide oral compartilha características clínicas e histopatológicas com o LPO, e de fato alguns autores argumentam que LLO pode ser uma variação do LPO (ISMAIL; KUMAR; ZAIN, 2007) entretanto, a maior distinção entre estas lesões é que as LLO sempre apresentam uma causa subjacente (ISMAIL; KUMAR; ZAIN, 2007). Esta causa está diretamente relacionada a uma reação alérgica a matérias dentários como: amálgamas contendo mercúrio, e também a outros componentes do amálgama como cobre, estanho ou zinco; a resinas contendo HEMA, Bis-GMA, metacrilato; e em ligas de fundição a base de níquel, ouro, paládio, cobalto e cromo (BOMBECCARI; GUZZI; SPADARI; GIANNÌ, 2016; DO PRADO; MAROCCHIO; FELIPINI, 2009; LIND, 1988; LUKÁCS; SCHLIEMANN; ELSNER, 2015; SARODE; SARODE; KALELE, 2012; SARODE; SARODE; TUPKARI, 2012; SCHLOSSER, 2010; THORNHILL; SANKAR; XU; BARRETT *et al.*, 2006) ou até mesmo reação a alguns medicamentos, como os betabloqueadores, dapsona, hipoglicemiantes orais, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), fenotiazinas, sulfonilureias entre outros (RICE; HAMBURGER, 2002).

A patogênese da LLO pode ser explicada como uma reação de hipersensibilidade (PARASHAR, 2011). (BOLEWSKA; REIBEL, 1989) relatam que

essa hipersensibilidade pode ser por contato mediada por células a materiais dentários ou a medicamentos fazendo com que o indivíduo desenvolva LLO. Quando pelo uso de alguns materiais restauradores, os mesmos induzem uma resposta de hipersensibilidade que causam danos imunomediados nos queratinócitos da camada basal (COBOS-FUENTES; MARTÍNEZ-SAHUQUILLO-MÁRQUEZ; GALLARDO-CASTILLO; ARMAS-PADRÓN *et al.*, 2009). A maioria dessas reações são devido à reação de hipersensibilidade do tipo IV/retardada e incluem reação imune mediada por células, principalmente, macrófagos e linfócitos T que foram sensibilizados por antígenos (haptenos) (BOLEWSKA; REIBEL, 1989; SARODE; SARODE; KALELE, 2012). Já o mecanismo exato da patogênese relacionada a drogas sistêmicas ainda é desconhecido, sendo que os testes de contato comprovam que os indivíduos são alérgicos aos componentes ativos dos medicamentos (SARODE; SARODE; KALELE, 2012).

De acordo com autores (AGHA-HOSSEINI; SAMAMI; TAVAKOL; GHASEMZADEH HOSEINI, 2019) as características histológicas da LLO são semelhantes com o LPO, no entanto, se diferem em alguns aspectos. Para que ocorra a remissão da lesão, basta que a causa seja removida (LAINE; KALIMO; FORSELL; HAPPONEN, 1992), podendo sua melhora ser observada após semanas ou meses da interrupção da ingestão de alguns medicamentos (DUDHIA; DUDHIA; PATEL; JANI, 2015; LUKÁCS; SCHLIEMANN; ELSNER, 2015).

Alguns autores definem a Displasia liquenoide (DL) como uma lesão leucoplásica com infiltrado inflamatório liquenoide apresentando uma displasia epitelial, (FITZPATRICK; HONDA; SATTAR; HIRSCH, 2014; WOO, 2019), entretanto, de acordo com a OMS (EL-NAGGAR AK, 2017), este termo não é apropriado e não deve ser utilizado, sendo uma entidade histopatológica diferente do LPO (KRUTCHKOFF; EISENBERG, 1985). (AL-HASHIMI; SCHIFTER; LOCKHART; WRAY *et al.*, 2007) afirmam que DL é um termo usado para descrever um epitélio superficial displásico acompanhado por um infiltrado linfocítico em forma de faixa na lâmina própria subjacente. Entendemos, portanto, que ao usar o termo DL, os autores estão fazendo referência à leucoplasias que apresentam infiltrado inflamatório com características liquenoides.

A distinção entre o LPO e uma leucoplasia com infiltrado liquenoide é através da análise histopatológica observando se há características displásicas no epitélio. A presença de displasia deve excluir o diagnóstico de LPO (PATIL; RAO; SANKETH; WARNAKULASURIYA, 2015) Por outro lado, as demais características de LPO devem estar presentes para que a lesão seja diagnosticada como tal (YAMANAKA; YAMASHITA; INNOCENTINI; MACEDO *et al.*, 2018).

As características displásicas incluem tamanho nuclear aumentado; pleomorfismo nuclear, hipercromasia nuclear, maturação alterada, falta de coesão celular, frequentemente manifestada por edema intercelular acentuado, mitoses aumentadas, entre outras características (KRUTCHKOFF; EISENBERG, 1985).

Dessa forma, o LPO, LLO e LCO apresentam semelhanças clínicas e histopatológicas (GIULIANI; TROIANO; CORDARO; CORSALINI *et al.*, 2019), exigindo, portanto, bastante critério para a distinção e diagnóstico de cada uma delas (SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019).

2.2 Potencial de transformação maligna e o papel da inflamação

A OMS classifica o LPO e a leucoplasia como lesões potencialmente malignas e trabalhos recentes tem apontado que também as LLO apresentam risco de malignização (GEORGAKOPOULOU; ACHTARI; ACHTARIS; FOUKAS *et al.*, 2012; GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019). A inflamação pode ter um papel fundamental nesta transformação maligna, alterando o microambiente com produção de citocinas e radicais livres (PUPA; MÉNARD; FORTI; TAGLIABUE, 2002).

O primeiro relato de transformação maligna de LPO foi realizado em 1910 por HOLLEPEAU (AGHBARI; ABUSHOUK; ATTIA; ELMARAEZY *et al.*, 2017). A partir deste relato, muitos estudos começaram a investigar essa possibilidade de malignização, e sua patogênese (BERMEJO-FENOLL; SÁNCHEZ-SILES; LÓPEZ-JORNET; CAMACHO-ALONSO *et al.*, 2010; CARBONE; ARDUINO; CARROZZO; GANDOLFO *et al.*, 2009). De acordo com a revisão sistemática de (GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019), fatores clínicos e os

hábitos influenciam na malignização, por exemplo: o fumo, consumo de álcool e a exposição ao vírus da hepatite C (HCV), podendo estes causar um efeito oncogênico somativo potencializando o risco de malignização.

O microambiente inflamatório pode ser capaz de iniciar a carcinogênese no epitélio normal por meio de células presentes no infiltrado e citocinas, como o TGF-beta-1, as interleucinas: IL-12, IL-4, IL-10, IL-6, IL-1-beta, as quais participam ativamente no processo de indução, seleção e expansão das células neoplásicas (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; PUPA; MÉNARD; FORTI; TAGLIABUE, 2002). Dessa forma, alguns estudos concluem que o LPO é uma doença inflamatória crônica autoimune, com evidências de que o aumento do risco de transformação maligna (TM) esteja relacionado ao dano ao DNA associado à inflamação, bem como à produção de substâncias capazes de influenciar a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular (MIGNOGNA; FEDELE; LO RUSSO; LO MUZIO *et al.*, 2004).

Recentes estudos relatam que a malignização da LLO pode ocorrer em torno de 1,71% dos casos, sendo seu maior risco em pacientes que possuem a forma erosiva e atrófica da lesão (GONZÁLEZ-MOLES; RUIZ-ÁVILA; GONZÁLEZ-RUIZ; AYÉN *et al.*, 2019). Outros, relacionam a transformação maligna da LLO como um fenômeno de “cancerização de campo” em que os eventos associados poderiam predispor o paciente a um maior risco de neoplasia multifocal na cavidade oral (MIGNOGNA; FEDELE; LO RUSSO; LO MUZIO *et al.*, 2004). Esta transformação maligna da LLO pode estar relacionada a uma resposta inflamatória crônica forte, semelhante a outras doenças inflamatórias associadas ao crescimento maligno (LIU; WU; SHEN; SHI *et al.*, 2013). O aumento de citocinas e fatores de crescimento podem facilitar a carcinogênese oral (SARODE; SARODE; KALELE, 2012). Dessa forma, alguns autores definem a LLO como um distúrbio oral potencialmente maligno (LIU; WU; SHEN; SHI *et al.*, 2013; SARODE; SARODE; TUPKARI, 2012).

Já as leucoplasias com infiltrado inflamatório liquenoide apresentam maior taxa de malignização, em torno de 6,81%, quando comparada com LPO e LLO (SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019). Entretanto, a falta de definição correta das lesões podem levar a TMs que não representem verdadeiramente o potencial maligno destas lesões (AGHBARI; ABUSHOUK; ATTIA; ELMARAEZY *et*

al., 2017). A importância da inflamação como causa da displasia tem sido apontada por alguns autores (SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019).

Estudos sugerem que o infiltrado inflamatório crônico presente em algumas lesões pode ser capaz de influenciar o desenvolvimento de tumores (O'BYRNE; DALGLEISH, 2001), uma vez que as células inflamatórias (macrófagos, células dendríticas etc.) e suas citocinas inflamatórias e quimiocinas são suficientemente capazes de causar danos ao DNA e influenciar diversos processos celulares, como: crescimento, morte, diferenciação, angiogênese, expressão gênica, migração e invasão, presentes tanto em aspectos fisiológicos como processos patológicos, incluindo câncer (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; PUPA; MÉNARD; FORTI; TAGLIABUE, 2002). Dessa forma, há evidências de que o risco de transformação maligna está relacionado ao dano ao DNA associado a inflamação (estresse oxidativo) (MIGNOGNA; FEDELE; LO RUSSO; LO MUZIO *et al.*, 2004).

O infiltrado inflamatório crônico está presente em distúrbios como o LPO, LLO e Leucoplasia podendo ser a principal causa da malignidade dos tecidos, visto que as células inflamatórias e suas citocinas podem ser capazes de propiciar o desenvolvimento de tumores (PUPA; MÉNARD; FORTI; TAGLIABUE, 2002).

2.3 ALDH1

O gene aldeído desidrogenase humano (ALDH) possui 19 isoformas expressas tanto de forma endógena, em tecidos mamíferos como no fígado, rim, cérebro e útero quanto exógena (LI; YANG; LIANG; JIANG *et al.*, 2021) que com base em sua similaridade são divididas em famílias e subfamílias, mas por possuírem diferenças quanto a expressão gênica e a especificidade do substrato desempenham funções semelhantes, mas não idênticas (LI; YANG; LIANG; JIANG *et al.*, 2021; MA; ALLAN, 2011; YANG; MARTINEZ; YASGAR; DANCIK *et al.*, 2018). ALDH1 é uma isoforma predominante da família ALDH localizada no citoplasma de mamíferos (CHEN; ABRAHAM BUSSELL; SHEN; TANG *et al.*, 2016), que se expressa nos humanos como uma isoenzima desintoxicante citosólica que tem como função oxidar aldeídos intracelulares e contribuir com a oxidação do retinol em ácido retinóico na diferenciação precoce de células tronco (HABIBA;

HIDA; KITAMURA; MATSUDA *et al.*, 2017; MARCATO; DEAN; GIACOMANTONIO; LEE, 2011; SHEARSTON; FATEH; TAI; HOVE *et al.*, 2019), sendo que o ácido retinóico e seus derivados geralmente estão envolvidos em processos fisiológicos importantes, incluindo a regulação da expressão gênica, morfogênese e desenvolvimento, e controle da resposta imune (MA; ALLAN, 2011). É um marcador específico para identificação de células tronco neoplásicas cancerosas de cabeça e pescoço (CHEN; CHEN; HSU; TSENG *et al.*, 2009) e desempenha um papel crucial na manutenção das propriedades de auto renovação e tumorigenicidade de células tronco cancerosas (WU; LUO; ZHANG; YANG *et al.*, 2013).

O ALDH1 é uma enzima citosólica essencial na oxidação e atua em vários órgãos (RAO; RAJU K; AUGUSTINE; PATIL, 2020), como no pulmão (KOH; HAN; HAAM; JUNG, 2019), mama (NOZAKI; MOTOMURA; TAMORI; KIMURA *et al.*, 2020), colo de útero (LI; WANG; ZHANG; TU *et al.*, 2019), e ovário (CHANG; LIU; XUE; ROSEN *et al.*, 2009). A superexpressão deste biomarcador está presente em neoplasias, como no pulmão com expressão variando de 52% a 86,6% dos casos de câncer de pulmão (DIMOU; NEUMEISTER; AGARWAL; ANAGNOSTOU *et al.*, 2012; JIANG; QIU; KHANNA; TODD *et al.*, 2009). Há muitos relatos também da expressão do ALDH1 em câncer de mama (PANIGORO; KURNIA; KURNIA; HARYONO *et al.*, 2020) em que dos 54 casos de câncer de mama, 42,9% tiveram expressão do ALDH1, entre outros em que a variação da expressão foi de 21,3% e 59% (KIDA; ISHIKAWA; YAMADA; SHIMADA *et al.*, 2016; OHI; UMEKITA; YOSHIOKA; SOUDA *et al.*, 2011). Outras regiões observadas as expressões do ALDH1 foram no câncer de estômago (LI; XU; FU; LUO, 2014) e em câncer de pâncreas em que dos 97 casos 74% obtiveram marcação, a expressão de ALDH1 em células tumorais tem mostrado resultados desfavoráveis nesses tumores (KAHLERT; BERGMANN; BECK; WELSCH *et al.*, 2011). O marcador de células tronco cancerígenas pode estar correlacionado com a malignidade do tumor assim como com as propriedades de auto renovação das células tronco em diferentes tumores (CHEN; CHEN; HSU; TSENG *et al.*, 2009). Acredita-se que o ALDH1, também, está envolvido nas “últimas etapas da síntese de ácido retinóico podendo inibir a proliferação e as habilidades migratórias das células tumorais, bem como induzir sua diferenciação” de acordo com (BEDNARZ-KNOLL; NASTAŁY; ŻACZEK; STOUPIEC *et al.*, 2015).

Estudos que avaliaram lesões como leucoplasia (HABIBA; HIDA; KITAMURA; MATSUDA *et al.*, 2017) e LPO, observaram uma superexpressão deste biomarcador nas amostras, como foi descrito por (LIU; WU; SHEN; SHI *et al.*, 2013), em que dos 141 casos de leucoplasia, 70% das lesões com transformação maligna obtiveram positividade na expressão do ALDH1. Há estudos que relatam, também, a expressão do ALDH1 em eritroplasias, lesão com alto risco de malignização. (FENG; XU; SHI; WU *et al.*, 2013) relataram que 82% dos pacientes com eritroplasia que sofreram transformação maligna obtiveram marcação pelo ALDH1, sugerindo que este biomarcador pode servir como um marcador preditivo para avaliar o risco de câncer oral em pacientes com lesões orais com potencial de malignidade (HABIBA; HIDA; KITAMURA; MATSUDA *et al.*, 2017; LIU; WU; SHEN; SHI *et al.*, 2013; XU; SHEN; SHI; SUN *et al.*, 2013).

Alguns estudos (RAO; RAJU K; AUGUSTINE; PATIL, 2020) avaliaram a expressão do ALDH1 em displasia epitelial oral e em carcinoma oral de células escamosas (OSCC) e constataram que esta proteína foi expressa em 35% dos casos de displasia e em 70% dos casos de OSCC. Outros trabalhos (ORTIZ; LOPES; AMÔR; PONCE *et al.*, 2018) reportaram que dos 50 casos de OSCC, 46% foram positivos para expressão do marcador, sugerindo que o ALDH1 pode ter um papel na transformação gradual da displasia para o carcinoma, podendo este fenômeno ser atribuído ao papel do marcador na regulação de várias vias que contribuem para a carcinogênese e sinalização de células-tronco. Em todos estes casos a avaliação do ALDH1 foi restrita ao epitélio.

Estes estudos deixam margem ainda para uma avaliação mais metódica da expressão e do papel do ALDH1 em lesões como o LPO, LLO e LCO.

2.4 Relação: ALDH1, inflamação e ácido retinóico

A inflamação envolve tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo e existe para que aja uma resposta imune protetora buscando a homeostase do tecido eliminando, dessa forma, estímulos prejudiciais como células danificadas, irritantes e patógenos (ZHAO; LIU; YANG; LIU *et al.*, 2021). O meio inflamatório e a resposta inflamatória promovem um ambiente de estresse oxidativo em que há peroxidação

lipídica induzindo uma produção de aldeídos tóxicos que podem promover grandes danos celulares (CHEN; CHEN; LU; CHEN, 2018; CHU; NAJAFZADEH; SULLIVAN; CONE *et al.*, 2019). Dessa forma, na tentativa de manter uma homeostase celular, frequentemente, observa-se a proteína Aldeído desidrogenase (ALDH), mais especificamente sua isoforma ALDH1, que regula aldeídos endógenos e exógenos, promovendo uma oxidação irreversível do subproduto retinaldeído em ácido retinóico para promover uma regulação na expressão gênica e diferenciação celular (ALLAN, 2011;CHU; NAJAFZADEH; SULLIVAN; CONE *et al.*, 2019; MA;).

Estudos sugerem que a inflamação intensifica a expressão do ALDH1, (ITO; ZOLFAGHARI; HAO; ROSS, 2014) e sua participação no metabolismo do ácido retinóico tem um papel importante na modulação da resposta imune, atuando principalmente nas células dendríticas e nos macrófagos (MANICASSAMY; PULENDRAN, 2009) havendo, em alguns trabalhos, relatos da presença de CD tanto em epitélio quanto no estroma de LPO, assim como em LLO e LCO (SANTORO; MAJORANA; ROVERSI; GENTILI *et al.*, 2005; SOUTO; MATIAS; NUNES; FERREIRA *et al.*, 2018; SOUTO; NUNES; TANURE; GOMEZ *et al.*, 2016).

Acredita-se que o próprio infiltrado inflamatório crônico presente no LPO promove uma atração das CD por meio de quimiocinas em áreas aglomeradas de linfócitos, indicando a possibilidade de apresentação de autoantígenos (FERRISSE; DE OLIVEIRA; PALAÇON; DA SILVEIRA *et al.*, 2021; GUSTAFSON; EKLUND; WALLSTRÖM; ZELLIN *et al.*, 2007; SANTORO; MAJORANA; ROVERSI; GENTILI *et al.*, 2005). A expressão dessas células apresentadoras de antígeno no estroma das lesões, principalmente no LPO, pode estar ligada a presença do ácido retinóico, uma vez que é produzido por células dendríticas e macrófagos por meio da ação do ALDH1 (SANDERS; MCCARTHY; GILES; DAVIDSON *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que as células dendríticas desempenham um papel na supressão das respostas imunes através da geração de células T reguladoras (Tregs) alterando o equilíbrio Th1/Th2/Th17 (GOVERSE; OLIVIER; MOLENAAR; KNIPPENBERG *et al.*, 2015; MANICASSAMY; PULENDRAN, 2009). Entretanto, as vias e fatores de transcrição através das quais as DCs exercem essa função ainda são pobremente entendidas. Algumas evidências sugerem que a conversão da vitamina A em ácido retinóico (AR) em alguns subtipos específicos de DCs, tem

papel vital na indução de células FOXP3 regulatórias (fator de transcrição necessário para a diferenciação e função normal das tregs)(MANICASSAMY; PULENDRAN, 2009; TRUCCI; SALUM; FIGUEIREDO; CHERUBINI, 2013). A deficiência do AR pode estar associada a várias doenças autoimunes e respostas inflamatórias (MANICASSAMY; PULENDRAN, 2009). Como o AR está envolvido tanto na indução de células Tregs quanto na inibição da diferenciação de células T virgens em células Th17, a hipótese é que o AR desempenha um papel importante no equilíbrio da resposta imune local (ERKELENS; MEBIUS, 2017; FIRTH; FRIEDLANDER; PARACHURU; KARDOS *et al.*, 2015; JAVVADI; PARACHURU; MILNE; SEYMOUR *et al.*, 2016).

3 HIPÓTESES

- A expressão de ALDH1 é diferente nas lesões: LPO, LLO e LCO.
- Células ALDH1 positivas estão presentes no epitélio e na lâmina própria.
- ALDH1 no infiltrado inflamatório do LPO pode ter um papel no controle da resposta imune.

4 JUSTIFICATIVA

A avaliação dos fatores de risco, incluindo biomarcadores indicativos de transformação maligna no líquen plano oral e nas lesões liquenoides tem sido prejudicada pelas inconsistências no diagnóstico diferencial de LPO, LLO e LCO. Este trabalho pretende por meio de uma seleção rigorosa destas lesões, comparar a expressão de um marcador que esperamos que possa ajudar no entendimento da patogênese da transformação maligna, indicando se há diferenças entre as lesões avaliadas. É importante também caracterizar a expressão de ALDH1 nestas lesões no compartimento epitelial e no estroma destas lesões, buscando associar a localização com a função deste marcador.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão imunohistoquímica de ALDH1 em amostras de líquen plano oral, lesão liquenoide e leucoplasias orais.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar a localização mais expressiva na marcação do ALDH1, se epitelial ou no infiltrado inflamatório.
- Avaliar e comparar a morfologia das células marcadas pelo ALDH1 no infiltrado inflamatório.

6 METODOLOGIA

6.1 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o parecer 5.410.374, CAAE: 52763021.0.0000.5149 (ANEXO A), obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 441/11 e nº 466/12 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório e resolução nº 196/96 e 347/05 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

6.2 Recrutamento de casos

Foi realizado um estudo retrospectivo através de uma pesquisa documental e observacional. O levantamento foi referente a todas as biópsias que tiveram o diagnóstico confirmado como líquen plano oral, lesão liquenoide, leucoplasia e processo inflamatório inespecífico no banco de dados do laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no período de 10 anos, compreendendo os anos 2011 a 2021, sendo que as características clínicas também foram levadas em consideração. Foram selecionados inicialmente, no sistema, todos os casos deste período, mas fomos excluindo alguns que não apresentavam todos os dados preenchidos na anamnese. Ao final obtivemos um total de 186 casos de líquen plano oral, 128 de lesão liquenoide oral, 191 de leucoplasias com displasia moderada a intensa e 128 casos de processo inflamatório inespecífico.

6.3 Seleção de casos e obtenção da amostra

A amostra selecionada compreendeu todos os casos de LPO, LCO, LLO e processo inflamatório inespecífico que foram obtidos por meio de biópsias, fixadas e tamponadas em formol, incluídos em parafina, diagnosticadas e arquivadas no

Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG no período de 2011 a 2021. As lâminas histopatológicas foram revisadas de forma independente por três patologistas orais.

- Critérios de inclusão: avaliação histopatológica

1- Líquen Plano Oral (LPO): hiperkeratose ou hiperparakeratose, acantose ou atrofia, com cristas epiteliais hiperplásicas com aspecto sugestivo de “dentes de serra” (mais comum nas lesões de pele) um intenso infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos, em organização semelhante a uma faixa subjacente ao epitélio. Presença de queratinócitos em degeneração na camada basal e/ou suprabasal do epitélio e na interface do tecido conjuntivo, e presença eventual de queratinócitos apoptóticos (Corpos de Civatte). Displasia foi descartada para a confirmação do diagnóstico (CHENG; GOULD; KURAGO; FANTASIA *et al.*, 2016; DENG; XU; WANG; LIU *et al.*, 2020; WARNAKULASURIYA; KUJAN; AGUIRRE-URIZAR; BAGAN *et al.*, 2020).

2- Lesão Liquenoide Oral (LLO): as características histopatológicas similares ao LPO, porém um infiltrado inflamatório misto subepitelial podendo se estender mais profundamente na lâmina própria, ocasionalmente presença de inflamação perivascular. Eosinófilos ocasionais podem ser observados e folículos linfoides podem ser vistos em reações a materiais dentários, (CHENG; GOULD; KURAGO; FANTASIA *et al.*, 2016). Todos esses achados histopatológicos foram conjugados com dados das fichas clínicas deixando claro que a presença de alguma restauração ao redor da lesão ou um histórico de hipersensibilidade a algo.

3- Leucoplasia (LLO) com infiltrado liquenoide: hiperkeratose, acantose e displasia epitelial acompanhadas por um infiltrado linfocítico ou misto disposto em faixa na lâmina própria subjacente. Foram analisadas para a gradação da displasia características arquiteturais como: estratificação irregular, perda da polaridade da camada basal, projeções em gota, aumento do número de figuras de mitose e mitoses anormais superficiais, diskeratose, pérolas de ceratina, e perda da coesão epitelial; bem como características citológicas:

variação anormal do tamanho do núcleo e da célula, variação anormal da forma do núcleo e da célula, aumento da relação núcleo citoplasma, figuras de mitose atípicas, aumento do número e tamanho dos nucléolos, hipercromasia (MÜLLER, 2018). A definição da presença ou ausência de displasia e gradação da mesma foi realizada de forma consensual (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017), bem como a classificação do infiltrado inflamatório na região subepitelial em leve, moderado ou intenso.

4- Processo inflamatório inespecífico: lesões de mucosa que exibiam infiltrado inflamatório crônico focal na lâmina própria, com predomínio de células mononucleares, e para as quais havia sido excluída a possibilidade do diagnóstico de mucosite de interface (REGEZI, J.A *et al.*, 2017).

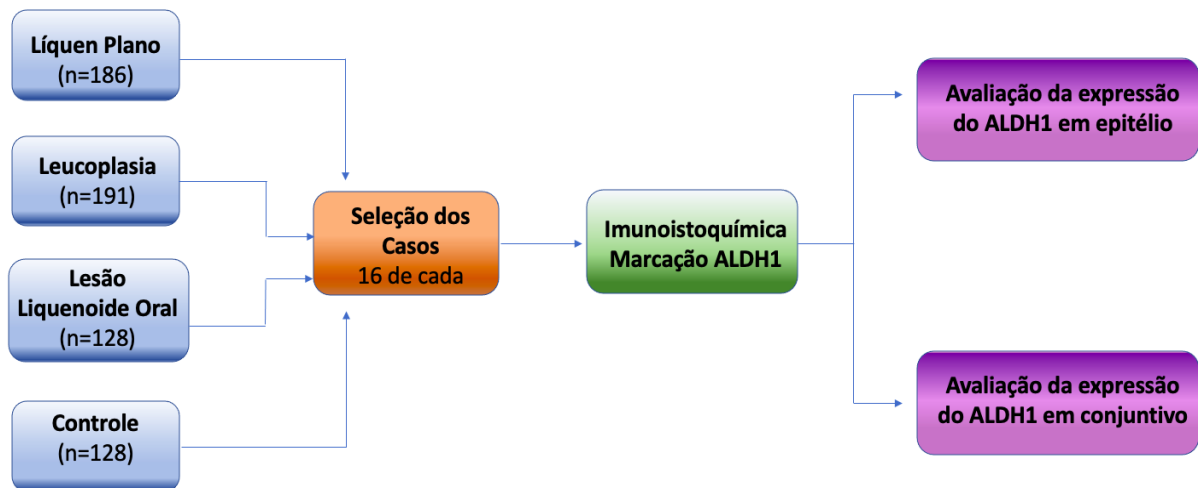
- Critério de exclusão

Foram excluídos do diagnóstico de LPO, conforme preconizado por Shearston *et al.*, (2019):

- 1- Casos com características clínicas e sinais de LLO identificados pela presença do agente causal;
- 2- Qualquer outra lesão potencialmente maligna com presença de displasia;
- 3- Presença concomitante de LPO e câncer ou desenvolvimento de carcinoma nos 6 meses após a primeira consulta.

Foram selecionadas 633 amostras totais de líquen plano, lesão liquenoide, leucoplasia e controle. Todas estas amostras estavam armazenadas em blocos de parafina, tendo sido previamente removidas cirurgicamente com finalidade de diagnóstico ou tratamento, fixadas em formol a 10% e processadas segundo procedimentos de rotina para inclusão em parafina. Após avaliação das lâminas pelos três patologistas foi realizada uma seleção utilizando como base os critérios de inclusão e exclusão, alcançando uma amostra de 16 casos de cada categoria, como podemos ver exemplificado do Diagrama 1.

Diagrama 1: Esquema do estudo primário desenvolvido



Fonte: Próprio autor, 2022.

6.4 Reações Imunoistoquímicas

Cortes com 3µm de espessura das amostras foram obtidos a partir dos blocos de parafina. As etapas de desparafinização, reidratação e recuperação antigênica foram realizadas utilizando a solução Trilogy (Cell Marque, Rocklin, USA), de acordo com as instruções do fabricante (2 banhos de 30 minutos a 98°C). O bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas endógenas foi realizado com a utilização das soluções Hydrogen Peroxide Block (Spring, Bioscience, California, USA) e Protein Block (Spring, Bioscience, California, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Posteriormente os cortes foram lavados em tampão TRIS por cinco minutos.

Para imunomarcagem da proteína ALDH1, os cortes foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti- ALDH1 (clone 44/ALDH, Mouse; BD Bioscience, Califórnia, USA), diluído na proporção de 1:100 em solução tampão TRIS pH 7,4 (Tabela 1). Esta incubação foi realizada durante 60 minutos em temperatura ambiente, em câmara umidificada. Foi utilizado controle interno positivo por meio da

identificação de imunomarcção do parênquima de glândulas salivares e a supressão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

Tabela 1: Especificação do anticorpo primário utilizado

| Anticorpo | Clone | Fabricante | Recuperação antigênica | Diluição |
|------------|---------|----------------------|-------------------------|----------|
| Anti-ALDH1 | 44/ALDH | <i>BD Bioscience</i> | Trilogy (30° a 98°C) | 1:100 |

Fonte: Próprio autor, 2022.

Posteriormente à incubação com o anticorpo primário, foram realizados 3 banhos de tampão TRIS de 5 minutos cada. A revelação foi realizada por meio do kit de revelação com solução de diaminobenzidina (Spring, Bioscience, California, USA). A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Posteriormente, os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol, a partir de uma passagem em etanol 70% durante 2 minutos, uma passagem em etanol 90% durante 5 minutos e três passagens em etanol absoluto, durante 5 minutos cada. Os cortes foram então diafanizados por meio de três banhos de xilol, em temperatura ambiente, de cinco minutos cada. Para a montagem das lâminas foi utilizado Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

6.5 Avaliação da marcação do ALDH1

Todas as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico de luz, marca Zeiss (Lentes: Carl Zeiss 444232-9904), por dois observadores (MDPM e MCFA). A avaliação da imunomarcção foi realizada avaliando as regiões de epitélio e estroma.

Em epitélio a análise imunoistoquímica foi feita de forma semiquantitativa, considerando o percentual de células marcadas e o padrão de marcação: células isoladas ou células confluentes (ISFOSS; BUSCH; HERMELIN; VERMEDAL *et al.*, 2014) em um aumento de 200x. Foram considerados positivos os casos com 5% ou mais de células marcadas (DE FREITAS FILHO; COUTINHO-CAMILLO; OLIVEIRA;

BETTIM *et al.*, 2021; HILDEBRAND; CARVALHO; LAUXEN; NÖR *et al.*, 2014; ISFOSS; BUSCH; HERMELIN; VERMEDAL *et al.*, 2014).

A avaliação da expressão do ALDH1 no estroma foi realizada de forma semiquantitativa semelhante ao que foi realizado por Berdnarz-Knool *et al.* (2015), com algumas modificações, uma vez que não foi observado alteração quanto à intensidade da marcação. Inicialmente foi feita a avaliação da lâmina em toda a sua extensão, em aumento de 100x buscando a área de maior marcação, considerada o *hot spot*. Tendo essa área como referência, a determinação do percentual de células marcadas, foi feita em aumento de 400x em todos os campos, que foram contados ao longo de um único eixo (x ou y) delimitado pela área de *hot spot*. Em todas as lesões este eixo correspondeu ao eixo horizontal, em geral acompanhando a distribuição do infiltrado inflamatório. O número de campos variou entre 5 e 23, com uma média de 10,53 campos.

O primeiro e último campo foram excluídos e cada campo recebeu um escore para a avaliação da porcentagem de marcação celular, de acordo com o seguinte critério: 1 (0 – 10%); 2 (11 a 50%); 3 (acima de 51%), sendo o score final a média destes escores.

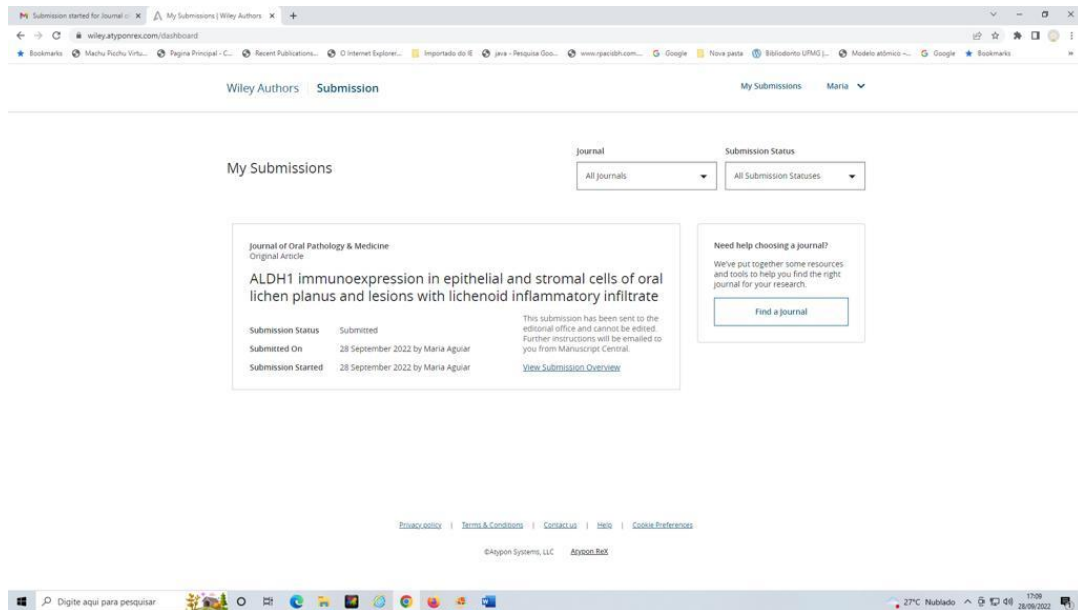
6.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software: SPSS – Statistical Package for the Social Science® (versão 26.0, 2019, Chicago, IL, USA). Os dados obtidos no estudo foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição da amostra ($n > 50$). Foi realizada a análise descritiva das variáveis, apresentando as frequências e medidas de tendência central dos dados.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar a imunoexpressão de ALDH1 entre os grupos, e os níveis de significância foram ajustados com correção de Bonferroni. Para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ como parâmetro de nível de significância.

6.7 Publicação dos resultados

Ao final da pesquisa, os resultados foram divulgados à comunidade científica, independentemente de serem inéditos ou contrariarem as hipóteses propostas no estudo. O trabalho foi submetido no periódico: *Journal of Oral Pathology & Medicine* (Qualis A2 / Fator de impacto: 3.539 em 2021).



- **Normas de publicação da revista**

OBJETIVOS E ESCOPO

O *Journal of Oral Pathology & Medicine* publica manuscritos de alta qualidade científica que representam trabalhos clínicos, diagnósticos ou experimentais originais em patologia oral e medicina oral. A revista geralmente não considera artigos sobre periodontal ou doenças relacionadas. Artigos que promovam a ciência ou prática dessas disciplinas serão bem-vindos, especialmente aqueles que trazem novos conhecimentos e observações da aplicação de técnicas nas esferas de microscopia de luz e eletrônica, cultura de tecidos e órgãos, imunologia, histoquímica, imunocitoquímica e biologia molecular.

Os artigos de revisão sobre assuntos atuais e relevantes receberão alta prioridade e os artigos que exigem publicação rápida devido ao seu significado e pontualidade serão incluídos como breves relatórios não superiores a três páginas impressas.

Todos os manuscritos enviados que se enquadram no escopo geral da Revista serão avaliados por revisores devidamente qualificados, mas os manuscritos em um formato incorreto serão devolvidos ao autor sem revisão.

CATEGORIAS E REQUISITOS DO MANUSCRITO

i. Artigos de Pesquisa Originais

Journal of Oral Pathology & Medicine recebe Artigos de Pesquisa Originais de alta qualidade científica que representam trabalhos clínicos, diagnósticos ou experimentais originais em patologia oral e medicina oral. Artigos que promovam a ciência ou prática dessas disciplinas serão bem-vindos, especialmente aqueles que trazem novos conhecimentos e observações da aplicação de técnicas nas esferas de microscopia de luz e eletrônica, cultura de tecidos e órgãos, imunologia, histoquímica, imunocitoquímica e biologia molecular.

Limite de palavras: 3.000 palavras no máximo, excluindo resumo e referências.

Resumo: 250 palavras no máximo; deve ser estruturado, sob os subtítulos: Fundo, Métodos, Resultados, Conclusão. Não deve conter abreviaturas.

Referências: Máximo de 30 referências.

Figuras/Tabelas: Total de não mais do que 6 figuras e/ou tabelas.

Estrutura Principal do Texto: deve ser dividida em introdução, material e métodos, resultados e discussão:

- **Introdução:** deve indicar claramente o propósito do artigo. Dê apenas referências estritamente pertinentes. Revisões exaustivas da literatura são inadequadas.

- **Materiais e Métodos:** devem conter detalhes suficientes para que, em combinação com as referências citadas, todos os ensaios clínicos e experimentos relatados possam ser totalmente reproduzidos. Como condição de publicação, os autores são obrigados a disponibilizar livremente os materiais e métodos usados para pesquisadores acadêmicos para seu próprio uso. Isso pode, por exemplo, incluir anticorpos etc. Outros conjuntos de dados de suporte devem ser disponibilizados diretamente dos autores na data de publicação.

Consulte a seção Políticas Editoriais e Considerações Éticas para obter os requisitos relacionados a Ensaios Clínicos, Sujeitos Experimentais e Fornecedores.

- **Resultados:** Apresente seus resultados em sequência lógica no texto, tabelas e ilustrações. Não repita no texto todos os dados nas tabelas, ilustrações ou ambos: enfatize ou resuma apenas observações importantes.
- **Discussão:** Enfatize os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que se seguem deles. Não repita os dados detalhados fornecidos na seção Resultados. Inclua na Discussão as implicações das descobertas e suas limitações e relacione as observações a outros estudos relevantes.

PREPARANDO O ENVIO

Cartas de apresentação

As cartas de apresentação não são obrigatórias; no entanto, elas podem ser fornecidas a critério do autor.

Partes do Manuscrito

O manuscrito deve ser enviado em arquivos separados: arquivo de texto principal; figuras.

Arquivo de Texto Principal

Os manuscritos podem ser carregados como um único documento (contendo o texto principal, tabelas e figuras) ou com figuras e tabelas fornecidas como arquivos separados. Se o seu manuscrito chegar ao estágio de revisão, figuras e tabelas devem ser fornecidas como arquivos separados. O arquivo manuscrito principal pode ser enviado no formato Microsoft Word (.doc ou .docx).

O arquivo de texto deve ser apresentado na seguinte ordem:

Seu arquivo de documento principal deve incluir:

1. Um pequeno título informativo contendo as principais palavras-chave. O título não deve conter abreviaturas
2. Os nomes completos dos autores com afiliações institucionais onde o trabalho foi conduzido, com uma nota de rodapé para o endereço atual do autor, se diferente de onde o trabalho foi realizado;
3. Agradecimentos;
4. Abstrato estruturado (intro/métodos/resultados/conclusão) ou não estruturado
5. Até sete palavras-chave;
6. Corpo principal: formatado como introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão
7. Referências;
8. Tabelas (cada tabela completa com título e notas de rodapé);
9. Figuras: As legendas da figura devem ser adicionadas abaixo de cada imagem individual durante o upload E como uma lista completa no texto.

Autoria

Consulte a política de autoria da revista, a **seção Políticas Editoriais e Considerações Éticas**, para obter detalhes sobre a elegibilidade para a listagem de autores.

Agradecimentos

As contribuições de qualquer pessoa que não atenda aos critérios de autoria devem ser listadas, com permissão do colaborador, em uma seção de Agradecimentos. O apoio financeiro e material também deve ser mencionado. Graças a revisores anônimos não são apropriados.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores serão solicitados a fornecer uma declaração de conflito de interesses durante o processo de envio. Para obter detalhes sobre o que incluir nesta seção, consulte a seção 'Conflito de Interesse' na **seção Políticas Editoriais e Considerações Éticas** abaixo. Os autores de envio devem garantir que eles entrem em contato com todos os coautores para confirmar o acordo com a declaração final.

Resumo

Resumos e palavras-chave são necessários para alguns tipos de manuscritos. Para obter detalhes sobre tipos de manuscritos que exigem resumos, consulte a seção 'Tipos e Critérios de Manuscrito'.

Palavras-chave

Forneça 2-5 palavras-chave. Os autores são incentivados a escolher palavras-chave das recomendadas pela lista de navegadores Medical Subject Headings (MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA em **www.nlm.nih.gov/mesh**.

Referências

Todas as referências devem ser numeradas consecutivamente em ordem de aparência e devem ser o mais completas possível. No texto, as citações devem citar

referências em ordem consecutiva usando algarismos em árabe. Para mais informações sobre o estilo de referência AMA, consulte o **Manual de Estilo AMA**

Tabelas

As tabelas devem ser independentes e complementar, não duplicadas, as informações contidas no texto. Eles devem ser fornecidos como arquivos editáveis, não colados como imagens. As lendas devem ser concisas, mas abrangentes - a tabela, a legenda e as notas de rodapé devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Todas as abreviaturas devem ser definidas nas notas de rodapé. Símbolos de nota de rodapé: †, ‡, §, ¶, devem ser usados (naquela ordem) e *, **, *** devem ser reservados para valores P. Medidas estatísticas como SD ou SEM devem ser identificadas nos títulos.

Figuras e legendas

As legendas devem ser concisas, mas abrangentes - a figura e sua legenda devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Inclua definições de quaisquer símbolos usados e defina/explice todas as abreviaturas e unidades de medida.

Figuras

Embora os autores sejam incentivados a enviar os números da mais alta qualidade possível, para fins de revisão por pares, uma ampla variedade de formatos, tamanhos e resoluções são aceitos.

Clique aqui para ver os requisitos básicos de figuras para figuras enviadas com manuscritos para revisão inicial por pares, bem como os requisitos mais detalhados de figuras pós-aceitação.

Figuras Coloridas. Os números enviados em cores podem ser reproduzidos em cores on-line gratuitamente. Observe, no entanto, que é preferível que as figuras de

linha (por exemplo, gráficos e gráficos) sejam fornecidas em preto e branco para que sejam legíveis se impressas por um leitor em preto e branco.

Citação de Dados

[Revise a política de citação de dados de Wiley aqui.](#)

Arquivos Adicionais

Apêndices

Os apêndices serão publicados após as referências. Para envio, eles devem ser fornecidos como arquivos separados, mas mencionados no texto.

Informações de Apoio

Informações de apoio são informações que não são essenciais para o artigo, mas fornecem maior profundidade e histórico. Ele é hospedado on-line e aparece sem edição ou composição. Pode incluir tabelas, figuras, vídeos, conjuntos de dados, etc.

[Clique aqui](#) para obter as perguntas frequentes de Wiley sobre informações de suporte.

Nota: se dados, scripts ou outros artefatos usados para gerar as análises apresentadas no artigo estiverem disponíveis através de um repositório de dados disponível publicamente, os autores devem incluir uma referência à localização do material em seu artigo.

Pontos de Estilo Gerais

Os pontos a seguir fornecem conselhos gerais sobre formatação e estilo.

- **Abreviaturas:** Em geral, os termos não devem ser abreviados, a menos que sejam usados repetidamente e a abreviação seja útil para o leitor. Inicialmente, use a palavra na íntegra, seguida pela abreviação entre parênteses. Depois disso, use apenas a abreviação. Use apenas abreviações padrão. Útil é Baren DN, ed. Unidades, símbolos e abreviaturas. Um guia para editores e autores biológicos e médicos. 4. ed. Londres: Sociedade Real de Medicina.
- **Unidades de medida:** As medições devem ser dadas em unidades derivadas de SI ou SI. Visite o [site](#) do Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) para obter mais informações sobre as unidades SI.
- Não use algarismos romanos no texto.
- Em decimais, um ponto decimal, e não uma vírgula, será usado.

7 RESULTADOS

Os resultados foram escritos em língua inglesa na forma de artigo científico.

7.1 Artigo científico

Artigo submetido ao periódico internacional: *Oral Pathology & Medicine* (Qualis A2 / Fator de impacto: 3.539 em 2021) encontra-se aguardando a resposta dos revisores.

TITLE: ALDH1 immunoexpression in epithelial and stromal cells of oral lichen planus and lesions with lichenoid inflammatory infiltrate

AUTHORS: Michelle Danielle Porto Matias¹ | Daniela Pereira Meirelles¹ | Martinho Campolina Rebello Horta² | Karine Duarte da Silva¹ | Patrícia Carlos Caldeira¹ | Maria Cássia Ferreira de Aguiar¹

INSTITUTIONAL AFFILIATION:

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

² Department of Dentistry, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

EMAIL ADDRESS:

Michelle Danielle Porto Matias: midanielle_307@hotmail.com

Daniela Pereira Meirelles: danielapmeirelles@yahoo.com.br

Martinho Campolina Rebello Horta: martinhohorta@pucminas.br

Karine Duarte da Silva: karineduardedasilva1@gmail.com

Patrícia Carlos Caldeira: pat_caldeira@yahoo.com.br

Maria Cássia Ferreira de Aguiar: cassiafa@ufmg.br

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Conception and design: Michelle Danielle Porto Matias, Daniela Pereira Meirelles, Martinho Campolina Rebello Horta, Karine Duarte da Silva, Patrícia Carlos Caldeira, Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Data collection: Michelle Danielle Porto Matias, Daniela Pereira Meirelles, Karine Duarte da Silva, Patrícia Carlos Caldeira, Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Data analysis: Michelle Danielle Porto Matias, Daniela Pereira Meirelles, Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Drafted the manuscript: Michelle Danielle Porto Matias, Daniela Pereira Meirelles, Karine Duarte da Silva, Patrícia Carlos Caldeira, Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Reviewed the manuscript for intellectual content: Karine Duarte da Silva, Patrícia Carlos Caldeira, Maria Cássia Ferreira de Aguiar

FUNDING:

This work was supported by Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Financial Code 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest.

MEETINGS:

An abstract was presented at the “47^a Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral” held in Tiradentes, Brazil, July 2022, annals to be published at TripleO.

CORRESPONDENCE:

Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas.

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. CEP: 31.270-901

Telephone number: +55 31 3409-2476 Fax number: +55 31 3409-2430

E-mail: cassiafa@ufmg.br

ABSTRACT:

Background: Oral Lichen Planus is a potential malignant disorder and shares clinical and histopathological features with other similar lesions. ALDH1 is a specific biomarker for stem cells identification, however its role in stromal cells of immune inflammatory infiltrate has not been explored. The aim of this study was to investigate the ALDH1 immunoexpression in epithelial and stromal cells of Oral Lichen Planus and other lesions with lichenoid inflammatory infiltrate. **Methods:** 64 samples of Oral Lichen Planus, Oral Lichenoid Lesions, Oral Leukoplakia and Unspecific Chronic Inflammation were included. ALDH1 was evaluated in both epithelium and stromal cells. ALDH1+ cells $\geq 5\%$ were considered positive in epithelium. Stromal cells were evaluated semiquantitatively. Fields were ranked in scores, according to criteria: 1 (0 to 10%); 2 (11 to 50%) and 3 (>50%). The mean value of the sum of the fields was the final score. Statistical differences among groups were investigated, considering $p < 0.05$. **Results:** ALDH1 expression in epithelium was low in all groups without difference among them. ALDH1+ cells in the lamina propria were higher for Lichen Planus (2.0), followed by Leukoplakia (1.3), Lichenoid lesions (1.2) and control (1.1) ($p < 0.05$). **Conclusions:** ALDH1 immunoexpression in epithelium of lichenoid potential malignant disorders did not show a contributory tool, however ALDH1 in stromal cells of lichen planus might be involved in the complex process of immune regulation associated with the pathogenesis of this disease.

KEYWORDS:

Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Oral Lichen Planus, Leukoplakia, Lichenoid Lesions, Immunohistochemistry

1. INTRODUCTION

Oral Potentially Malignant Disorders (OPMD) comprise a large and diverse group of mucosal disorders that can precede the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. Different OPMD carry on variable malignant transformation rates and identifying which individual will develop cancer can be a challenge.¹

The World Health Organization (WHO) considers Oral Lichen Planus (OLP) as an OPMD, however, the rate of malignant transformation varies considerably among patients and studies.² More, previous reports suggest that the malignant transformation rate of Oral Lichenoid Lesions (OLL) may be higher than OLP.^{3, 4} Strict criteria should be followed when diagnosing OLP, as it can present overlapping clinical and histopathologic features with Oral Lichenoid Lesion and Oral Leukoplakia (OLK) with a lichenoid component, among other lesions. A proposed diagnosis criteria of OLP exclude any lesion with dysplasia.^{5, 6} The term Oral Lichenoid Lesions is preferred for lesions with a definable underlying etiology, as drug reaction.⁷ OLK can present a band-like chronic inflammatory infiltrate in the superficial lamina propria, mimicking OLP. As a mild dysplasia can occur also as a result of inflammation, the distinction between lesions is not easy, however, the criteria mentioned above help to distinguish them.⁵

The exact mechanisms by which OLP and OLLs undergoes malignant transformation have not yet been determined, it is though that chronic immune stimulation and inflammation can cause growth signal dysregulation and this combines with oxidative stress to induce DNA damage.^{8, 9}

Many biological markers have been employed to elucidate the malignant potential of OLP.^{10, 11} ALDH1 is an isoform of dehydrogenase aldehyde expressed in humans as a cytosolic detoxifying isozyme. ALDH1 oxidizes retinol to retinoic acid, which, in turn, promotes the transcription of genes that participate in cell differentiation,

apoptosis, or even tumor growth being a specific biomarker for stem cells' identification.^{12, 13} In addition, retinoic acid has an important role in the control of immune inflammatory diseases.^{14, 15} The immunohistochemical evaluation of ALDH1

in OPMD has been restricted to epithelium acting as a marker of cancer stem cell,¹⁶ meanwhile its potential in the inflammatory infiltrate has not been investigated. Further, the role of ALDH1 has not been explored in OLP and other lichenoid lesions. This study aimed to investigate ALDH1 expression in the epithelial and stromal cells of OLP, OLL and OLK. This study is an attempt to unravel the biology behind ALDH1 expression in epithelial and stromal cells of OLP and other lichenoid lesions.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Ethics

This study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (process no. 52763021.0.0000.5149), and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, revised in 2008.

2.2 Case selection and sample

This cross-sectional study followed the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines. Cases with a histopathological diagnosis of OLP, OLL, and OLK were retrieved from the files of the Oral Maxillofacial Pathology Service (UFMG- Brazil) from 2011-2021. The eligibility criteria are presented in Table 1. All cases were independently reviewed by three oral pathologists (MCFA, PCC, KDS. Only cases filling the clinical and histopathological criteria^{4, 5, 17} and having a concordant diagnosis of at least two examiners were included.

Were selected for the study 16 OLP, 16 OLL, and 16 OLK, totalizing 48 cases. Sixteen cases diagnosed as Unspecific Chronic Inflammation (UCI) were included as controls. Those cases were featured by a mixed diffuse inflammatory infiltrate extending deeply into the lamina propria. Cases histologically diagnosed as lichenoid mucositis were excluded.

2.3 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 4- μ m thick sections, following standard protocols on silanized slides. The antigen retrieval was performed with TRILOGY™ Concentrate (Cell Marque, Rocklin, CA, US; 1:100) in pressure cooker 96°C for 30 min. Monoclonal anti-ALDH1 was used (clone 44 ALDH; Mouse; BD Bioscience, California, CA, US; 1:00). Next, the sections were incubated with a ready-to-use polymer (CRF Anti-Polyvalent HRP Polymer, ScyTek Laboratories, Logan, UT, USA,

code ABZ125). 3,3'-Diaminobenzidine was used as the chromogen (Dako, Carpinteria, CA, US) and counterstained with hematoxylin.

2.4 Immunohistochemical assessment

A two-step immunohistochemical analysis was set: a morphological and a quantitative, of the epithelium and stromal cells. For epithelium and stroma, cells exhibiting a brown staining in cytoplasm and cytoplasmic membrane were considered positive, regardless the intensity.

All slides were scanned in low power (100x) to determine the positive areas. Then, the ALDH1+ areas were evaluated in a higher magnification (400x) to determine the staining pattern (confluents and isolated cells for epithelium) and the cell morphology (spindle or round for stromal cells).

A detailed descriptive analysis was jointly performed by three examiners (MCFA, DPM, MDPM) at a Penta Head Light Microscope (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss). A semiquantitative analysis was made considering epithelium and stromal cells. All epithelium extension was evaluated and epithelium was considered positive when 5% or more cells were stained at a hotspot area in a 200x magnification. Positive cases were classified as isolated or confluent ALDH1 in a 400x magnification.^{12, 13}

The stromal cells evaluation was made in semiquantitative form according to Bednarz *et al.* (2015),¹⁸ however the staining intensity was not considered. All fields at a horizontal axis, immediately bellow epithelium in the lichenoid infiltrate where positive cells were concentrated, were evaluated at high power (400x) by two jointly examiners (DPM and MDPM). Fields were ranked in scores, depending on the percentage of positive cells, according to criteria: 1 (0 to 10%); 2 (11 to 50%) and 3 (more than 51%). The final score of each case was the mean value of the sum of the fields.

2.5 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the software SPSS – Statistical Package for the Social Sciences® (IBM – version 26.0, 2019, Chicago, IL, USA).

The epidemiological and clinical-pathological variables were analyzed descriptively. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify the normality distribution of ALDH1 expression in the sample. Kruskal-Wallis test was applied to compare ALDH1 immunoexpression among groups, and the significance levels were adjusted with Bonferroni correction. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Sample selection

A total of 633 lesions diagnosed as OLP, OLL OLK and UCI were retrieved from histopathological records from 2011 to 2021. After applying the clinical and histopathological eligibility criteria, were selected 16 lesions each group of diagnose, totalizing 64 cases. Demographic (sex, age), smoking habit and clinical (fundamental lesion and anatomical location) characteristics are shown in Table 2.

3.2 Morphological analysis

The morphological analysis of the ALDH1+ cells is shown in Table 3.

The epithelial expression was not frequent among samples, with only 1 (6,25%), 0 (0%), 2 (12,4%), 5 (31,2%) cases from OLP, LLO, LKO and UCI, respectively, showing ALDH1+ cells. When present, these cells were confluent, following the epithelial architecture, or isolated cells (Figure 1F; 1H).

In the lamina propria, ALDH1+ cells were dispersed along the subepithelial inflammatory infiltrate. All cases from OLP group and almost all from OLL and OLK (12 and 13, respectively) were ALDH1 positive in the lamina propria. Most of these cells showed a stellated morphology with a namely angular or spindle-shaped cell body and cytoplasmatic extensions (Figure 1B; 1D). Some cells also showed amounts of small vacuoles in the cytoplasm (Figure 1B;1D). Round or oval cells positive for ALDH1 were observed as well (Figure 1B; 1D). These were leukocyte-like cells with round nucleus and a granular cytoplasm. Isolated cells in the deeper inflammatory infiltrate were sporadically seen.

3.3. Semiquantitative analysis

The median expression of ALDH1+ cells in the lamina propria was higher for OLP (2.0), followed by OLK (1.3), OLL (1.2) and UCI (1.1) ($p < 0.05$), as shown in Figure 2.

4. DISCUSSION

This study aimed to investigate the ALDH1 immunoexpression in a group of lesions presenting a lichenoid inflammatory infiltrate, considering the malignant potential of those lesions,¹ and ALDH1 as a marker of cancer stem cells. Additionally, it was also of interest to investigate the role of ALDH1 in the immune-inflammatory infiltrate of OLP.

The malignant potential of OLP has been explored in several studies with controversial results and variable index of transformation.¹⁹ On the other hand, it is recognized that other non-dysplastic lichenoid lesions may undergo malignant transformation.^{4, 20, 21} ALDH1 is expressed in malignant epithelial cells and oral dysplasia.²² However, our results showed a low expression of ALDH1 in epithelial cells of all group of lesions, with a slight higher expression in UCI cases. These results, differ from others,²³ did not give an indication of malignant potential for the lesions investigated here. Although we had a meticulous criterion to select the lesions, and all OLK cases presented dysplasia, a confirmation of this result requires an investigation of a more numerous samples.

ALDH1 is an isoform of aldehyde dehydrogenase, which is expressed in humans as a cytosolic detoxifying isoenzyme that oxidizes intracellular aldehydes and contributes to the oxidation of retinol to retinoic acid in early stem cell's differentiation. These properties make ALDH1 a marker of cancer stem cells playing an important role in the biology of tumors.¹² However the role of ALDH1 in regulation of immune response throughout the control of metabolism of retinol, has not been explored, in especial in oral diseases. In a similar way, the strong association of ALDH1 with cancer stem cells has making the evaluation of this proteins almost restrict to the epithelial cells. Few studies have explored the expression of ALDH1 in stromal cells.^{18, 24} Our results showed an increased number of positive ALDH1 cells in the subepithelial lichenoid inflammatory infiltrate of all lesions. The higher number of positive cells was found in OLP, with a significative difference with the other lesions.

Interestingly, the stromal ALDH1+ cells showed different phenotypes. Most of these cells showed a stellated morphology with a namely angular or spindle-shaped cell body and cytoplasmic extensions, some of them also showed amounts of small vacuoles in the cytoplasm. Round or oval leukocyte-like cells with round nucleus and a granular cytoplasm in a small number were also present, and isolated cells in the deeper inflammatory infiltrate were sporadically seen. It was not an objective of this study an immunophenotyping of these stromal cells, however call attention the number of them, especially in OLP lesions.

The presence of these phenotypes to ALDH1+ cells were registered in other studies,^{18, 24} which have been associated with a better prognosis or simply considered as stem cells.²⁵ In the present study, we presume that the positive stromal cells are antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells.

OLP arises from an autoimmune response involving T cells producing cytokines that induce a chronic inflammatory response and keratinocytes cell death.¹⁹ Activation of T cells depends on antigen presentation by APCs in the context of MHCII receptors. Dendritic cells, a kind of APC control the strength and quality of T and B cell response and are present in both epithelium and lichenoid infiltrate of OLP.²⁶

Authors demonstrated the presence of retinol in the cytoplasm of ALDH1 + stromal cells.²⁷ Studies also showed that the metabolism of retinol into retinoic acid in DCs mediated by ALDH1 regulate critical parameters of lymphocyte differentiation.¹⁴ Moreover, RA enhances the induction of Treg FOXP3 cells by Dcs.^{14, 15}

Studies have demonstrated elevated numbers of Foxp3+Treg cells in OLP lesions compared to healthy control tissues.^{28, 29} If the ALDH1+ cells detected in inflammatory infiltrate of OLP are dendritic cells controlling the lymphocytic differentiation throughout ALDH1, this finding might be a key to understanding the complex immune balance in OLP and an indicative for development of new therapies.

Although this significant suggestion, the present study has several limitations, and the first is the absence of characterization of ALDH1+ stromal cells. However, it is not probable that the difference among the lesions was occasional and we believe that is

associated with the different role of ALDH1+ cells in the unspecific or immune mediated inflammatory infiltrate. New studies are need to prove our supposition.

5. CONCLUSIONS

ALDH1 immunoexpression in the epithelium of OLP and lichenoid diseases did not help understanding the different potential for malignant transformation of these lesions. On the other hand, the ALDH1-positive stromal cells of OLP might play an important role in the pathogenesis of this disorder.

REFERENCES

1. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles M, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2020.
2. Ramos-García P, González-Moles M, Warnakulasuriya S. Oral cancer development in lichen planus and related conditions-3.0 evidence level: A systematic review of systematic reviews. *Oral Dis.* 2021;27(8):1919-35.
3. Giuliani M, Troiano G, Cordaro M, Corsalini M, Gioco G, Lo Muzio L, et al. Rate of malignant transformation of oral lichen planus: A systematic review. *Oral Dis.* 2019;25(3):693-709.
4. Shearston K, Fateh B, Tai S, Hove D, Farah CS. Oral lichenoid dysplasia and not oral lichen planus undergoes malignant transformation at high rates. *J Oral Pathol Med.* 2019;48(7):538-45.
5. Cheng YS, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(3):332-54.
6. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(2):164-71.
7. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, Wray D, Brennan M, Migliorati CA, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103 Suppl:S25.e1-12.
8. Georgakopoulou EA, Ahtari MD, Ahtaris M, Foukas PG, Kotsinas A. Oral lichen planus as a preneoplastic inflammatory model. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:759626.
9. Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio L, Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence ? *Oral Oncol.* 2004;40(2):120-30.
10. Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, et al. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(6):650-69.

11. Tampa M, Caruntu C, Mitran M, Mitran C, Sarbu I, Rusu LC, et al. Markers of Oral Lichen Planus Malignant Transformation. *Dis Markers*. 2018;2018:1959506.
12. de Freitas Filho SAJ, Coutinho-Camillo CM, Oliveira KK, Bettim BB, Pinto CAL, Kowalski LP, et al. Prognostic Implications of ALDH1 and Notch1 in Different Subtypes of Oral Cancer. *J Oncol*. 2021;2021:6663720.
13. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CT, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(7):499-506.
14. Manicassamy S, Pulendran B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol*. 2009;21(1):22-7.
15. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007;317(5835):256-60.
16. Ota N, Ohno J, Seno K, Taniguchi K, Ozeki S. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014;44(2):435-42.
17. Lodolo M, Gobbo M, Bussani R, Torelli L, Rupel K, Ottaviani G, et al. Histopathology of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: An exploratory cross-sectional study. *Oral Dis*. 2021.
18. Bednarz-Knoll N, Nastaly P, Żaczek A, Stoupiec MG, Riethdorf S, Wikman H, et al. Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression. *Oncotarget*. 2015;6(29):26789-803.
19. González-Moles M, Ruiz-Ávila I, González-Ruiz L, Ayén Á, Gil-Montoya JA, Ramos-García P. Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncol*. 2019;96:121-30.
20. Goodson ML, Sloan P, Robinson CM, Cocks K, Thomson PJ. Oral precursor lesions and malignant transformation--who, where, what, and when? *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015;53(9):831-5.
21. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol*. 2007;43(8):742-8.
22. Marangon Junior H, Melo VVM, Caixeta Â, Souto GR, Souza PEA, de Aguiar MCF, et al. Immunolocalization of Cancer Stem Cells Marker ALDH1 and its Association with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2019;13(4):535-42.

23. Dhumal SN, Choudhari SK, Patankar S, Ghule SS, Jadhav YB, Masne S. Cancer Stem Cell Markers, CD44 and ALDH1, for Assessment of Cancer Risk in OPMDs and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2022;16(2):453-65.
24. Isfoss BL, Busch C, Hermelin H, Vermedal AT, Kile M, Braathen GJ, et al. Stem cell marker-positive stellate cells and mast cells are reduced in benign-appearing bladder tissue in patients with urothelial carcinoma. *Virchows Arch.* 2014;464(4):473-88.
25. Farias ZBBM, Silva LPD, de Arruda, Cavalcante JS, Almeida HCR, Oliveira MCV, et al. ALDH1 expression and potential clinical implications in chronic inflammatory periapical lesions. *Braz Oral Res.* 2022;36:e019.
26. Solhaug MB, Schreurs O, Schenck K, Blix IJ, Baekkevold ES. Origin of langerin (CD207)-expressing antigen presenting cells in the normal oral mucosa and in oral lichen planus lesions. *Eur J Oral Sci.* 2022;130(1):e12835.
27. Oliveira LM, Teixeira FME, Sato MN. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:3067126.
28. Javvadi LR, Parachuru VP, Milne TJ, Seymour GJ, Rich AM. Regulatory T-cells and IL17A(+) cells infiltrate oral lichen planus lesions. *Pathology.* 2016;48(6):564-73.
29. Firth FA, Friedlander LT, Parachuru VP, Kardos TB, Seymour GJ, Rich AM. Regulation of immune cells in oral lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(4):333-9.

Table 1: Eligibility criteria of study

| Diagnosis | OLP^{† a,b} | OLL^{‡ a,c} | OLK^{§ a} |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Inclusion Histopathological Criteria | Hyperparakeratosis, Hyperorthokeratosis, and combinations of the two; cytoid (Civatte) bodies; basal cell hydropic change; and a band-like chiefly lymphocytic infiltrate in the lamina propria (all features must be present to diagnosis) ^a | Lichenoid inflammation not characteristic of OLP with a mixed inflammatory infiltrate consisting of eosinophils and plasma cells occasionally extending deep the lamina propria. ^c | Hyperkeratosis, acanthosis and epithelial dysplasia conjugate with a on a background of OLP or with an associated mixed lichenoid Infiltrate. ^a |
| Inclusion Clinical Criteria | Multiple oral lesions | Unique lesion with evidence of a specific causative agent (e.g., hypersensitivity reaction or proven drug reaction) ^b | Multiple or unique lesion not associated with a causative agent. |
| Exclusion Criteria | - Patients with clinical and histopathological signs of OLL initiated by an identifiable cause such as a hypersensitivity reaction to mechanical irritation. | | |

- Patient with other potentially malignant disorders or that exhibited biopsy proven dysplasia.

- Patient with a diagnosis of OLP concomitant with oral squamous cells carcinoma^b

OLP[†]: Oral Lichen Planus; OLL[‡]: Oral Lichenoid Lesions; OLK[§]: Oral Leucoplakia

^aCheng et al. (2016)

^bShearston et al. (2019)

^cLodolo et al. (2021)

Table 2: Clinical and demographical data of the 64 included cases

| Variables | OLP[†] | OLL[‡] | OLK[§] | UCI[¶] |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Sex | | | | |
| Female | 10 (62.5) | 15 (93.7) | 10 (62.5) | 6 (37.5) |
| Male | 6 (37.5) | 1 (6.2) | 6 (37.5) | 10 (62.5) |
| Ratio | 1.7:1 | 15:1 | 1.7:1 | 0.6:1 |
| Age (years) | | | | |
| Mean±SD | 54.1±3.9 | 56.69±2.5 | 60.4±3.1 | 45.4±4.7 |
| Fundamental Lesion | | | | |
| Plaque | 12 (75.0) | 15 (93.8) | 11(68.8) | 4 (25) |
| Ulcer | 2 (13.3) | 1 (6.3) | 5(31.3) | 8 (50) |
| Nodule | 0 | 0 | 0 | 4 (25) |
| Not Informed | 2 (13.3) | 0 | 0 | 0 |
| Anatomical location | | | | |
| Buccal Mucosa | 14 (87.5) | 8 (50) | 2(12.5) | 0 |
| Tongue | 1 (6.3) | 6 (37.5) | 8(50.0) | 7 (43.8) |
| Alveolar ridge/ gingiva | 0 | 1 (6.3) | 3(18.8) | 4 (25.0) |
| Lips | 1 (6.3) | 0 | 2(12.5) | 2 (12.5) |
| Other [□] | 0 | 1(6.3) | 1(6.3) | 3 (18.8) |
| Smoking habit | | | | |
| Yes | 3 (18.7) | 1 (6.3) | 3 (18.7) | 3 (18.7) |
| No | 11 (68.8) | 14 (87.4) | 13 (81.3) | 13(81.3) |

| | | | | |
|--------------|----------|---------|---|---|
| Not Informed | 2 (12.5) | 1 (6.3) | 0 | 0 |
|--------------|----------|---------|---|---|

OLP[†]: Oral Lichen Planus; OLL[‡]: Oral Lichenoid Lesions; OLK[§]: Oral Leucoplakia;
UCI[¶]: Unspecific Chronic Inflammation (Control); Other[⊖]: palate or floor of the mouth.

Table 3: Morphological analysis of ALDH1+ cells in Epithelium and Lamina Propria

| Lesion | Epithelium | | Lamina Propria | |
|-----------------------------|------------------|----------------|-----------------|-------------|
| | Confluents cells | Isolated cells | Stellated cells | Round cells |
| | N (%) # | N (%) # | N (%) # | N (%) # |
| OLP [†] (16 cases) | 0 | 1 (6.25) | 16 (100.0) | 10 (62.5) |
| OLL [‡] (16 cases) | 0 | 0 | 10 (62.5) | 2 (12.5) |
| OLK [§] (16 cases) | 1 (6.2) | 1 (6.2) | 9 (56.2) | 4 (25.0) |
| UCI [¶] (16 cases) | 3 (18.7) | 2 (12.5) | 4 (25.0) | 1 (6.25) |

OLP[†]: Oral Lichen Planus; OLL[‡]: Oral Lichenoid Lesions; OLK[§]: Oral Leucoplakia; UCI[¶]: Unspecific Chronic Inflammation (Control); N (%)#: number of positives cases

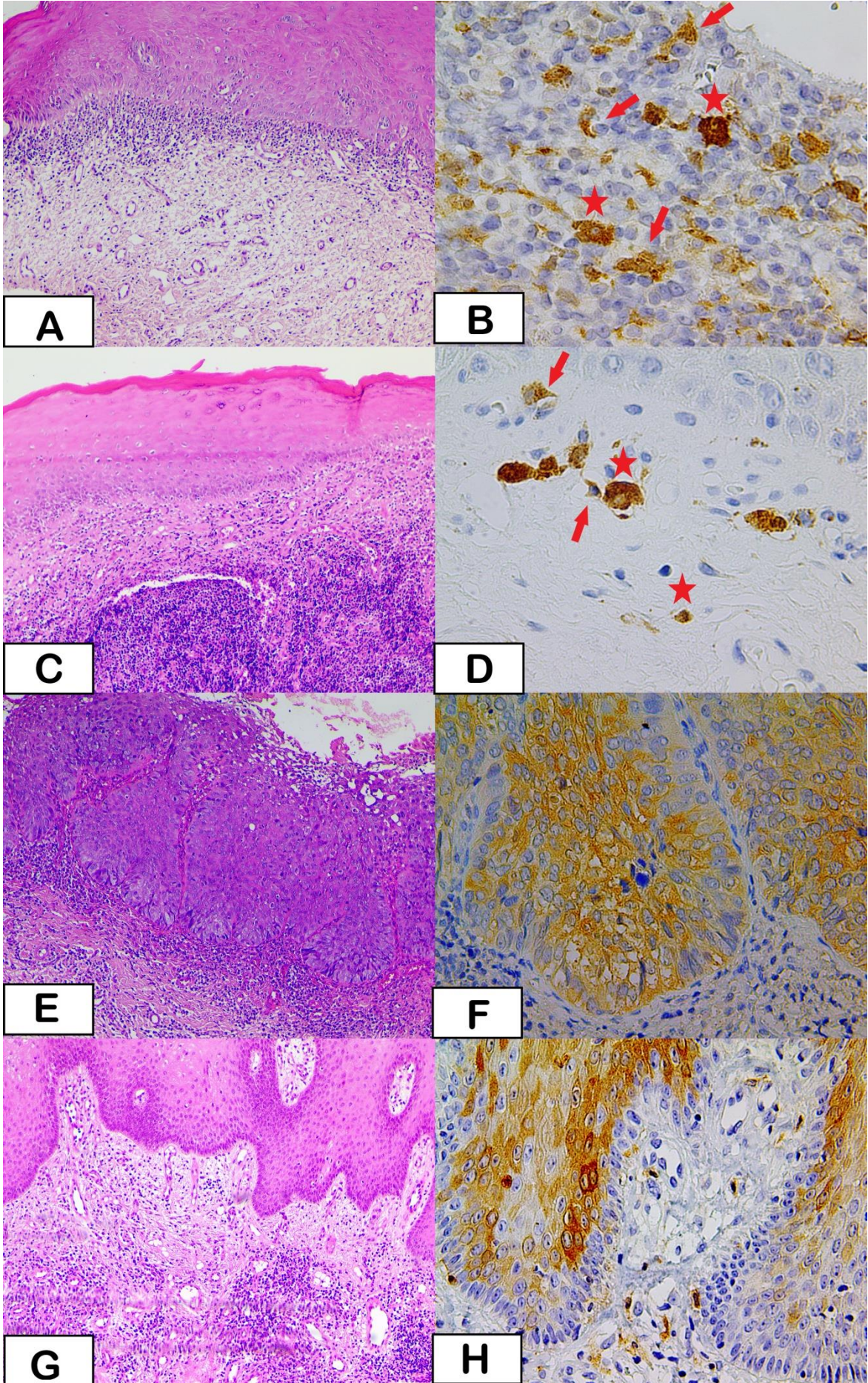


Figure 1: Histopathological and immunohistochemical aspects of lesions. Hematoxylin and Eosin (H&E) stain 100x (A,C,E,G). ALDH1 immunoexpression in the subepithelial inflammatory infiltrate 600x (B,D) and 400x, Polymer-HRP (F,H). Oral Lichen Planus in H&E stains (A), can evidence stellated cells with small vacuums in the cytoplasm (red arrow) and round cells (red star), Polymer-HRP 600x (B). Oral Lichenoid Lesion in H&E stain (C). ALDH1+ rounded cells in lichenoid infiltrate (red star) and stellated cells with small vacuums in the cytoplasm (red arrow), Polymer-HRP (D). Oral Leukoplakia in H&E stains (E). Unspecific Chronic inflammation stained in H&E (G). Both Oral Leukoplakia (F) and Unspecific Chronic Infiltrate (H) present confluent ALDH1+ cells in epithelium. Polymer-HRP (400x).

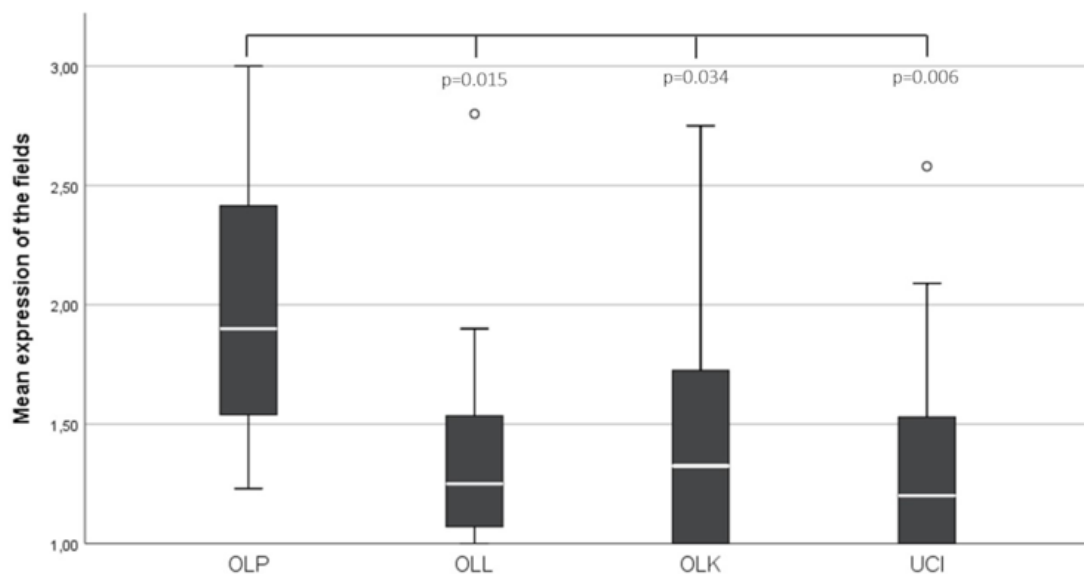


Figure 2: Median expression of ALDH1 in stromal cells of OLL, OLK and UCI in relation to OLP

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão do marcador ALDH1 em Líquen Plano Oral, Leucoplasia e a lesão liquenoide. Casos de Processo Inflamatório Inespecífico foram incluídos como controle. O ALDH1 é um bom marcador de células tronco tumorais, assim esperávamos encontrar a expressão do mesmo no epitélio destas lesões que são consideradas DOPM, ainda que com taxas muito variáveis de transformação maligna. No entanto, a expressão de ALDH1 no epitélio não foi significativa, com poucos casos positivos e um padrão predominante representado por células confluentes nos casos de processos inflamatórios inespecíficos. Já nas células do infiltrado inflamatório liquenoide, especialmente no LPO houve um número aumentado de células positivas para ALDH1 quando comparado com as demais lesões. As células ALDH1+ no estroma exibiam morfologia fusiformes/estreladas e/ou redondas/ovais. A morfologia e a positividade para ALDH1 sugerem que estas células representem células dentríticas. Nós hipotetizamos que a positividade para ALDH1 no infiltrado inflamatório possa estar associado com o papel do ácido retinoico, a partir da ação oxidante do ALDH1, no controle da resposta imune. A não identificação das células ALDH1+ do infiltrado inflamatório representa um limite neste trabalho, entretanto, a continuidade deste estudo pode representar um aspecto chave na compreensão da patogênese do LPO e no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para esta doença.

REFERÊNCIAS

AGHA-HOSSEINI, F.; SAMAMI, M.; TAVAKOL, F.; GHASEMZADEH HOSEINI, E. Oral Lichen Planus or Oral Lichenoid Reaction? A Literature Review. **JIDAI**, 31, n. 1, p. 40-57, 2019.

AGHBARI, S. M. H.; ABUSHOUK, A. I.; ATTIA, A.; ELMARAEZY, A. *et al.* Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. **Oral Oncol**, 68, p. 92-102, 05 2017.

AL-HASHIMI, I.; SCHIFTER, M.; LOCKHART, P. B.; WRAY, D. *et al.* Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 103 Suppl, p. S25.e21-12, Mar 2007.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, 357, n. 9255, p. 539-545, Feb 2001.

BEDNARZ-KNOLL, N.; NASTAŁY, P.; ŻACZEK, A.; STOUPIEC, M. G. *et al.* Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression. **Oncotarget**, 6, n. 29, p. 26789-26803, Sep 29 2015.

BERMEJO-FENOLL, A.; SÁNCHEZ-SILES, M.; LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F. *et al.* A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. **J Oral Pathol Med**, 39, n. 6, p. 491-496, Jul 2010.

BOLEWSKA, J.; REIBEL, J. T lymphocytes, Langerhans cells and HLA-DR expression on keratinocytes in oral lesions associated with amalgam restorations. **J Oral Pathol Med**, 18, n. 9, p. 525-528, Oct 1989.

BOMBECCARI, G. P.; GUZZI, G.; SPADARI, F.; GIANNÌ, A. B. Diagnosis of metal allergy and management of oral lichenoid reactions. **J Oral Pathol Med**, 45, n. 3, p. 237-238, Mar 2016.

CARBONE, M.; ARDUINO, P. G.; CARROZZO, M.; GANDOLFO, S. *et al.* Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. **Oral Dis**, 15, n. 3, p. 235-243, Apr 2009.

CARROZZO, M.; PORTER, S.; MERCADANTE, V.; FEDELE, S. Oral lichen planus: A disease or a spectrum of tissue reactions? Types, causes, diagnostic algorithms, prognosis, management strategies. **Periodontol 2000**, 80, n. 1, p. 105-125, 06 2019.

CHANG, B.; LIU, G.; XUE, F.; ROSEN, D. G. *et al.* ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. **Mod Pathol**, 22, n. 6, p. 817-823, Jun 2009.

CHEN, M. F.; CHEN, P. T.; LU, M. S.; CHEN, W. C. Role of ALDH1 in the prognosis of esophageal cancer and its relationship with tumor microenvironment. **Mol Carcinog**, 57, n. 1, p. 78-88, Jan 2018.

CHEN, Y.; ABRAHAM BUSSELL, S.; SHEN, Z.; TANG, Z. *et al.* Declining Inconsistent Condom Use but Increasing HIV and Syphilis Prevalence Among Older Male Clients of Female Sex Workers: Analysis From Sentinel Surveillance Sites (2010-2015), Guangxi, China. **Medicine (Baltimore)**, 95, n. 22, p. e3726, May 2016.

CHEN, Y. C.; CHEN, Y. W.; HSU, H. S.; TSENG, L. M. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 385, n. 3, p. 307-313, Jul 2009.

CHENG, S.; KIRTSCHIG, G.; COOPER, S.; THORNHILL, M. *et al.* Interventions for erosive lichen planus affecting mucosal sites. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD008092, Feb 2012.

CHENG, Y. S.; GOULD, A.; KURAGO, Z.; FANTASIA, J. *et al.* Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 122, n. 3, p. 332-354, Sep 2016.

CHU, A.; NAJAFZADEH, P.; SULLIVAN, P.; CONE, B. *et al.* Aldehyde dehydrogenase isoforms and inflammatory cell populations are differentially expressed in term human placentas affected by intrauterine growth restriction. **Placenta**, 81, p. 9-17, 06 2019.

COBOS-FUENTES, M. J.; MARTÍNEZ-SAHUQUILLO-MÁRQUEZ, A.; GALLARDO-CASTILLO, I.; ARMAS-PADRÓN, J. R. *et al.* Oral lichenoid lesions related to contact with dental materials: a literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 14, n. 10, p. e514-520, Oct 2009.

DE FREITAS FILHO, S. A. J.; COUTINHO-CAMILLO, C. M.; OLIVEIRA, K. K.; BETTIM, B. B. *et al.* Prognostic Implications of ALDH1 and Notch1 in Different Subtypes of Oral Cancer. **J Oncol**, 2021, p. 6663720, 2021.

DENG, S.; XU, Y.; WANG, X.; LIU, M. *et al.* Study on the Role of Salivary Flora and NF- κ B Inflammatory Signal Pathway in Oral Lichen Planus. **Inflammation**, Feb 2020.

DIKOVA, V. R.; PRINCIPE, S.; BAGAN, J. V. Salivary inflammatory proteins in patients with oral potentially malignant disorders. **J Clin Exp Dent**, 11, n. 7, p. e659-e664, Jul 2019.

DIMOU, A.; NEUMEISTER, V.; AGARWAL, S.; ANAGNOSTOU, V. *et al.* Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. **Am J Pathol**, 181, n. 4, p. 1436-1442, Oct 2012.

DO PRADO, R. F.; MAROCCHIO, L. S.; FELIPINI, R. C. Oral lichen planus versus oral lichenoid reaction: difficulties in the diagnosis. **Indian J Dent Res**, 20, n. 3, p. 361-364, 2009 Jul-Sep 2009.

DUDHIA, B. B.; DUDHIA, S. B.; PATEL, P. S.; JANI, Y. V. Oral lichen planus to oral lichenoid lesions: Evolution or revolution. **J Oral Maxillofac Pathol**, 19, n. 3, p. 364-370, 2015 Sep-Dec 2015.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th ed. Lyon: IARC, 2017. 347 p. (WHO Classification of Tumours. 9283224388.

EL-NAGGAR AK, C. J., GRANDIS JR, TAKATA T, SLOOTWEG PJ. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 9 ed. 2017.

ERKELENS, M. N.; MEBIUS, R. E. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. **Trends Immunol**, 38, n. 3, p. 168-180, 03 2017.

ERTUGRUL, A. S.; ARSLAN, U.; DURSUN, R.; HAKKI, S. S. Periodontopathogen profile of healthy and oral lichen planus patients with gingivitis or periodontitis. **Int J Oral Sci**, 5, n. 2, p. 92-97, Jun 2013.

FARTHING, P. M.; CRUCHLEY, A. T. Expression of MHC class II antigens (HLA DR, DP and DQ) by keratinocytes in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, 18, n. 5, p. 305-309, May 1989.

FENG, J. Q.; XU, Z. Y.; SHI, L. J.; WU, L. *et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 in oral erythroplakia and the risk of oral cancer. **J Oral Pathol Med**, 42, n. 2, p. 148-153, Feb 2013.

FERRISSE, T. M.; DE OLIVEIRA, A. B.; PALAÇON, M. P.; DA SILVEIRA, H. A. *et al.* Immunohistochemical evaluation of Langerhans cells in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. **Arch Oral Biol**, 124, p. 105027, Apr 2021.

FIRTH, F. A.; FRIEDLANDER, L. T.; PARACHURU, V. P.; KARDOS, T. B. *et al.* Regulation of immune cells in oral lichen planus. **Arch Dermatol Res**, 307, n. 4, p. 333-339, May 2015.

FITZPATRICK, S. G.; HONDA, K. S.; SATTAR, A.; HIRSCH, S. A. Histologic lichenoid features in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 117, n. 4, p. 511-520, Apr 2014.

GEORGAKOPOULOU, E. A.; ACHTARI, M. D.; ACHTARIS, M.; FOUKAS, P. G. *et al.* Oral lichen planus as a preneoplastic inflammatory model. **J Biomed Biotechnol**, 2012, p. 759626, 2012.

GIULIANI, M.; TROIANO, G.; CORDARO, M.; CORSALINI, M. *et al.* Rate of malignant transformation of oral lichen planus: A systematic review. **Oral Dis**, 25, n. 3, p. 693-709, Apr 2019.

GONZÁLEZ-MOLES, M.; RUIZ-ÁVILA, I.; GONZÁLEZ-RUIZ, L.; AYÉN, Á. *et al.* Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. **Oral Oncol**, 96, p. 121-130, 09 2019.

GOVERSE, G.; OLIVIER, B. J.; MOLENAAR, R.; KNIPPENBERG, M. *et al.* Vitamin A metabolism and mucosal immune function are distinct between BALB/c and C57BL/6 mice. **Eur J Immunol**, 45, n. 1, p. 89-100, Jan 2015.

GUSTAFSON, J.; EKLUND, C.; WALLSTRÖM, M.; ZELLIN, G. *et al.* Langerin-expressing and CD83-expressing cells in oral lichen planus lesions. **Acta Odontol Scand**, 65, n. 3, p. 156-161, Jun 2007.

HABIBA, U.; HIDA, K.; KITAMURA, T.; MATSUDA, A. Y. *et al.* ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. **Oncol Lett**, 13, n. 1, p. 321-328, Jan 2017.

HILDEBRAND, L. C.; CARVALHO, A. L.; LAUXEN, I. S.; NÖR, J. E. *et al.* Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, 43, n. 7, p. 499-506, Aug 2014.

ISFOSS, B. L.; BUSCH, C.; HERMELIN, H.; VERMEDAL, A. T. *et al.* Stem cell marker-positive stellate cells and mast cells are reduced in benign-appearing bladder tissue in patients with urothelial carcinoma. **Virchows Arch**, 464, n. 4, p. 473-488, Apr 2014.

ISMAIL, S. B.; KUMAR, S. K.; ZAIN, R. B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. **J Oral Sci**, 49, n. 2, p. 89-106, Jun 2007.

ISSA, Y.; BRUNTON, P. A.; GLENNY, A. M.; DUXBURY, A. J. Healing of oral lichenoid lesions after replacing amalgam restorations: a systematic review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 98, n. 5, p. 553-565, Nov 2004.

ITO, K.; ZOLFAGHARI, R.; HAO, L.; ROSS, A. C. Inflammation rapidly modulates the expression of ALDH1A1 (RALDH1) and vimentin in the liver and hepatic macrophages of rats in vivo. **Nutr Metab (Lond)**, 11, p. 54, 2014.

JAVVADI, L. R.; PARACHURU, V. P.; MILNE, T. J.; SEYMOUR, G. J. *et al.* Regulatory T-cells and IL17A(+) cells infiltrate oral lichen planus lesions. **Pathology**, 48, n. 6, p. 564-573, Oct 2016.

JIANG, F.; QIU, Q.; KHANNA, A.; TODD, N. W. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. **Mol Cancer Res**, 7, n. 3, p. 330-338, Mar 2009.

KAHLERT, C.; BERGMANN, F.; BECK, J.; WELSCH, T. *et al.* Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. **BMC Cancer**, 11, p. 275, Jun 2011.

KIDA, K.; ISHIKAWA, T.; YAMADA, A.; SHIMADA, K. *et al.* Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. **Breast Cancer Res Treat**, 156, n. 2, p. 261-269, Apr 2016.

KOH, Y. W.; HAN, J. H.; HAAM, S.; JUNG, J. ALDH1 expression correlates with an epithelial-like phenotype and favorable prognosis in lung adenocarcinoma: a study based on immunohistochemistry and mRNA expression data. **J Cancer Res Clin Oncol**, 145, n. 6, p. 1427-1436, Jun 2019.

KRUTCHKOFF, D. J.; EISENBERG, E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 60, n. 3, p. 308-315, Sep 1985.

LAINE, J.; KALIMO, K.; FORSSELL, H.; HAPPONEN, R. P. Resolution of oral lichenoid lesions after replacement of amalgam restorations in patients allergic to mercury compounds. **Br J Dermatol**, 126, n. 1, p. 10-15, Jan 1992.

LI, B.; YANG, K.; LIANG, D.; JIANG, C. *et al.* Discovery and development of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) inhibitors. **Eur J Med Chem**, 209, p. 112940, Jan 01 2021.

LI, X. S.; XU, Q.; FU, X. Y.; LUO, W. S. ALDH1A1 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer. **BMC Cancer**, 14, p. 705, Sep 2014.

LI, Y.; WANG, K.; ZHANG, B.; TU, Q. *et al.* Salivary mycobiome dysbiosis and its potential impact on bacteriome shifts and host immunity in oral lichen planus. **Int J Oral Sci**, 11, n. 2, p. 13, 07 2019.

LIND, P. O. Oral lichenoid reactions related to composite restorations. Preliminary report. **Acta Odontol Scand**, 46, n. 1, p. 63-65, Feb 1988.

LIU, W.; WU, L.; SHEN, X. M.; SHI, L. J. *et al.* Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. **Int J Cancer**, 132, n. 4, p. 868-874, Feb 2013.

LUKÁCS, J.; SCHLIEMANN, S.; ELSNER, P. Lichen planus and lichenoid reactions as a systemic disease. **Clin Dermatol**, 33, n. 5, p. 512-519, 2015 Sep-Oct 2015.

MA, I.; ALLAN, A. L. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. **Stem Cell Rev Rep**, 7, n. 2, p. 292-306, Jun 2011.

MANICASSAMY, S.; PULENDRAN, B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. **Semin Immunol**, 21, n. 1, p. 22-27, Feb 2009.

MARCATO, P.; DEAN, C. A.; GIACOMANTONIO, C. A.; LEE, P. W. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. **Cell Cycle**, 10, n. 9, p. 1378-1384, May 2011.

MIGNOGNA, M. D.; FEDELE, S.; LO RUSSO, L.; LO MUZIO, L. *et al.* Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence ? **Oral Oncol**, 40, n. 2, p. 120-130, Feb 2004.

MÜLLER, S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 591-602, 06 2018.

NOZAKI, Y.; MOTOMURA, H.; TAMORI, S.; KIMURA, Y. *et al.* High PKC λ expression is required for ALDH1-positive cancer stem cell function and indicates a poor clinical outcome in late-stage breast cancer patients. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0235747, 2020.

O'BYRNE, K. J.; DALGLEISH, A. G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **Br J Cancer**, 85, n. 4, p. 473-483, Aug 2001.

OHI, Y.; UMEKITA, Y.; YOSHIOKA, T.; SOUDA, M. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. **Histopathology**, 59, n. 4, p. 776-780, Oct 2011.

OLIVEIRA, L. M.; TEIXEIRA, F. M. E.; SATO, M. N. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. **Mediators Inflamm**, 2018, p. 3067126, 2018.

OLSON, M. A.; ROGERS, R. S.; BRUCE, A. J. Oral lichen planus. **Clin Dermatol**, 34, n. 4, p. 495-504, 2016 Jul-Aug 2016.

ORTIZ, R. C.; LOPES, N. M.; AMÔR, N. G.; PONCE, J. B. *et al.* CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, 47, n. 8, p. 740-747, Sep 2018.

OTA, N.; OHNO, J.; SENO, K.; TANIGUCHI, K. *et al.* In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, 44, n. 2, p. 435-442, Feb 2014.

PANIGORO, S. S.; KURNIA, D.; KURNIA, A.; HARYONO, S. J. *et al.* ALDH1 Cancer Stem Cell Marker as a Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer. **Int J Surg Oncol**, 2020, p. 7863243, 2020.

PARASHAR, P. Oral lichen planus. **Otolaryngol Clin North Am**, 44, n. 1, p. 89-107, vi, Feb 2011.

PATIL, S.; RAO, R. S.; SANKETH, D. S.; WARNAKULASURIYA, S. Lichenoid dysplasia revisited - evidence from a review of Indian archives. **J Oral Pathol Med**, 44, n. 7, p. 507-514, Aug 2015.

PEKINER, F. N.; DEMIREL, G. Y.; BORAHAN, M. O.; OZBAYRAK, S. Cytokine profiles in serum of patients with oral lichen planus. **Cytokine**, 60, n. 3, p. 701-706, Dec 2012.

PUPA, S. M.; MÉNARD, S.; FORTI, S.; TAGLIABUE, E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **J Cell Physiol**, 192, n. 3, p. 259-267, Sep 2002.

RAO, R. S.; RAJU K, L.; AUGUSTINE, D.; PATIL, S. Prognostic Significance of ALDH1, Bmi1, and OCT4 Expression in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Control**, 27, n. 1, p. 1073274820904959, 2020 Jan-Dec 2020.

RHODUS, N. L.; CHENG, B.; MYERS, S.; BOWLES, W. *et al.* A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. **Clin Immunol**, 114, n. 3, p. 278-283, Mar 2005.

RICE, P. J.; HAMBURGER, J. Oral lichenoid drug eruptions: their recognition and management. **Dent Update**, 29, n. 9, p. 442-447, Nov 2002.

SANDERS, T. J.; MCCARTHY, N. E.; GILES, E. M.; DAVIDSON, K. L. *et al.* Increased production of retinoic acid by intestinal macrophages contributes to their inflammatory phenotype in patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, 146, n. 5, p. 1278-1288.e1271-1272, May 2014.

SANTORO, A.; MAJORANA, A.; ROVERSI, L.; GENTILI, F. *et al.* Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. **J Pathol**, 205, n. 4, p. 426-434, Mar 2005.

SARODE, S.; SARODE, G.; KALELE, K. Oral Lichenoid Reaction: A Review. **Int J Oral Maxillofac Pathol**, 3, p. 17-26, 04/01 2012.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; TUPKARI, J. V. Oral potentially malignant disorders: precisising the definition. **Oral Oncol**, 48, n. 9, p. 759-760, Sep 2012.

SCHLOSSER, B. J. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. **Dermatol Ther**, 23, n. 3, p. 251-267, 2010 May-Jun 2010.

SHEARSTON, K.; FATEH, B.; TAI, S.; HOVE, D. *et al.* Oral lichenoid dysplasia and not oral lichen planus undergoes malignant transformation at high rates. **J Oral Pathol Med**, 48, n. 7, p. 538-545, Aug 2019.

SOUTO, G. R.; MATIAS, M. D. P.; NUNES, L. F. M.; FERREIRA, R. C. *et al.* Mature dendritic cell density is affected by smoking habit, lesion size, and epithelial dysplasia in oral leukoplakia samples. **Arch Oral Biol**, 95, p. 51-57, Nov 2018.

SOUTO, G. R.; NUNES, L. F.; TANURE, B. B.; GOMEZ, R. S. *et al.* CD1a+ dendritic cells in oral lichen planus and amalgam lichenoid reaction. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 121, n. 6, p. 651-656, Jun 2016.

SUGERMAN, P. B.; SAVAGE, N. W.; ZHOU, X.; WALSH, L. J. *et al.* Oral lichen planus. **Clin Dermatol**, 18, n. 5, p. 533-539, 2000 Sep-Oct 2000.

THORNHILL, M. H. Immune mechanisms in oral lichen planus. **Acta Odontol Scand**, 59, n. 3, p. 174-177, Jun 2001.

THORNHILL, M. H.; SANKAR, V.; XU, X. J.; BARRETT, A. W. *et al.* The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, 35, n. 4, p. 233-240, Apr 2006.

TRUCCI, V. M.; SALUM, F. G.; FIGUEIREDO, M. A.; CHERUBINI, K. Interrelationship of dendritic cells, type 1 interferon system, regulatory T cells and toll-like receptors and their role in lichen planus and lupus erythematosus -- a literature review. **Arch Oral Biol**, 58, n. 10, p. 1532-1540, Oct 2013.

VAN DER MEIJ, E. H.; SCHEPMAN, K. P.; VAN DER WAAL, I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 96, n. 2, p. 164-171, Aug 2003.

WANG, F.; KE, Y.; YANG, L.; WANG, F. J. Quercetin protects human oral keratinocytes from lipopolysaccharide-induced injury by downregulating microRNA-22. **Hum Exp Toxicol**, p. 960327120918291, Apr 2020.

WANG, K.; LU, W.; TU, Q.; GE, Y. *et al.* Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus. **Sci Rep**, 6, p. 22943, Mar 2016.

WARNAKULASURIYA, S.; KUJAN, O.; AGUIRRE-URIZAR, J. M.; BAGAN, J. V. *et al.* Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. **Oral Dis**, Oct 2020.

WOO, S. B. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. **Head Neck Pathol**, 13, n. 3, p. 423-439, Sep 2019.

WU, A.; LUO, W.; ZHANG, Q.; YANG, Z. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett**, 330, n. 2, p. 181-189, Apr 2013.

XU, Z.; SHEN, Z.; SHI, L.; SUN, H. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 expression correlated with malignant potential of oral lichen planus. **Ann Diagn Pathol**, 17, n. 5, p. 408-411, Oct 2013.

YAMANAKA, Y.; YAMASHITA, M.; INNOCENTINI, L. M. A.; MACEDO, L. D. *et al.* Direct Immunofluorescence as a Helpful Tool for the Differential Diagnosis of Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Lesions. **Am J Dermatopathol**, 40, n. 7, p. 491-497, Jul 2018.

YANG, S. M.; MARTINEZ, N. J.; YASGAR, A.; DANCHIK, C. *et al.* Discovery of Orally Bioavailable, Quinoline-Based Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) Inhibitors with Potent Cellular Activity. **J Med Chem**, 61, n. 11, p. 4883-4903, 06 14 2018.

ZHAO, Y.; LIU, L.; YANG, S.; LIU, G. *et al.* Mechanisms of Atherosclerosis Induced by Postprandial Lipemia. **Front Cardiovasc Med**, 8, p. 636947, 2021.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE ALDH1 EM LÍQUEN PLANO ORAL, LESÃO LIQUENOIDE E LEUCOPLASIA: ESTUDO COMPARATIVO E DA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS.

Pesquisador: Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52763021.0.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.410.374

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma investigação experimental em laboratório, utilizando banco de material humano (blocos de parafina de arquivo de laboratório de anatomia patológica), cuja coleta de dados se inicia a partir de um levantamento de todos os exames anatomopatológicos com diagnóstico de líquen plano oral, lesão liquenoide e leucoplasia no banco de dados do laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de 10 anos, compreendendo os anos de 2009 a 2019. Os blocos de parafina dos casos do arquivo, devidamente selecionados, serão utilizados para a realização de técnica imunoistoquímica para identificação da proteína ALDH1, por meio do método da estreptavidina-biotina-peroxidase. A avaliação da imunomarcação para a proteína ALDH1 será realizada utilizando-se microscópio óptico. Dois avaliadores farão a análise, de forma cega em relação aos dados clínico-patológicos das amostras, e as divergências serão discutidas até chegar a um consenso, ou consultando um terceiro avaliador. Todas as lâminas submetidas à reação imunoistoquímica serão avaliadas em relação à marcação citoplasmática e/ou da membrana celular. A avaliação será realizada de forma semi-quantitativa, sendo gerado o índice "expressão de ALDH1", tanto para o epitélio, quanto para o infiltrado inflamatório da lâmina própria subepitelial. Os dados clínico-patológicos das amostras serão submetidos à análise estatística usando o Software SPSS - Statistical Package for the Social Science® (versão 23.0, Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism6 (versão 5.0). Teste de normalidade

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2005 2º Campus Pampulha

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

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.410.374

será aplicado para verificar a normalidade de distribuição dos dados. A análise descritiva mostrará as frequências e medidas de tendência central das variáveis analisadas. Análise bivariada será utilizada para comparar dados clínicos como sexo, idade, uso de fumo, localização da lesão e expressão da proteína ALDH1 (dicotômica), bem como para avaliar a relação entre intensidade do infiltrado inflamatório e expressão de ALDH1, e o grau de displasia e a expressão da referida proteína. A comparação da expressão de ALDH1 entre os grupos LPO, LLO e LS também será realizada. O nível de significância estabelecido é de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão imunistoquímica de ALDH1 em amostras de líquen plano oral, lesão liquenoide e leucoplasias orais.

Objetivo Secundário:

-Avaliar a influência de características clinicopatológicas na expressão de ALDH1.-Identificar a localização mais expressiva na marcação do ALDH1, se epitelial ou no infiltrado inflamatório.-Avaliar se há diferença na expressão do ALDH1 entre fumantes e não fumantes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos e estão relacionados à identificação dos sujeitos da pesquisa, uma vez que o projeto envolverá apenas dados secundários. Serão tomadas todas as precauções no sentido de manter em sigilo os dados. Terão acesso aos mesmos apenas os pesquisadores, e a identidade dos participantes não será revelada. Os participantes serão identificados por numeração e todos os dados serão codificados. Em relação aos blocos de parafina utilizados no estudo imunistoquímico não há risco de desgaste dos mesmos. Serão retirados no máximo dois cortes de 3 micrômetros, com preservação do material para arquivo. Após os cortes os blocos serão devolvidos imediatamente ao arquivo.

Benefícios:

O projeto poderá trazer informações importantes sobre o papel do infiltrado inflamatório e o risco de transformação maligna avaliando comparativamente lesões da mucosa bucal de aspecto clínico e histopatológico semelhante: líquen plano, lesão liquenoide e leucoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Espera-se encontrar uma expressão diferenciada de ALDH1 entre as lesões estudadas: Líquen plano oral, lesão liquenoide e leucoplasia. A expressão estará associada ao grau de malignidade, e

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 3 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 5.410.374

a intensidade do infiltrado inflamatório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador respondeu as diligências antes indicadas pelo CEP, e apresentou:

- Carta resposta - respondendo ponto a ponto das diligencias;
- Adequação do TCLE
- Inclusão do TCUD
- Esclareceu o recrutamento dos pacientes.

Recomendações:

Não há recomendações, após respostas as diligências anteriormente indicadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis a aprovação do projeto após resposta as diligências indicadas anteriormente pelo CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1837686.pdf | 10/03/2022 11:07:40 | | Aceito |
| Outros | Resposta2.pdf | 10/03/2022 11:06:11 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |
| Outros | TCUD_FINAL.pdf | 10/03/2022 11:04:54 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_FINAL.pdf | 10/03/2022 11:04:16 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_FINAL.pdf | 10/03/2022 11:03:52 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.410.374

| | | | | |
|----------------|------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Outros | ParecerPP.pdf | 06/10/2021 15:00:11 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |
| Outros | TCB.pdf | 06/10/2021 14:58:20 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto.pdf | 06/10/2021 14:55:47 | Maria Cássia Ferreira de Aguiar | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 16 de Maio de 2022

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

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

