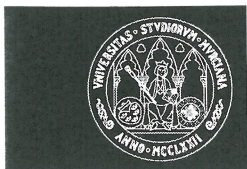


D^a. Cristina Aznar Cayuela
2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. L. Fernando Carballo Álvarez, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina Interna y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** * en Ciencias de la Salud, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "ESTUDIO DE MARCADORES SALIVALES Y EFICACIA DE LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN LA ENFERMEDAD DE LIQUEN PLANO ORAL", realizada por D^a Cristina Aznar Cayuela, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. María Pía López Jornet y D^a. Asta Tvarijomaviciute, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 10 de febrero de 2017, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.



Murcia a 10 de febrero de 2017

Doctorando: D^a. Cristina Aznar Cayuela

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*



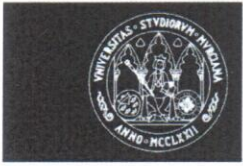
UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Pia López Jornet, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Medicina Física y Radiología.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de marcadores salivales y eficacia de la aplicación de antioxidantes naturales en la enfermedad de liquen plano oral", realizada por D^a. Cristina Aznar Cayuela, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 14 de Diciembre de 2016



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Asta TvariJonaviciute, Doctora de Universidad del Área de ciencias de la salud en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de marcadores salivales y eficacia de la aplicación de antioxidantes naturales en la enfermedad de liquen plano oral", realizada por D^a. Cristina Aznar Cayuela, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de diciembre de 2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE MARCADORES SALIVALES Y EFICACIA
DE LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES
EN LA ENFERMEDAD DE LIQUEN PLANO ORAL**

CRISTINA AZNAR CAYUELA

2017

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ENVEJECIMIENTO



ESTUDIO DE MARCADORES SALIVALES Y EFICACIA DE LA APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN LA ENFERMEDAD DE LIQUEN PLANO ORAL

CRISTINA AZNAR CAYUELA

2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directoras de tesis Dra. Pía López Jornet y Dra. Asta Tvarijonaviciute su dedicación y ánimos en todo momento para llevar a cabo este proyecto, muchísimas gracias porque sin vosotras no lo hubiera logrado.

A los pacientes que han colaborado desinteresadamente en este estudio y a mi compi de trabajo Jennifer que ha sido incondicional a la hora de echarme una mano y animarme a seguir.

A mi familia, motor de mi vida, mis padres, ejemplo de lucha día a día, mi compañero de vida Damián por su incansable tesón en ayudarme a cumplir mis sueños como un día me prometió, mis niñas: Lucía e Inés que me llenan el alma de alegría y amor y son lo mejor que me ha podido pasar jamás y mi ángel, Julia, que me hizo poner los pies en el suelo y ver lo verdaderamente importante, me enseñó que aún siendo muy pequeña se pueden enseñar grandísimas lecciones de vida y gracias a ti estoy aquí pudiendo mostrar mis inquietudes y mis ganas de seguir aprendiendo, gracias.



INDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. LIQUEN PLANO ORAL.....	14
1.1.1 GENERALIDADES.....	14
1.1.2. MANIFESTACIONES ORALES.....	16
1.1.3 CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y SUBTIPOS.....	18
1.1.4 DIAGNÓSTICO.....	21
1.1.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	22
1.1.6 TRANSFORMACIÓN MALIGNA.....	23
1.1.7 TRATAMIENTO.....	24
1.2 SALIVA.....	29
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO.....	30
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
2.1 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	34
2.2 OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1 PACIENTES Y MÉTODO.....	38
3.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	38
3.1.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN LIQUEN PLANO ORAL.....	38
3.1.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN LIQUEN PLANO ORAL.....	40
3.1.2 VARIABLES CLÍNICAS DE ESTUDIO.....	43
3.2 PRODUCTO DE ESTUDIO.....	46
3.3 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	46
3.4 ANÁLISIS ANTIOXIDANTE.....	50
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN SALIVA LPO VS CONTROLES.....	56



4.2 EFICACIA CLÍNICA DE <i>CHAMAEMILUM NOBILE</i> AL 2%.....	58
4.3 EFECTO DE LA CAMOMILA SOBRE TAC SALIVAL.....	63
5. DISCUSIÓN.....	65
5.1 ESTRÉS OXIDATIVO EN SALIVA LPO VS CONTROLES.....	66
5.2 EFICACIA CLÍNICA DE <i>CHAMAEMILUM NOBILE</i> AL 2%.....	69
5.3 EFECTO DE LA CAMOMILA SOBRE TAC SALIVAL.....	73
6. CONCLUSIONES	77
7. BIBLIOGRAFÍA.....	79
8. TRABAJOS EN RELACIÓN A LA TESIS.....	92
8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS	93
8.2 PUBLICACIONES	95
8.2.1. ARTICULO 1.....	96
8.2.2. ARTICULO 2.....	101
9. ANEXOS.....	108
9.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	109
9.2 HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE.....	110
9.3 INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.....	112
9.4 CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS.....	113
9.5 DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL.....	130



GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

CUPRAC: Capacidad antioxidante cúprica reductora.

EO: Estrés Oxidativo.

EVA: Escala Visual Analógica.

FRAP: capacidad de reducción férrica del plasma.

GDC: Gingivitis descamativa crónica.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HAD: Escala de Ansiedad-Depresión.

LPO: Lique plano oral.

MDA: Malonaldehído.

NO: Óxido nítrico.

OHIP: Perfil de Impacto de Salud Oral.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Proteína C reactiva.

RL: Radicales libres.

RLF: Reacciones liquenoides por fármacos.

ROS: Especies de oxígeno reactivo.

SBA: Síndrome de Boca Ardiente.

SOD: Superóxido dismutasa.

TAC: Actividad antioxidante total.

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente trolox.



RESUMEN

Objetivos: Este estudio evaluó el estrés oxidativo en saliva de pacientes con LPO y verificó la eficacia de la aplicación local de *Chamaemelum nobile* a nivel clínico como bioquímico.

Métodos: Para alcanzar el objetivo han sido realizados tres estudios diferentes. El estudio 1 evaluó la presencia del ESTRÉS OXIDATIVO EN SALIVA de los pacientes con LPO. Para ello se analizaron muestras de 20 pacientes con LPO, 19 con síndrome de boca ardiente (SBA) y 31 sujetos control. Se examinó la cavidad oral de cada paciente y los pacientes respondieron a un cuestionario de calidad de vida (OHIP-14) y al cuestionario de xerostomía. Se midieron los siguientes parámetros en la saliva total no estimulada: capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), capacidad antioxidante total (TAC), capacidad antioxidante cúprica reductora (CUPRAC), y la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), proteína C reactiva (PCR), óxido nítrico, nitratos y nitritos.

El estudio 2 ha sido enfocado en la evaluación de EFICACIA CLÍNICA DE CHAMAEMILUM NOBILE AL 2%. Para ello se incluyeron 60 pacientes con LPO clínicamente e histopatológicamente diagnosticados. Treinta pacientes fueron tratados con manzanilla y 30 con un placebo.

El estudio 3 evaluó el EFFECTO DE LA CAMOMILA SOBRE TAC SALIVAL EN PACIENTES CON LPO. La muestra consistió en 55 pacientes con LPO clínica e histopatológicamente diagnosticados. Veintiséis pacientes fueron tratados con manzanilla y 29 con un placebo. La saliva no estimulada (basal) se recogió el primer día del estudio y 4 semanas después.

Resultados: Estudio 1. El grupo LPO mostró diferencias estadísticamente significativas en las especies reactivas de oxígeno (ROS) (26916 cps/g) en comparación con el grupo control ($P < 0,05$). En el grupo SBA, ROS fue 36028 cps/g con una diferencia significativa en comparación con el grupo de control ($P < 0,05$). Se encontraron niveles significativamente más altos de óxido nítrico



salival (254,2 umol/g) y nitrito (182,6 umol/g) en pacientes con LPO en comparación con SBA y grupos control ($P < 0,05$).

Estudio 2. Hubo una marcada mejoría en la sintomatología de los pacientes con LPO con dolor disminuido ($P < 0,001$), sensación de ardor ($P < 0,001$), picazón ($P = 0,011$), OHIP-14 ($P < 0,001$) e índice de Thongprasom ($P = 0,001$).

Estudio 3. Al inicio (T1) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el TAC entre los dos grupos de pacientes. Después de cuatro semanas de tratamiento, se detectó un aumento estadísticamente significativo en el FRAP en el grupo placebo (0,323 [0,090-0,467] frente a 0,406 [0,197 - 0,848] mmol/g * 10^{-3}) ($P < 0,05$). Se observaron correlaciones significativas entre dolor y drenaje y TEAC1, CUPRAC y FRAP; y entre la xerostomía y el TEAC1, TEAC2, CUPRAC y FRAP.

CONCLUSIONES: Los resultados del presente estudio sugieren que el LPO se asocia con estrés oxidativo e inflamación. La aplicación tópica de manzanilla mejora la sintomatología (dolor, ardor y escozor) y la calidad de vida en los pacientes de LPO, aunque no ha tenido efecto significativo sobre marcadores de estrés oxidativo durante el periodo del estudio.

PALABRAS CLAVE: Liquen plano oral, estrés oxidativo, capacidad antioxidante, saliva, marcadores de estrés oxidativo, *Chamaemelum nobile*.



SUMMARY

Objectives: This study evaluated the oxidative stress in saliva of patients with OLP and verified the efficacy of the local application of *Chamaemelum nobile* at the clinical level as a biochemist.

Methods: To achieve the objective three different studies have been performed. Study 1 evaluated the presence of OXIDATIVE STRESS IN SALIVA of patients with OLP. For this purpose, samples from 20 patients with OLP, 19 with burning mouth syndrome (SBA) and 31 control subjects were analyzed. The oral cavity of each patient was examined and the patients responded to a quality of life questionnaire (OHIP-14) and xerostomia inventory. The following parameters were measured in total unstimulated saliva: Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), total antioxidant capacity (TAC), reducing cupric antioxidant capacity (CUPRAC), and plasma ferric reduction capacity (FRAP), protein C Reactive (PCR), nitric oxide, nitrates and nitrites.

Study 2 has been focused on the evaluation of CLINICAL EFFICACY OF CHAMAEMILUM NOBILE AT 2%. For this, 60 patients with clinically and histopathologically diagnosed OLP were included. Thirty patients were treated with chamomile and 30 with a placebo.

Study 3 evaluated the EFFECT OF CAMOMILE ON SALIVAL TAC in patients with OLP. The sample consisted of 55 patients with LPO clinically and histopathologically diagnosed. Twenty-six patients were treated with chamomile and 29 with placebo. Unstimulated (basal) saliva was collected on the first day of the study and 4 weeks later.

Results: Study 1. The LPO group showed statistically significant differences in reactive oxygen species (ROS) (26916 cps/g) compared to the control group ($P < 0.05$). In the SBA group, ROS was 36028 cps/g with significant difference compared to the control group ($P < 0.05$). Significantly higher levels of salivary nitric oxide (254.2 $\mu\text{mol/g}$) and nitrite (182.6 $\mu\text{mol/g}$) were found in patients with OLP compared with SBA and control groups ($P < 0.05$).



Study 2. There was a marked improvement in the symptomatology of OLP patients with decreased pain ($P < 0.001$), burning sensation ($P < 0.001$), itching ($P = 0.011$), OHIP-14 ($P < 0.001$), and Thongprasom index ($P = 0.001$).

Study 3. At baseline (T1) no statistically significant differences were detected in TAC between the two groups of patients. After four weeks of treatment, a statistically significant increase was detected in FRAP in the placebo group ($0.323 [0.090-0.467]$ vs. $0.406 [0.197 - 0.848]$ mmol/g $\times 10^{-3}$) ($P < 0.05$). Significant correlations were observed between pain and drainage and TEAC1, CUPRAC, and FRAP; and between xerostomia and the TEAC1, TEAC2, CUPRAC, and FRAP.

CONCLUSIONS: The results of the present study suggest that LPO is associated with oxidative stress and inflammation. Topical application of chamomile improves symptomatology (pain, burning and stinging) and quality of life in OLP patients, although it has not had a significant effect on oxidative stress markers during the study period.

KEY WORDS: Oral lichen planus, oxidative stress, antioxidant capacity, saliva, markers of oxidative stress, *Chamaemelum nobile*.



1. INTRODUCCIÓN



1.1. LIQUEN PLANO ORAL

1.1.1. GENERALIDADES

El liquen plano es una enfermedad crónica, inflamatoria, mucocutánea y recurrente que afecta a piel y mucosas, siendo una de las afecciones más frecuentes, y que se encuentra exclusivamente en la especie humana. Según dice Borello (1971) en su libro “Las lesiones blancas de la mucosa bucal” el rasgo más destacado de esta enfermedad es su pleomorfismo tanto en su localización dérmica como en la mucosa.

Dicha patología cursa a brotes o a periodos de remisiones espontáneas y reagudizaciones, ha sido descrita en múltiples formas o variantes, que evidentemente han complicado su estudio. Existe un acuerdo universal por el cual las lesiones bucales constituyen la manifestación extracutánea más frecuente de la enfermedad, incluso siendo la única manifestación de la misma. Los casos de liquen plano que se inician en la boca sólo el 15-20% van a presentar más adelante alteraciones cutáneas en distintas localizaciones como piel, uñas, cuero cabelludo y otras mucosas (Siltra, 1972).

Tiene una prevalencia aproximadamente entre el 0,5 y el 2% de la población general, siendo para algunos autores la enfermedad no infecciosa más frecuente de la cavidad bucal llegando al representar el 20% de los diagnósticos de la práctica de medicina bucal (Bagán JV y cols 1995; Scully y cols 1998; Carrozzo; Eisen y cols 2005; Scully y Carrozzo 2008).

Según Cerero Lapiedra (1991) las lesiones bucales son más frecuentes de lo que las estadísticas muestran debido al curso asintomático de muchas de estas lesiones en la boca. Presenta un pico máximo entre los 35 y 55 años, y resulta poco frecuente en jóvenes y excepcional en niños. Así mismo se ha observado una mayor prevalencia en el sexo femenino en una proporción de 2:1. De igual manera es un padecimiento casi exclusivo de piel blanca.

La etiología del LPO es desconocida, aunque su patogénesis incluye un trastorno inmune en el que los linfocitos CD8 citotóxicos atacan las células



epiteliales (Scully y Carrozzo, 2008; Van der Waal, 2009; Roopashree y cols. 2010; Lodi y cols. 2012; Mignogna y cols. 2007; Van der Meij y cols. 2007) y se produce una respuesta inmune anormal mediada por células T. Hay una hipótesis de que el aumento del estrés oxidativo y un desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante puede estar involucrado en la patogénesis del LPO (Ergun y cols. 2011; Sezer y cols. 2007; Upadhyay y cols. 2010; Sander y cols. 2005; Mortazavi y cols. 2013; Vlková y cols. 2012; Agha-Hosseini y cols. 2012, 2009; Iannitti y cols. 2012; Battino y cols. 2008; Valko y cols. 2007; Lopez-Jornet y cols. 2014; Batu y cols. 2015; Abdolsamadi y cols. 2014; Hashemy y cols. 2016; Barikbin y cols. 2011; Kaur y cols. 2015; Nagao y cols. 2001). Por esta razón, en los últimos años se ha observado un mayor interés en investigar la oxidación de sistemas biológicos, incluidos los radicales libres, especialmente las especies de oxígeno reactivo (ROS), el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidante en el LPO, así como otras enfermedades inflamatorias y carcinógenas crónicas degenerativas (Ergun y cols. 2011; Sezer y cols. 2007; Upadhyay y cols. 2010; Sander y cols. 2005; Mortazavi y cols. 2013; Vlková y cols. 2012; Agha-Hosseini y cols. 2012, 2009; Iannitti y cols. 2012; Battino y cols. 2008; Valko y cols. 2007; Lopez-Jornet y cols. 2014). Existen muchos factores posiblemente relacionados con la aparición del liquen plano oral, algunos de estos contribuyentes, dentro de los que figuran los factores emocionales y el estrés, y están descritos en la figura 1.1.

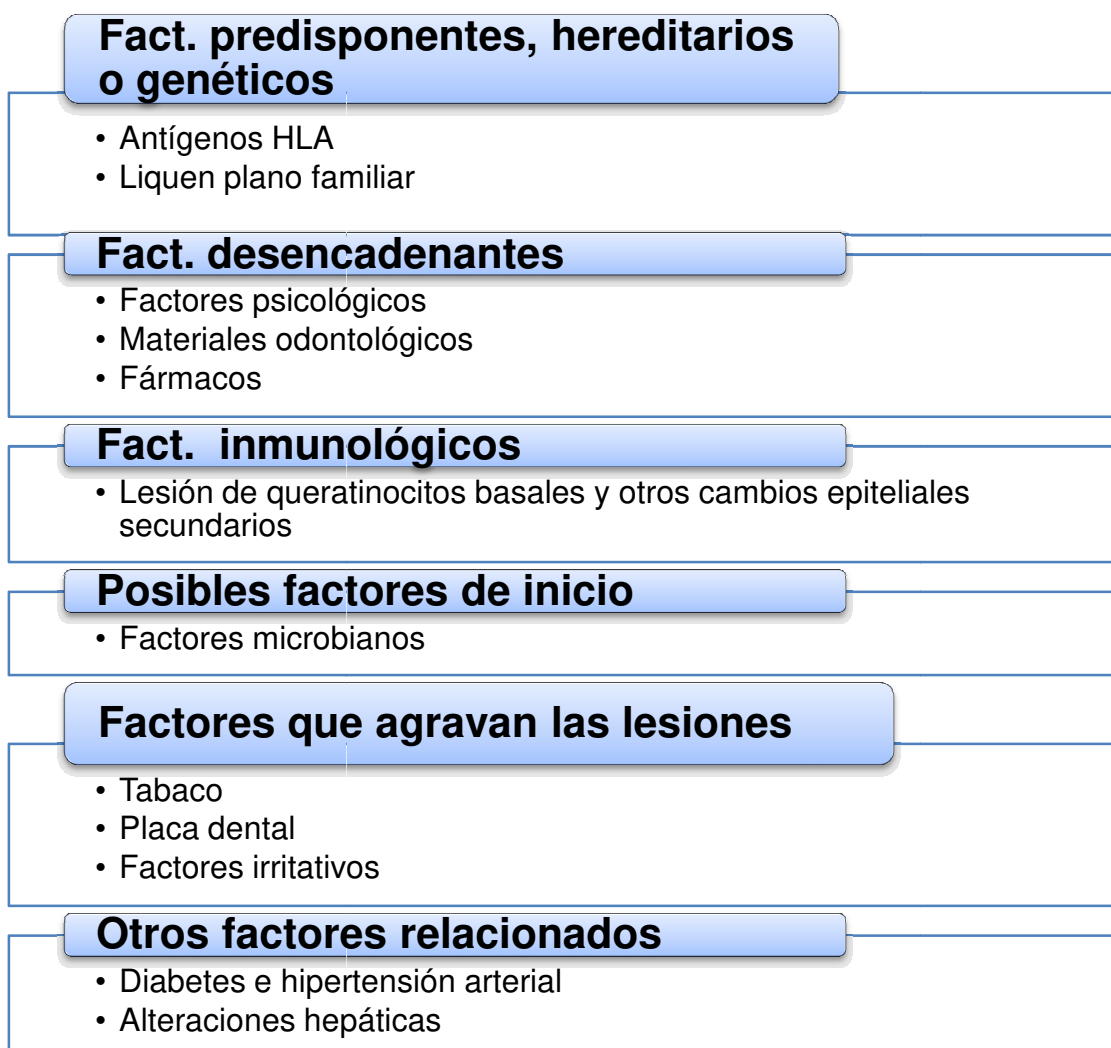


Figura 1.1. Factores etiopatogénicos mas importantes en el LPO.

1.1.2. Manifestaciones orales

En los casos de LPO aparecen lesiones crónicas multicéntricas y bilaterales que cambian de aspecto, forma y localización. Es muy raro que las lesiones desaparezcan por completo ya que persisten durante muchos años con periodos de exacerbación, en los que se dan normalmente con más frecuencia las lesiones eritematosas y erosivas acompañándose de un aumento del dolor y la sensibilidad y periodos de calma en los que son más evidentes las estrías (estrías de Wickham), pápulas o placas (Scully y Carrozzo, 2008).



Las lesiones se pueden manifestar en distintas localizaciones tales como mucosa masticatoria, mucosa de revestimiento, dorso lingual o borde bermellón de los labios (Mignogna y cols. 2005; Bermejo y cols. 2010).

Según Bagán y cols. (2012), las localizaciones más habituales son las siguientes:

- Mucosa yugal (90%).
- Lengua (50%).
- Encías (27%).
- Bermellón de los labios (17%).
- Paladar (8%).
- Suelo de la boca (3%).

Las lesiones eritematosas que afectan a la encía producen la conocida "gingivitis descamativa crónica" que es el tipo más común de liquen plano gingival (Scully y Porter, 1997). Este se caracteriza por un eritema brillante y difuso que afecta tanto a la encía libre como a la adherida originando lesiones atrófico y erosivas con tendencia a la descamación. Tienden al sangrado espontáneamente o al mínimo traumatismo, estas lesiones erosivas se asemejan a las observadas en otras enfermedades vesículo-erosivas tales como el penfigoide, pénfigo, enfermedad lineal por Ig A y gingivitis por cuerpo extraño (Gordon y Daley, 1997). Estas enfermedades también producen gingivitis descamativa que no es fácil identificarla como lesiones por liquen plano si no se acompaña de la existencia de otras lesiones reticulares en la encía o en cualquier otra localización en la cavidad oral.

1.1.3. Clasificación clínica

Según el criterio de Bagán y cols. (2012), clasificaremos las lesiones orales del liquen plano en (Figura 1.2.):

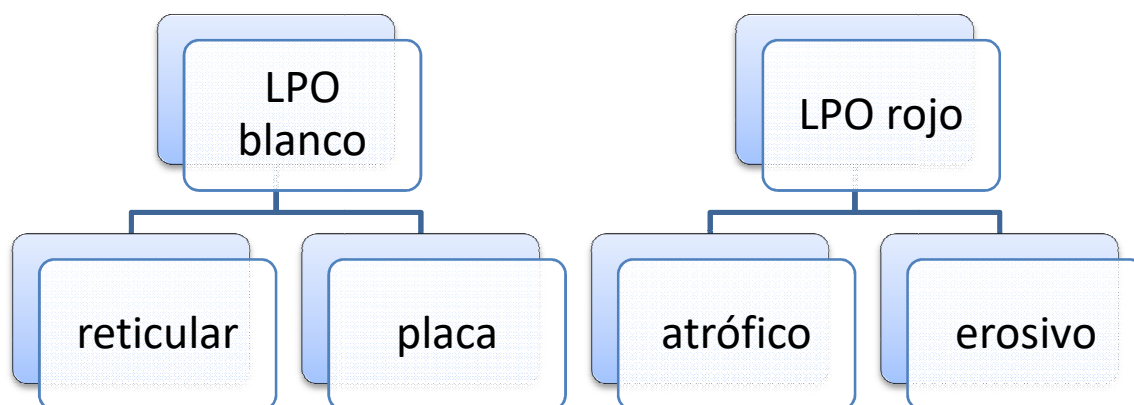


Figura 1.2. Clasificación de las lesiones de LPO según Bagán y cols. (2012)

LPO blanco:

1.1 Reticular:

Es la forma mas frecuente, se presenta como una serie de estrías blancas, finas, radiantes y ligeramente elevadas conocidas con el nombre de "estrias de Wickman", las cuales pueden estar rodeadas de un borde eritematoso (Mallaoglu, 2000) (Imagen 1) .

1.2 En placa:

Se manifiesta como parches blancos homogéneos, ligeramente elevados que no se desprenden al raspado. Estas lesiones se asemejan a las manifestadas por la leucoplasia, por lo que hay que hacer un correcto diagnóstico diferencial. Estas placas suelen ser asintomáticas y se consideran una forma crónica y rebelde al tratamiento, por lo que se ha sugerido que podrían deberse a una evolución de la forma reticular y

atrófica causada por un agente irritativo como por ejemplo el tabaco
(Mallaoglu, 2000; López y cols. 1993; Bricker, 1994) (Imagen 2).



Imagen 1. LPO reticular en zona de trígono retromolar.



Imagen 2. Placa de LPO en lengua.

LPO rojo:

2.1 Atrófico:

Constituido por áreas difusas y mal definidas. Su color se debe a los vasos sanguíneos presentes en las zonas de inflamación que se transparentan debido a un adelgazamiento del epitelio.

2.2 Erosivo:

Es la segunda forma más común de manifestación del liquen plano oral (20% del total). Las lesiones se producen por la rotura del epitelio dando lugar a úlceras crónicas únicas o múltiples (Imagen 3).



Imagen 3. LPO atrófico-erosivo en zona palatina.



1.1.4. DIAGNÓSTICO

Para realizar un correcto diagnóstico hay que seguir una serie de pasos que se caracterizan por una completa anamnesis, un correcto juicio clínico y por supuesto un buen estudio histopatológico.

Se debe realizar una historia clínica y en la anamnesis se recogerá toda la información importante sobre la sintomatología y proceso de la patología que desarrolla, por lo que hay que tener un preciso protocolo en el que debe quedar reflejado:

- Antecedentes familiares: aunque la etiopatogenia no está muy clara sí que conocemos que existe una predisposición genética.
- Antecedentes personales: medicación que está tomando el paciente, características psicológicas o enfermedades sistémicas que padece.
- Otras manifestaciones como alguna manifestación extraoral.
- Sintomatología: dolor, ardor, quemazón y sangrado espontáneo.
- Localización y forma clínica.
- Evolución de las lesiones, ya que al ser una patología crónica es importante conocer desde cuando se manifiestan las lesiones así como las remisiones espontáneas o los periodos de exacerbación.

En la actualidad los criterios diagnósticos proponen una nueva clasificación basada en la propia definición de liquen plano oral realizada por la OMS, en la que revisan los criterios diagnósticos del liquen plano oral y de las lesiones liquenoides orales, incluyendo criterios clínicos e histopatológicos (Van der Meij y cols. 2003, 2007) (Figura 1.3).



Criterios clínicos

- Presencia de lesiones bilaterales, con tendencia a la simetría.
- Presencia de lesiones blancas ligeramente elevadas con patrón reticular.
- Lesiones erosivas, atróficas, ampollosas o en placa.

Criterios histopatológicos

- Prevalencia de infiltrado celular en banda bien definido en la región superficial del tejido conectivo, constituido principalmente por linfocitos.
- Signos de regeneración licuefactiva en la capa de las células basales.
- Ausencia de displasia epitelial.

Figura 1.3. Clasificación de Van der Meij y cols, 2003.

Un diagnóstico final de LPO requiere que se complementen ambos criterios.

1.1.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La mucosa oral puede verse afectada por un gran número de desórdenes reactivos, infecciosos, inflamatorios y mediados inmunológicamente, por lo que en el LPO hay que realizar un diagnóstico diferencial con otras lesiones blancas y rojas de aspecto similar (MatesanzPérez y Bascones-Martínez, 2009) (Figura 1.4):

<u>Lesiones blancas de la cavidad oral</u>	<u>Lesiones rojas de la cavidad oral</u>
candidiasis	eritroplasia
nevus blanco esponjoso	pénfigo
hiperqueratosis	dermatitis herpetiforme
leucoplasia	lupus eritematoso discoide
quemaduras químicas	penfigoide cicatricial

Figura 1.4. Lesiones de aspecto similar a las de LPO.



1.1.6. TRANSFORMACIÓN MALIGNA

Uno de los aspectos más importantes relacionados con esta enfermedad es el carácter premaligno que puede poseer. Hay varios estudios prospectivos a largo plazo que muestran una tasa de transformación maligna del 1% durante un período medio de cinco años (Van der Meij y cols, 2003).

Las formas erosivas han sido descritas en la literatura especializada con relativa frecuencia, como asociadas a la aparición de lesiones epiteliales malignas (Barnar 1993; Gandolfo y cols 2004; Bascones y cols 2005; Bascones y cols 2007; Blanco Carrión 2000; Bermejo 2009). Sin duda, uno de los elementos morfológicos más importantes es la presencia de la displasia epitelial, criterio de exclusión, como un posible elemento predictor de su posible desarrollo neoplásico, aspecto por el cual se discute mucho por los investigadores de esta enfermedad, este continúa siendo un tema de gran controversia.

El desarrollo de un cáncer asociado a un liquen plano bucal fue descrito por primera vez por Hallopeau, en 1910, a partir de entonces se han llevado a cabo diversas investigaciones que manifiestan bastante controversia entre sí.

González-Moles y cols. (2008) han realizado recientemente una revisión completa a cerca de la transformación maligna del LPO. En ella proponen una hipótesis de las posibles bases moleculares que podrían estar detrás de dicha transformación. Según estos autores las células epiteliales, en el LPO, responden al intenso ataque de los linfocitos T mediante una baja frecuencia de fenómenos de apoptosis y un incremento de la proliferación celular, consiguiendo así la preservación de la estructura epitelial. Los estímulos anti-apoptóticos y proliferativos son generados por el infiltrado inflamatorio como una defensa, activando el sistema p53 relacionado con la reparación del ADN en una alta proporción de las células, por estas razones, el rango de transformación maligna es muy bajo en un epitelio que podría ser propenso a desarrollar un carcinoma.



1.1.7. TRATAMIENTO

Ante un paciente con LPO hay que seguir un orden en nuestros planteamientos terapéuticos (Cerero 2004; Matesanz-Pérez, Bascones-Martínez, 2009; Lavanya y cols. 2012; Lodi y cols. 2012).

1. Realizar un completo estudio etiopatogénico:

Descartaremos la existencia de reacciones liquenoides por fármacos (RLF), si pensamos que el paciente está tomando algún medicamento que puede producirle una RFL procederemos a su supresión o cambiaremos por otro en el que no se haya encontrado relación con el LPO, por supuesto previa notificación al médico que se lo haya prescrito.

También comprobaremos si hay algún tipo de material de restauración odontológica que este originando en la mucosa próxima lesiones liquenoides a través del contacto directo, por lo que procederíamos a su sustitución por otro material.

Analizaremos la presencia de factores irritativos mecánicos tales como dientes cortantes o lesivos sobre la mucosa. Trataremos de pulir o en el caso de no poder realizar un tratamiento conservador procederíamos a la exodoncia de la pieza.

2. Una vez se haya completado el apartado anterior pasaremos a tratar a nuestro paciente, pero previamente tendremos que hacer una clasificación de la situación de las lesiones para así aplicar el tratamiento más adecuado para cada caso:

A. Lesiones muy localizadas en la mucosa oral (López-Jornet y Camacho Alonso 2010), (López-Jornet y cols. 2004), (Campisi y cols. 2004; Ungphaiboon y cols. 2005; Lodi 2012).

I. Lesiones únicamente reticulares: estas lesiones no necesitan tratamiento, pero hay que comentarle al paciente de lo que



se trata, el curso de la patología y por lo tanto se recomienda un seguimiento con revisiones periódicas cada 6 meses.

- II. Lesiones atrófico-erosivas: estas lesiones se tratan mediante pomadas de acetónido de triamcinolona al 0,1% en orabase con aplicaciones de 2 veces al día en las lesiones mientras permanezcan. También se puede prescribir acetónido de fluocinolona al 0,1% o bien el propionato de clobetasol al 0,05% ambos en orabase. El propionato de clobetasol al 0,025% en orabase consigue una remisión total en el 62,5% de los casos con LPO sintomático (Lozada-Nur y cols. 1991). González Moles y cols. 2002 realizaron un estudio utilizando propionato de clobetasol al 0,05% en solución acuosa consiguiendo una remisión completa del dolor y la ulceración en el 93% de los pacientes con lesiones orales erosivas severas. En otro estudio (González-Moles y cols. 2003) los mismos autores usaron una férula para aplicar el propionato de clobetasol y encontraron una remisión completa del dolor y la ulceración en todos los pacientes con lesiones gingivales erosivas severas. No obstante, el tratamiento con clobetasol no es eficaz en un bajo porcentaje de casos (Lozada-Nur y cols. 1991; Sand y cols. 2002), especialmente en pacientes con LPO asociado a enfermedades hepáticas (González-Moles y cols. 2002).
- III. Lesiones atrófico-erosivas con gran componente erosivo: en estos casos se utilizan las infiltraciones perilesionales empleando triamcinolona en preparados depot. Se colocan 40mg de este preparado precedido de un poco de anestesia infiltrativa. Este proceso puede repetirse a los 10-12 días.



B. Lesiones muy extendidas en la mucosa oral (Campisi y cols. 2004; Ungphaiboon y cols. 2005; Lodi 2012).

- I. Lesiones atrófico-erosivas: se administra prednisona o sus equivalentes farmacológicos en dosis de 40mg durante 5 días y posteriormente 20mg durante 7 días por vía oral.

En el supuesto de que este protocolo terapéutico anteriormente descrito no muestre los resultados esperados, se puede emplear la ciclosporina en orabase o en solución oleosa.

El efecto adverso más frecuente producido por el uso oral de corticoides es la candidiasis oral, tanto en su forma eritematosa como pseudomembranosa. La candidiasis oral aparece en un 25-55% de los pacientes que usan corticoides y puede causar malestar, sobre todo una sensación de quemazón en la boca.

A pesar de la gran variedad de agentes terapéuticos empleados en el tratamiento del liquen plano oral, factores como la dosis óptima del fármaco, la duración del tratamiento, la seguridad y su verdadera eficacia continúan siendo desconocidos (Lodi y cols. 2012), hay muchos efectos adversos a parte del anteriormente mencionado (candidiasis) que han llevado incluso a algunos pacientes a suspender el tratamiento. Los efectos adversos asociados tratamientos con inmunosupresores pueden ir desde la alteración en los niveles de transaminasa, hiperlipidemias, queilitis, alopecia, alteraciones del sabor y la sensación de ardor. Algunos de los pacientes tratados con pimecrólimus pueden experimentar sensación de quemazón oral tras la aplicación o parestesia de la mucosa (Volz y cols, 2008). Además los teratogénicos y su uso en mujeres lactantes debería estar contraindicado (Al-Hashimi, 2007; Petruzzi y cols, 2013).

Por lo tanto ya que las opciones terapéuticas más comunes para el tratamiento de LPO producen efectos adversos (Scully y Carrozzo, 2008; Van der Waal, 2009; Roopashree y cols. 2010; Lodi y cols. 2012; Mignogna y cols.

2007; Van der Meij y cols. 2007), se sigue investigando para poder llegar a la utilización de otros productos tales como la camomila que sean a la vez eficaces y carezcan de los efectos secundarios que puedan llegar a tener los anteriormente descritos.

La Fitoterapia aporta plantas de acción antiinflamatoria y antioxidante que pueden ayudar a mitigar la inflamación: cúrcuma, té verde, camomila, regaliz y caléndula entre otras. La manzanilla o camomila es una hierba perteneciente a la familia de las Asteráceas o Compuestas, originaria de Europa y Asia occidental. La planta crece hasta 50 cm de altura, tiene un tallo delgado, ramificado, con hojas alternas de color verde claro y flores que se agrupan en una cabezuela amarilla rodeada de una corona de pétalos blancos, semejantes a las margaritas y que tiene un olor característico, aromático y agradable.



Figura 4. Flor de *Chamaemelum nobile*

En la medicina herbaria se utilizan generalmente dos especies de manzanilla, la *Matricaria chamomilla* (*Matricaria recutita*, camomila alemana, camomila húngara) y la *Chamaemelum nobile* (camomila romana), ambas similares en apariencia física, propiedades químicas y en sus aplicaciones generales. Estudios experimentales,

le atribuyen a la manzanilla varias propiedades farmacológicas. Entre éstas se incluyen, efectos antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales, antiespasmódicos, cicatrizantes y sedantes. Más recientemente, se han indicado también efectos antitumorales, antihiperlipidémicos, inmunomoduladores y antioxidantes.

La camomila se ha utilizado para tratar diversos trastornos como heridas, úlceras, eczema, inflamaciones de la piel, magulladuras, quemaduras, erosión



de los pezones, infecciones de los oídos, trastornos oculares como obstrucción de los canales lacrimales y conjuntivitis, hemorroides, mastitis, etc... En infusión ha sido empleada para el manejo de trastornos nerviosos como ansiedad, angustia, nerviosismo, pesadillas, insomnio y otros problemas del sueño y también para tratar varios trastornos gastrointestinales como flatulencia, indigestión, úlceras e irritación del estómago, cólicos, diarrea, náuseas y vómitos. También se ha utilizado en casos de cefalea, neuralgias y migraña ya que posee una variedad de flavonoides activos tales como alfa bisabolol, azuleno, matricina y camazuleno, todos los cuales tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antibacterianas e inmunorreguladoras. Además, el consumo de té de manzanilla mostró la mejora del estado oxidativo total salival en el personal de quirófano en un estudio de Sami y cols. (2015). Sin embargo, a juicio de los autores, no existen datos sobre los posibles efectos de la manzanilla sobre los antioxidantes salivales en pacientes con LPO.

Las cabezas de las flores secas son empleadas en medicina para preparar infusiones (té), extractos líquidos, cápsulas o tabletas para uso interno. Estas preparaciones pueden ser sólo de manzanilla o combinaciones de ésta con otras hierbas. Las flores de manzanilla pueden ser aplicadas en la piel en forma de compresas, lavados, tinturas, cremas y ungüentos, usadas como enjuague bucal, y en lavados y gotas oculares. Se demostró que la camomila es beneficiosa en el tratamiento de enfermedades bucales, tales como la mucositis (Braga y cols, 2015). En general, la manzanilla es considerada una hierba segura, con pocos riesgos o efectos adversos, cuando se administra siguiendo las indicaciones terapéuticas recomendadas. Puede producir sueño, por lo que se recomienda cautela si se conducen vehículos o si se opera con maquinaria pesada. Teóricamente, la manzanilla puede provocar contracciones del útero y eventualmente pudiera conducir a abortos por lo que se sugiere evitar su uso durante el embarazo. Está contraindicado su uso en pacientes con alergia a plantas del género asterácea como la ambrosia,



crisantemos, margaritas y caléndulas entre otras por el elevado riesgo de desarrollar reacciones alérgicas graves.

1.2. SALIVA

La saliva es un líquido segregado por las glándulas salivales, de viscosidad variable, según el estado de hidratación y la fase digestiva. Tiene una composición parecida a la del plasma y contiene agua, iones, mucina, proteínas plasmáticas, leucocitos y detritos celulares. Sirve para lubricar los alimentos, facilitando su masticación y la formación del bolo alimenticio e inicia la digestión del almidón gracias a su contenido en α -amilasa. Ejerce además un efecto de arrastre y limpieza de los dientes y la mucosa bucal.

Su contenido en agua asciende a un 95-98%, y dependiendo de la glándula de la que la obtengamos varía su contenido en minerales, electrolitos, hormonas, enzimas, inmunoglobulinas, citoquinas y otros compuestos. Su pH es de 6.0-7.0.

Los múltiples componentes de la saliva protegen la integridad de los tejidos orales y pueden proporcionar información sobre enfermedades locales y sistémicas. Aunque el valor diagnóstico de los marcadores biológicos debe ser evaluado en función de cada entidad en particular, la saliva es una herramienta útil para identificar y monitorear la enfermedad, y bien vale la pena explorar en este sentido debido a la simplicidad de la recolección de muestras (Wang y cols. 2015; Tóthová y cols. 2015; Valko y cols. 2007).

La saliva ofrece muchas ventajas como un fluido de diagnóstico:

- colección no invasiva y muy fácil.
- la recogida de muestras se puede repetir indefinidamente.
- fácil almacenamiento y transporte de la muestra.

Pero uno de los obstáculos para su uso es la falta de conocimiento sobre el comportamiento variable de los analitos en muestras de saliva. La presencia de analitos en la saliva es debido a su fuga de la sangre, a la producción local



en las glándulas salivales, o ambos. Sus concentraciones pueden variar dependiendo del flujo salival o la concentración de proteína total (Iannitti y cols. 2012), por lo que son necesarios los estudios futuros para aclarar las dudas existentes.

La saliva como medio diagnóstico permite reconocer las concentraciones de una serie de componentes tanto endógenos como exógenos presentes en el organismo, los avances científicos y tecnológicos recientes están produciendo mejoras continuadas en aspectos como la determinación de los componentes salivales, la obtención de muestras comparativas y el aumento de la especificidad y la sensibilidad de los procedimientos utilizados. Estos progresos apuntan hacia una nueva era, en la que tendrá gran importancia el diagnóstico molecular en la cavidad bucal (Slavkin HC. 1999).

En la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios a cerca de la patología de LPO a través de la saliva.

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y antioxidantes. Un exceso de especies de oxígeno reactivo (ROS) puede dañar los lípidos, las proteínas o el ADN, inhibiendo sus funciones normales. Como resultado, el estrés oxidativo se ha relacionado con diversas enfermedades, como aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y el envejecimiento. Una reducción de la capacidad antioxidante de la saliva también se asocia con la enfermedad periodontal y la caries dental (Valko y cols. 2007).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante (Antolovich y cols. 2002; Cintra y cols. 2001; Moreira y cols. 2003; Robards y cols. 1999) ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a



sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional a la concentración (Arena y cols. 2001; Moyer y cols. 2002).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios.

El ensayo de Capacidad Antioxidante Total (TAC: Total Antioxidant Capacity) ofrece muchas ventajas y es considerada una herramienta útil como marcador del estrés oxidativo en fluidos corporales y tejidos, y también es utilizado como una herramienta apropiada para la evaluación de la terapia antioxidante. La capacidad antioxidante total también puede ser empleada para valorar, individualizar y dar seguimiento a la efectividad de un tratamiento antioxidante y no sobremedicar o dar tratamientos insuficientes al paciente (Wilfredo Mañón Rossi, Gabino Garrido, Alberto J. Núñez Sellés 2016).

Diversos estudios tanto en suero como en saliva han demostrado que hay daño oxidativo con disminución de la defensa antioxidante y el aumento de los lípidos, ADN y proteínas en el liquen plano (Sander y cols. 2005), y que los pacientes con LP presentan niveles mayores de óxido nítrico (NO), malondialdehído (MDA) y superóxido dismutasa (SOD), y niveles menores de catalasa eritrocítica (CAT) comparado con los controles (Sezer y cols. 2005). La investigación de los marcadores del estrés oxidativo como un medio para explicar el papel que la saliva podría desempeñar en la patología de LPO es escasa y está mal documentada.

A continuación se muestra una Tabla 1.5 con los autores que han investigado el estrés oxidativo con relación al liquen plano oral:



Tabla 1.5. Estrés oxidativo - liquen plano

AUTOR	PACENTES	MUESTRA	METODO DE MEDIDA	RESULTADOS
Nagao y cols. 2001	Liquen plano 62 (58 reticular, 4 atrófico y erosivo) 248 Control	Suero	Retinol, a-tocoferol, Zeaxantina / luteína Y criptoxantina, Licopeno, a-caroteno Y b-caroteno	Bajos niveles de retinol sérico o carotenoides no son factores de riesgo para la aparición de liquen plano.
Sander y cols. 2005	Liquen plano	Tejido	(MDA), 4 - hidroxinonenale (4 - HNE), 8 - hidroxi - desoxiguanosina (8 - OHdG)	Modificaciones oxidativas defensa Pueden estar involucrados en procesos fisiopatológicos.
Battino y cols. 2008	20 Liquen plano 20 control	Saliva y suero	Ácido urico, GGT, y niveles de albúmina	Disminución de la saliva ácido úrico y un aumento de la gamma glutamil transferasa sérica (GGT), así como en la capacidad antioxidante total de la saliva.
Agha-Hasseini 2009	30 Liquen plano 30 control	Saliva no estimulada	Saliva MDA TAC	MDA más alto, sin TAC.
Sezer y cols. 2007	40 Liquen plano oral 40 control	Suero	NO, SOD, CAT	NO, MDA, CAT mayor LPO, CAT menor.
Ergun y cols. 2011	21 LP 20 control	Saliva y suero	La actividad antioxidante total (TAA) y la peroxidación lipídica	Aumento del estrés oxidativo y desequilibrio en el antioxidante.
Abdel-Karim 2012	30 Lichen plaus 20 control	Suero		Mayor nivel de suero y tejido NO, MDA y SOD nivel menor significativo de suero y tejido de CAT.
Vlkova y cols. 2012	16 pacientes con lesiones premalignas orales (leucoplasia, liquen plano, eritroplakia) 16 control	Saliva	Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), los productos avanzados de la proteína de oxidación (AOPP), los productos de glicación avanzada (AGE) y la capacidad antioxidante total (TAC).	TBARS salivar y AGEs fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles. No se encontraron diferencias en AOPP. El TAC y la expresión de la superóxido dismutasa fueron más bajos en los pacientes que en los controles de la misma edad. Disminución del estado antioxidante.
Agha-Hosseini y cols. 2012	32 LPO, 26 carcinoma oral 30 control	Saliva	MDA, la capacidad antioxidante total (TAC) y la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)	LPO y OSCC son más susceptibles a un desequilibrio de estado de estrés oxidativo antioxidante.
Abdolsamadi y cols. 2013	36 LPO 36 control	Saliva	TAC, MDA vitamina A, C y E	MDA fueron más altos Y la capacidad antioxidante total fue menor disminuir la vitamina C, E.
Lopez Jornet y cols. 2014	70 pacientes (40 con LPO y 30 control)	Saliva	MDA Capacidad antioxidante total	MDA fueron más altos Y la capacidad antioxidante total fue menor.
Batu y cols. 2015	18 LPO, 32 pacientes OLCR 18 controles saludables	Suero y saliva	Actividad de prolidasa, MDA, ácido siálico Y los productos avanzados de la proteína de la oxidación (AOPPs)	Aumento de la prolidasa y del estrés oxidativo y Desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante Fluidos de pacientes con LPO y LCR.
Hashemy y cols. 2016	25 pacientes con LPO y 23 control	Suero	La proteína C reactiva (PCR), (MDA) y la capacidad antioxidante total (TAC), todos estos Los factores fueron reevaluados después de 14 días de tratamiento	Aumento de la MDA y la disminución del TAC sérico en comparación con los sujetos sanos.
Kaur y cols. 2016	40 liquen plano 40 leucoplasia oral, 40 fibrosis submucosa oral 40 carcinoma de celula escamosas control	Saliva	ADN y daño lipídico con 8-hidroxi-2'-Desoxiguanosina (8-OHdG), malondialdehído (MDA) y vitaminas C y E	El carcinoma de células escamosas y los pacientes precancerosos mostraron niveles significativamente más altos de 8-OHdG salival y MDA y niveles más bajos de vitaminas C y E en comparación con los niveles en sujetos sanos normales.

*Superoxidodismutasa (SOD), Malondialdehído (MDA), Glutatión reducido (GSH), (TAOC) capacidad antioxidante total, glutathione peroxidasa (GPX) y Óxido nítrico (NO)



2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2.1 JUSTIFICACION E HIPÓTESIS

El liquen plano oral (LPO) es una enfermedad crónica mucocutánea, de carácter autoinmune e inflamatoria, de etiología desconocida, en la que los linfocitos T actúan agresivamente sobre las células de la capa basal del epitelio de la mucosa (Scully y Carrozzo, 2008). El LPO afecta a alrededor del 0,1-4% de la población y es más común en las mujeres. La etiopatogenia de esta patología es desconocida, aunque existen datos suficientes para sugerir que los mecanismos inmunológicos son fundamentales para el inicio y la continuación del proceso. En la actualidad se acepta que el LPO representa una respuesta inmune mediada por células en las que la interacción de los linfocitos-epitelio tiene lugar contra antígenos de los queratinocitos epiteliales basales que culmina en la degeneración hidrópica de la capa basal del epitelio (Scully y Carrozzo, 2008; Roopashree y cols. 2010; Van der Waal I., 2009; Bermejo Fenoll y cols. 2009; Van der Meij y cols. 2007).

Las manifestaciones clínicas se presentan como patrones (erosivos) ulcerosos, atróficos, reticulares, papulares y en placas. La lesión reticular es la forma más frecuente de LPO y aparece como una red de estrías blancas superpuestas, seguidas de patrones (erosivos) ulcerosos, atróficos y placas. El LPO reticular suele ser asintomático pero las formas atróficas y ulcerosas (erosivas) del LPO pueden causar síntomas que varían de sensación de ardor a dolor intenso. Las lesiones aparecen con frecuencia en ambos lados de la mucosa bucal y también en la lengua, encías o sitios múltiples.

La posible malignización del liquen plano oral sigue en la actualidad como un tema de controversia, este riesgo de malignización sugiere la realización de nuevas investigaciones a fin de determinar los factores involucrados en este proceso.

Por lo tanto las opciones terapéuticas más comunes para el tratamiento de LPO incluyen corticosteroides, retinoides, ciclosporina, tacrólimus, fototerapia y cirugía, aunque el tratamiento a menudo produce efectos adversos (Scully y Carrozzo, 2008; Van der Waal, 2009; Roopashree y cols.



2010; Lodi y cols. 2012; Mignogna y cols. 2007; Van der Meij y cols. 2007), por lo que se sigue investigando para poder llegar a la utilización de otros productos como por ejemplo la camomila que sean eficaces, no tan agresivos y sin los efectos secundarios que puedan llegar a tener los anteriores.

La producción de radicales libres es uno de los mecanismos de acción implicados en la patogenia de la carcinogénesis. Evidenciar que existe una posible asociación entre el aumento de la producción de radicales libres y/o disminución de los componentes del sistema de defensa (estrés oxidativo) con el curso clínico de estas patologías, posibilita un mejor conocimiento de las mismas para intentar influir positivamente en la evolución clínica de los pacientes afectados.

La medición de la actividad antioxidante total en los fluidos corporales puede servir como un biomarcador de diagnóstico y como una herramienta innovadora para evaluar la progresión de la enfermedad.

Por lo tanto las hipótesis de nuestro estudio son las siguientes:

- Determinar si hay una relación directa de los niveles en saliva del estrés oxidativo con la patología de liquen plano oral.
- Analizar el efecto positivo de la aplicación tópica del gel de camomila en las lesiones de la patología del liquen plano oral.
- Demostrar que un aumento del estrés oxidativo y un desequilibrio en el sistema de defensa antioxidante están involucrados en la patogénesis del liquen plano oral.



2.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo pueden ser descritos en dos niveles; un objetivo general que determina el planteamiento global de la investigación, y unos objetivos específicos que articulan y ordenan los diversos aspectos del objetivo general.

Por lo tanto el **objetivo principal** es analizar el estrés oxidativo en la saliva de pacientes con LPO y ver la eficacia de la camomila tanto a nivel clínico como bioquímico en la mejora de dicha patología.

El objetivo general ha sido desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la posible presencia de estrés oxidativo en la saliva completa no estimulada de los pacientes con LPO respecto a un grupo control.
2. Analizar la eficacia clínica de la aplicación tópica de la *Chamaemelum nobile* al 2% durante un mes de tratamiento frente a placebo en pacientes con LPO.
3. Determinar el posible efecto de la aplicación tópica de *Chamaemelum nobile* sobre los marcadores salivales en pacientes con LPO.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. PACIENTES Y MÉTODO

3.1.1. POBLACION DE ESTUDIO

La población de nuestro estudio incluye pacientes diagnosticados de Liqueen plano oral por el departamento de Medicina Bucal situado en la Clínica Odontológica del Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia.

3.1.1.1. En este estudio se llevaron a cabo una serie de criterios de inclusión y exclusión a la hora de la selección de los [pacientes con patología de LPO](#) participantes:

3.1.1.1.1. Criterios de inclusión:

- Ser paciente mayor de 18 años.
- Tener un diagnóstico clínico e histopatológico de LPO con los criterios clínicos e histopatológicos para LPO propuestos por Van der Waal (2009).
- Sintomatología de LPO mayor de una puntuación 2 en una escala EVA.
- No haber recibido ningún tratamiento para la LPO en las dos últimas semanas si se trataba de tratamiento tópico, o en las últimas cuatro semanas en el caso de las terapias sistémicas
- Firma del consentimiento informado escrito antes de participar en el estudio.



Tabla 3.1 Criterios diagnósticos (Van der Meij 2003)

CRITERIOS CLÍNICOS

- Presencia de lesiones bilaterales, más o menos simétricas.
- Presencia de estrías blancas (forma reticular).
- Las lesiones erosivas, atróficas, bullosas y tipo placa son sólo aceptadas como un subtipo en la presencia de lesiones reticulares en otro lugar de la mucosa oral.
- Para todas las lesiones que se parecen al LPO pero no completan el criterio mencionado debería ser usado el término “clínicamente compatible con”.

CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS

- Presencia de infiltrado en banda bien definido que es reducido a una parte del tejido conectivo y que consiste principalmente de linfocitos.
- Signos de “degeneración hidrópica” en la capa basal celular.
- Ausencia de displasia epitelial.
- Cuando las características histopatológicas son menos obvias debería ser usado el término “histológicamente compatible con”.

DIAGNÓSTICO FINAL

Para llevar a cabo un diagnóstico final deben ser incluidos tanto los criterios clínicos como histopatológicos, ya que el diagnóstico de LPO requiere el cumplimiento de ambos criterios.

3.1.1.1.2. Criterios de exclusión:

- Tener un LPO asintomático.
- Alergias a algunos de los componentes del producto.



- Consumo de fármacos desencadenantes de reacciones liquenoides.
- Lesiones de LPO en contacto con amalgamas de plata.
- Presencia de displasia en la histopatología del LPO.
- Estar embarazada o en lactancia.
- No firmar el consentimiento informado.
- Haber recibido tratamiento previo para el LPO en las 2 o 4 últimas semanas.
- Medicación con un inmunosupresor.
- Enfermedad periodontal .

3.1.1.2. Los pacientes pertenecientes a la patología de síndrome de boca ardiente (SBA) tomados en este estudio también fueron sometidos a criterios de inclusión y exclusión a la hora de la selección:

3.1.1.2.1. Criterios de inclusión:

- Ser paciente mayor de 18 años.
- Diagnóstico positivo de SBA según Scala (2003): Se caracteriza por la presencia de sensación de ardor, escozor u otras disestesias orales, como sensación de arenilla o de una mucosidad molesta sobre la mucosa oral; sin embargo, no se observan en la exploración clínica lesiones anormales ni se acompaña de alteraciones de laboratorio. Según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Cefaleas (Clasificación Internacional de las Cefaleas, segunda edición), está clasificado bajo el epígrafe de causas centrales de dolor facial, y se define como una sensación dolorosa de ardor espontánea que se presenta sobre una mucosa oral sin lesiones ni hallazgos en la exploración.



3.1.1.2.2. Criterios de exclusión:

- Pacientes con antecedentes de malignidad de cabeza y cuello
- Pacientes con antecedentes de radioterapia en la cabeza y el cuello
- Diabetes mellitus mal controlada.
- Enfermedad tiroidea crónica.
- Síndrome de Sjögren conocido.
- Embarazo.
- Falta de voluntad para dar su consentimiento para participar.

3.1.1.3. El grupo control estaba formado por pacientes sanos reclutados consecutivamente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Murcia. Se excluyeron los pacientes que toman cualquier medicamento o con hábitos que podrían potencialmente interferir en el estudio, como inmunosupresores, antiinflamatorios no esteroideos. También se excluyeron los sujetos con enfermedad sistémica significativa (por ejemplo, diabetes mellitus, cáncer o enfermedad coronaria), o mujeres embarazadas o lactantes.

Para todos los pacientes se completó una historia clínica (datos de filiación, antecedentes personales y familiares, anamnesis, exploración clínica, odontograma) y se determinó la presencia de cualquier patología sistémica relevante o medicación que el paciente estuviese tomando en ese momento.

- Datos de filiación.
- Anamnesis.
- Antecedentes personales y familiares.
- Tratamientos farmacológicos.
- Hábitos tóxicos (tabaco, alcohol).
- Circunstancias personales.
- Exploración clínica.
- Odontograma.
- Exámenes complementarios.



A todos los pacientes se les realizó una historia clínica completa y una exploración de la cavidad oral minuciosa para determinar el tipo clínico de LPO (reticular-papular o atrófica-erosiva) y los sitios intraorales involucrados. La exploración intraoral y la toma de registro de datos se llevaron a cabo por un solo examinador, un especialista en medicina oral. Las lesiones orales se clasificaron como tipo reticular cuando aparecieran placas o estrías blancas o pápulas en ausencia de síntomas mientras que la forma erosiva se consideró cuando hubo lesiones eritematosas o ulceradas.

En el grupo de pacientes con LPO se anotaron las siguientes características clínicas de las lesiones de liquen:

- Tipo de LPO.
- Localización de las lesiones de LPO:
 - 1. Borde rojo labial
 - 2. Mucosa labial
 - 3. Mucosa yugal
 - 4. Mucosa alveolar
 - 5. Encía
 - 6. Paladar duro
 - 7. Mucosa faucial
 - 8. Dorso lingual
 - 9. Vientre lingual
 - 10. Suelo de la boca
- Presencia y distribución de las lesiones de liquen plano
- Tiempo de evolución de las lesiones de liquen en boca
- Necesidad de tratamiento local con corticoides en el momento del estudio.
- En este grupo de pacientes, se valoró la sintomatología de las lesiones de LPO en el momento de la visita.



3.1.2. VARIABLES CLÍNICAS DE ESTUDIO

A todos los pacientes se les realizó un protocolo incluido en el anexo 4.

- Se realizó una historia clínica para cada paciente, estos fueron sometidos a una exploración clínica oral y la **severidad del LPO** se evaluó mediante la puntuación **Thomgprasom** (2003), de 0 a 5 puntos.

- 0: no lesión.
- 1: estrías blancas, no área eritematosa.
- 2: estrías blancas con áreas atróficas < 1cm².
- 3: estrías blancas con áreas atróficas > 1cm².
- 4: estrías blancas con áreas erosivas < 1cm².
- 5: estrías blancas con áreas erosivas > 1cm² o lesión ulcerativa.

- **Escala Visual Analógica (EVA) sintomatológica**

La intensidad de los síntomas orales (dolor, ardor o escozor) fue registrada mediante una Escala Visual Analógica de 10 cm de longitud, donde el cero equivale a la ausencia de dolor y el valor 10 a la existencia de sintomatología extrema.

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

- **Perfil de Impacto de Salud Oral (OHIP-14)**

Este test mide como influyen las enfermedades orales en el impacto social de sentirse bien. Consiste en 14 preguntas que capturan las siete dimensiones formuladas en el modelo teórico de salud oral de Locker:

1. Limitación de la función.
2. Dolor físico.



3. Discomfort psicológico.
4. Incapacidad física.
5. Incapacidad psicológica.
6. Incapacidad social.
7. Discapacidad.

Cada pregunta se contesta en función de una escala Likert de puntuación (de 0 a 4 puntos):

- 0 = nunca.
- 1 = casi nunca.
- 2 = ocasionalmente.
- 3 = bastante frecuente.
- 4 = muy frecuente.

El OHIP-14, a diferencia de otros test de calidad de vida, presenta un valor resumen final del test, el OHIP-14 (todos los items) cuyo valor indica la mejor o peor calidad de vida oral del paciente: $14 \text{ (items)} \times 0-4 \text{ (rango posible de respuesta tipo Liker)} = 0 \text{ (mejor calidad de vida oral)}/196 \text{ (peor calidad de vida oral)}$.

➤ **Escala de Ansiedad- Depresión (H.A.D)**

Se utiliza la versión en castellano de la escala de ansiedad y depresión hospitalaria (HAD) de Zimong y Snaith. Esta escala está compuesta de 14 items, puntuables mediante escala Liker de 0 a 3 (donde el 0 indica la menor ansiedad o depresión, y el 3 la mayor ansiedad o depresión).

La parte de la encuesta dedicada al estudio de la ansiedad (7 preguntas) puede ser puntuada desde 0 a 21 (donde la puntuación de 8 -10 es el límite a partir del cual el paciente puede considerarse ansioso).

Finalmente, la parte de la encuesta dedicada al estudio de la depresión (7 preguntas) puede ser puntuada desde 0 a 21 (donde la puntuación).



➤ **Test de drenaje**

Para la recogida del fluido el paciente debe depositar la saliva producida en un recipiente graduado durante un periodo de tiempo de cinco minutos. Las muestras se recogieron de forma estandarizada entre las 10:00 y las 12:00 horas de la mañana en la Clínica Odontológica Universitaria del Hospital Morales Meseguer de la Región de Murcia según los protocolos estándar.

➤ **El Inventario de Xerostomía (Xerostomía Inventory)**

Este cuestionario se compone de 11 ítem referidos a las últimas cuatro semanas, se valorará la frecuencia con la que los pacientes padecen sequedad bucal, así como también sequedad cutánea, conjuntiva y olfatoria. Las respuestas generadas por el paciente serán de 0 a 5, mayor puntuación indica mayor severidad de la xerostomía.

Tabla 3.2. Test de severidad para xerostomía (Xerostomia Inventory)
(Thomson y cols., 1999) referido en las últimas 4 semanas: desde una
puntuación de 0 Nunca hasta 5 Siempre

	Nunca (0) (1) (2) (3) (4) (5) Siempre
1. ¿Con qué frecuencia ha sentido su boca seca?	
2. Mi boca está seca	
3. Mis labios están secos	
4. Me levanto en mitad de la noche a beber líquido	
5. Mi boca está seca cuando como comida	
6. Tomo líquidos para ayudarme a tragar la comida	
7. Chupar caramelos mejora la sensación de boca seca	
8. Mi garganta está seca	
9. La piel de mi cara está seca	
10. Mis ojos están secos	
11. El interior de mi nariz está seco	

Todos los pacientes pertenecientes al estudio (LPO y control) no tenían lesiones periodontales inflamatorias ni visibles lesiones de caries detectadas después de una exploración llevada a cabo por un experimentado odontólogo.

3.2. PRODUCTOS DEL ESTUDIO

Los productos utilizados fueron *Chamaemelum nobile* al 2% y un placebo de composición idéntica pero sin el ingrediente de manzanilla. Tanto los pacientes como los investigadores no conocían la asignación de grupos (tratamiento/placebo). Los geles (0,5 ml) se aplicaron de manera uniforme en la cavidad oral tres veces al día en las áreas que presentaron síntomas durante un período de 4 semanas.



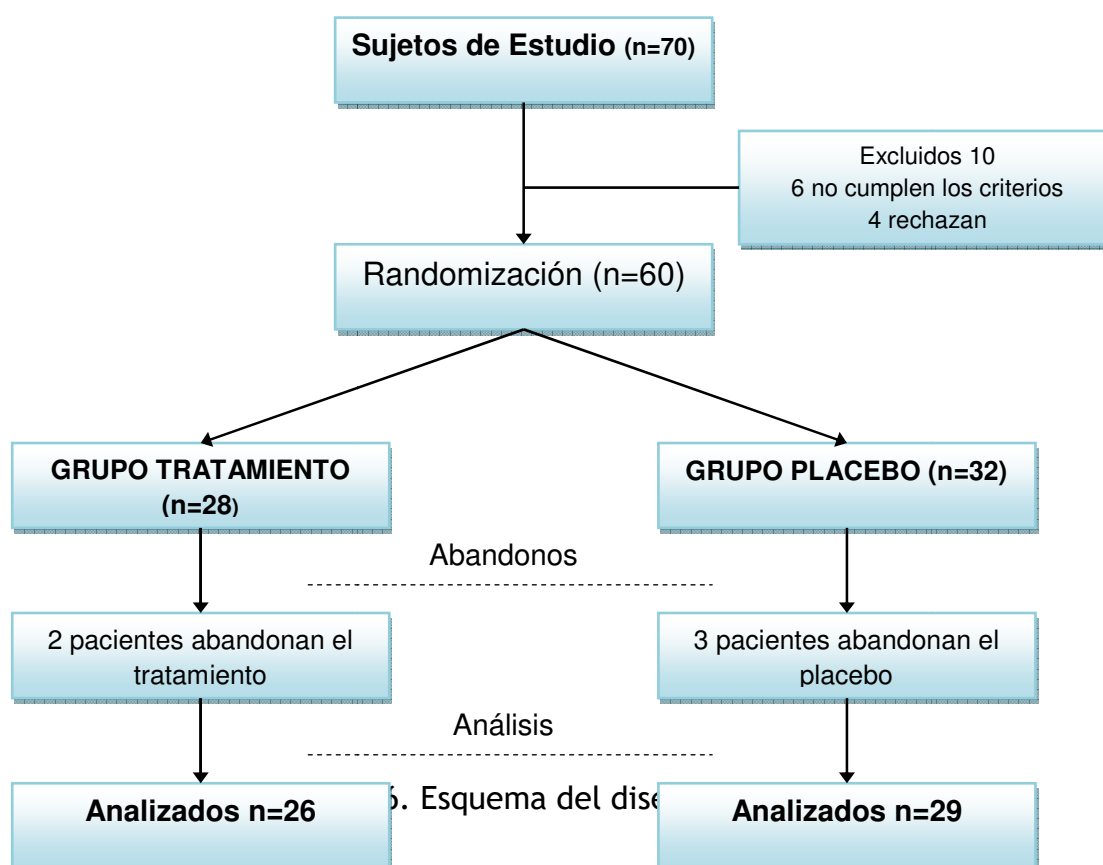
Figura 5. Botella utilizada en el estudio para cada paciente, el color ámbar es para no poder distinguir entre tratamiento y placebo.

3.3. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio en el que utilizamos como producto la camomila se trata de un ensayo clínico, aleatorizado, controlado, prospectivo y a doble ciego. Se incluyeron finalmente a 60 pacientes durante un periodo de 4 semanas de duración (número de registro de prueba Identificador: NCT02421770). Se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki (Anexo 9.5), y fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia (Anexo



9.3). Cuando un sujeto decidía interrumpir su participación en el estudio, el investigador siempre debía contactar con el mismo para obtener información sobre los motivos de la interrupción y los posibles acontecimientos adversos. Siempre que fuera posible, el sujeto acudiría a una visita de control final en el momento de la interrupción o al cabo de poco tiempo de interrupción de la misma. Esquema del diseño del estudio figura 6:



❖ PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS:

- Visita 1 (día 0): Durante la primera visita de los pacientes se le realizaron los siguientes procedimientos:
 - Verificación de los criterios de inclusión.
 - Realización de la historia médica.
 - Firma del consentimiento informado.
 - Exploración de la cavidad oral.



- Registro de la intensidad del dolor mediante la escala EVA, así como su localización.
 - Registro del test de OIHP-14.
 - Registro del test de xerostomía.
 - Drenaje a cinco minutos del flujo salivar.
 - Registro de los test de ansiedad-depresión (HDA).
- Visita 2 (15 días desde el día 0): Se realizó una llamada telefónica a los pacientes para preguntarles como llevaban el tratamiento, si notaban mejoría de sus síntomas así como la aparición de algún efecto adverso; y para motivarles a continuar con el mismo.
- Los cuestionarios que se pasaron a los 15 días fueron:
- EVA
 - Registro del test de OIHP-14
 - Registro del test de xerostomía
- Visita 3 (30 días desde el día 0): En la tercera visita se les realizó los siguientes procedimientos para finalizar el estudio:
- Exploración de la cavidad oral
 - Test de intensidad del dolor (EVA)
 - Drenaje a cinco minutos
 - Test OIHP-14
 - Test de xerostomía
 - Test de ansiedad-depresión

TEST DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Para valorar la respuesta al tratamiento se siguieron unos criterios establecidos por Carrozo y Gandolfo (1999).



Respuesta al tratamiento:

- Completa remisión (CR): pocos o ningún síntoma; las lesiones desaparecen o quedan estrías blancas.
- Parcial remisión (PR): los síntomas se han reducido; hay estrías blancas con áreas eritematosas.
- No respuesta (NR): los síntomas persisten y las lesiones han empeorado.

REGISTRO DE FLUIDO SALIVAL

Se les pidió a los pacientes que se abstuvieran del cepillado de dientes o tomar alimentos o cualquier otra sustancia, por ejemplo, medicamentos o cosméticos labiales antes de la recogida de saliva. Cada paciente se enjuagó la boca con agua destilada. Todas las muestras se recogieron a temperatura ambiente, que era estable. La saliva no estimulada se obtuvo utilizando el método de drenaje (Navazesh y Kumar, 2008), sin movimientos de masticación, en viales de plástico seco, con el sujeto de prueba sentado en una posición relajada durante un tiempo de 5 min. En todos los casos, las muestras de saliva fueron tomadas por la mañana entre las 10:00 y las 12:00 horas. La presencia de contaminación como por ejemplo: sangre en las muestras fueron retiradas del estudio por escala de inspección visual. La saliva se centrifugó inmediatamente después de la recogida a 3000g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf y se almacenó a - 80°C hasta su análisis.



Figura 7. Recogida de saliva mediante drenaje



3.4. EL ANÁLISIS ANTIOXIDANTE

ENSAYO DE TEAC1

TEAC1 se basó en el método descrito por Arnao y cols. (1998). En resumen, ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) es un sustrato de peroxidasa, que cuando se oxida en presencia de H_2O_2 en una reacción de peroxidación, genera un radical catión radical ($ABTS \cdot^+$) (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

La formación de $ABTS^{\cdot+}$ produce un color azul verdoso y los antioxidantes presentes en la muestra suprimen esta producción de color en un grado que se considera proporcional a sus concentraciones. $ABTS^{\cdot+}$ se generó utilizando HRP, H_2O_2 y ABTS. Para realizar el ensayo, se añadieron 5 μ L de la muestra al medio de reacción que contenía ABTS 2 mmol/L, HRP 0,25 μ mol/L y 40 μ mol/L de H_2O_2 en tampón fosfato 50 mmol/l (pH 7,5); la desaparición del radical se estimó por la disminución en la absorbancia a 700 nm. El método fue calibrado con las soluciones Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, EE.UU.) con concentraciones de entre 0,045 y 2 mmol/L. Los resultados del ensayo se expresaron en milimoles de equivalentes Trolox por litro.

ENSAYO DE TEAC2

TEAC2 se determinó utilizando el método descrito por Erel (2004), basado en la decoloración de 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) por antioxidantes según sus concentraciones y capacidades antioxidantes. El cambio de color se midió como un cambio en la absorbancia de luz a 660 nm. El ensayo se calibró con Trolox y la actividad se expresó como $mmol L^{-1}$. Todos los analitos se analizaron con un analizador automático (AU 600 analizador bioquímico automatizado, Olympus, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.).



ENSAYO DE CUPRAC

El ensayo CUPRAC se basa en la reducción de Cu^{2+} en Cu^{1+} por la acción de los antioxidantes no enzimáticos presentes en la muestra. El complejo oxidante consistió en Cu^{2+} ácido -bathocuproinedisulfonic (Cu^{2+} -BCS) (sal disódica del ácido bathocuproinedisulfonic), que reacciona con los antioxidantes de la muestra y se reduce a un ácido Cu^{1+} -bathocuproinedisulfonic (Cu^{1+} -BCS), un complejo estable que tiene una absorbancia máxima a 490 nm (Campos y cols. 2009). Se supone que la capacidad antioxidante de la muestra que es igual a la extensión de la formación del complejo Cu^{1+} -BCS. Para el ensayo se utilizaron las concentraciones finales de 0,25 mmol/L de sal de ácido bathocuproinedisulfonic disódico (reactivo 1) y 0,5 mmol/L CuSO_4 (reactivo 2). En resumen, se pipeteó un volumen 5 μL de muestra. A continuación, se añadieron 195 μL del reactivo 1 y se tomó una primera lectura. Posteriormente se añadieron a la reacción 50 μL del reactivo 2, se tomó una segunda lectura y se utilizó la diferencia entre la primera y la última absorbancia para calcular la actividad antioxidante. La solución de Trolox en concentraciones de 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,0 mmol/L se utilizó para calibrar el ensayo. Los resultados obtenidos de las muestras de ensayo se compararon con una curva estándar obtenida con Trolox y se expresaron en milimoles de equivalentes de Trolox por litro.

ENSAYO FRAP

La medida de FRAP (férico reduciendo la capacidad de plasma) se basó en el método descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. El método se basa en el principio de que los antioxidantes presentes en la muestra reducen el complejo férrico-tripiridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) a la tripiridyltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), que tiene un color azul. La intensidad del color es proporcional a la capacidad reductora de los antioxidantes principalmente no enzimáticos en el plasma (Benzie y Strain, 1996). En resumen, se pipetearon 300 μL de reactivo FRAP recién preparados y se



añadieron 10 μ L de muestra al reactivo. Se tomaron lecturas de absorbancia a 600 nm antes y después de la adición de la muestra. La curva de calibración se obtuvo con concentraciones conocidas (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mmol/L) de solución de Fe (II), y los resultados se expresaron en milimoles equivalentes de Fe (II) por litro.

El estado de **OXIDACIÓN DE LA PROTEÍNA SALIVAL** se evaluó midiendo las concentraciones avanzadas de producto de proteína de oxidación (AOPP) como se describe por Witko-Sarsat y cols. (1996) con algunas modificaciones. En resumen, se mezclaron 50 μ L de muestra con 160 μ L de yoduro de potasio 0,074 mol/L y 25 μ L de ácido acético (50%), y se incubaron a 37°C durante 40 segundos. Se tomó nota de la absorbancia a 340 nm. Se usó cloramina-T (0 a 500 μ mol/L) para generar una curva de calibración. El coeficiente de variación intra-ensayo fue inferior al 10% para las muestras de saliva.

Las **ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO (ROS)** se estimaron mediante el ensayo de quimioluminiscencia mediado por luminol (Vong y cols. 2014). Se mezclaron 10 μ L de muestra de saliva con 90 μ L de NaCl (0,9%), 125 μ L de luminol (0,5 mmol/L) y 25 μ L de peroxidasa de rábano (HRP, 0,025 mmol/L). La quimioluminiscencia se midió con una microplaca (VICTOR 1420 multilabel counter, PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy, Turku, Finlandia) en recuentos por segundo (cps) .El coeficiente de variación intra-ensayo fue inferior al 11% para las muestras de saliva.

La actividad esterásica total (**TEA**) se analizó midiendo la hidrólisis del acetato de p-nitrofenol como p-nitrofenol como se ha descrito previamente por Tecles y cols. (2016). La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad de generación del producto de la hidrólisis 4-NA, 4-nitrofenol, a 405 nm, pH 7,4 (absortividad molar 14.000 M⁻¹cm⁻¹) y expresado en UI/L. Las propiedades no enzimáticas de la hidrólisis de 4-NA se restaron de la hidrólisis total sustituyendo la muestra de saliva por agua desionizada.



NO, NITRATOS Y NITRITOS en muestras de saliva se midieron de acuerdo con los métodos descritos por Miranda y cols. (2001), con algunas modificaciones según García-Robledo y Sokratis Papaspyrou (2014). Los coeficientes de variación intra-ensayo de nitratos, salitre y nitratos fueron inferiores al 11%, 7% y 15%, respectivamente.

Las **CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA C-REACTIVA (PCR)** se midieron en saliva usando TR-IFMA propio. Se pipetearon 200 ng/pocillo de anticuerpos anti-PCR de cabra biotinilados en pocillos de microtitulación revestidos con estreptavidina y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las tiras 4 veces y se añadieron 200 ml/pocillo de muestras o patrones disueltos en tampón de ensayo (Tampón de Ensayo, PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy, Turku, Finlandia). Ambas muestras y patrones se incubaron durante 1 hora, y después de un segundo lavado, se añadieron a cada pocillo 200 ml de anticuerpos anti-CRP de ratón etiquetados con europio. Las tiras se incubaron durante 45 minutos y después se lavaron de nuevo. Finalmente, se añadieron 200 ml/pocillo de solución de mejora y se incubaron las tiras durante 5 min. La fluorescencia mejorada, proporcional a la cantidad de PCR en la muestra, se midió con un contador multilabel (contador multilabel VICTOR 1420, PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy, Turku, Finlandia).

Todos los analitos mostraron coeficientes de variación inter e intra-ensayo inferiores al 15%.



3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se registraron como medianas y percentiles (a menos que se indique lo contrario). Estos fueron calculados utilizando procedimientos descriptivos estadísticos y software rutinario (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se evaluaron para la normalidad de la distribución aproximada mediante la prueba de D'Agostino y Pearson, dando una distribución no paramétrica; se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar T1 y T2 dentro de los grupos, y para hacer comparaciones entre los grupos. Las correlaciones entre las variables se estimaron usando análisis de correlación de Spearman. El nivel de significación se estableció como $p < 0,05$. Para contrastar si el cambio entre las mediciones (antes de comenzar y a las 4 semanas) depende del grupo (tratamiento o placebo), se ha realizado el análisis Modelo Lineal General (MLG): ANOVA factorial mixto o ANOVA de medidas parcialmente repetidas. Este análisis nos permitirá estudiar el efecto que sobre las variables dependientes (clínicas, dolor, drenaje y xerostomía) ejercen los factores intra-sujeto (antes y a las 4 semanas) e inter-sujeto (grupo) y la interacción de éstos y la significación estadística en ellos.



4. RESULTADOS



4.1. ESTRÉS OXIDATIVO EN SALIVA DE LPO VERSUS CONTROLES VERSUS SBA

La muestra estudiada estaba formada por tres grupos de pacientes el grupo 1 (n=31) control; el grupo II por pacientes con LPO (n=20) y el último (n=19) por pacientes con síndrome de boca ardiente (SBA). Las características generales de las muestras se muestran en la tabla 4.1. Al estudiar las variables clínicas de cada uno de los grupos observamos la presencia de xerostomía más alta en el grupo de pacientes con SBA con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.1. Características generales de las muestras

	Control n=31	LPO n=20	SBA n=19	P
Edad	33,0 (18,0 - 67,0)	57,5 (37,0 - 75,0)	70,0 (54,0 - 83,0)	0,008
Sexo, M/F	11/20	0/20	1/19	NS
Evolución		2,0 (0,5 - 9,0)	2,5 (1,0 - 5,0)	NS
OHIP-14		10,0 (2,0 - 36,0)	18,5 (4,0 - 40,0)	0,07
Inventario de xerostomía		14 (3 - 31)	26 (5 - 45)	0,003

La capacidad antioxidante total salival se determinó por los métodos TEAC1, TEAC2, CUPRAC y FRAP y fue estadísticamente significativamente mayor en pacientes con LPO y SBA, en comparación con el grupo control (Tabla 4.2). ROS fue menor en los dos grupos de pacientes comparándolos con controles sanos ($P < 0,001$ en ambos casos). AOPP, NO y nitratos fueron mayores en ambos grupos de pacientes, aunque la significación estadística respecto al grupo de control se observó sólo en el grupo de LPO.

El grupo de LPO mostró mayores niveles de PCR salival estadísticamente significativos en comparación con los niveles en pacientes sanos y con SBA (Figura 8).

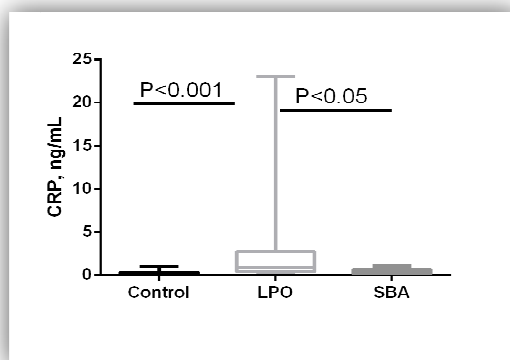


Figura 8. Concentración de proteína C reactiva salival (CPR) en controles sanos (n = 31), y pacientes con LPO (n = 20) y SBA (n = 19). Las líneas horizontales muestran valores medianos, los recuadros muestran entre 25 y 75 percentiles.

Correlaciones de grupos LPO:

Se identificaron correlaciones entre el inventario de xerostomía. Resultados y TEAC1 (mM; $r = 0,526$; $P = 0,011$); FRAP (mM, $r = 0,509$, $P = 0,013$); CUPRAC (mM; $r = 0,477$; $P = 0,019$); Y TEAC2 (mM, $r = 0,466$, $P = 0,022$).

Correlaciones del grupo SBA:

Se identificaron correlaciones entre el inventario de xerostomía. Resultados y ROS ($r = 0,548$, $P = 0,008$), y Nitratos ($R = 0,462$, $P = 0,043$). También se identificaron correlaciones entre la puntuación media de la calidad de vida de OHIP-14 y ROS ($R = 0,635$, $P = 0,002$).

Tabla 4.2. Datos medios (25-75 percentiles) de marcadores de estrés oxidativo salival en controles sanos (n = 31) y pacientes con LPO (n = 20) y SBA (n = 19).

Analito	Control	LPO	SBA
TEAC1, mmol/L	0,296 (0,210 - 0,541)	0,546 (0,468 - 0,771)***	0,478 (0,389 - 0,678)*
TEAC2, mmol/L	0,172 (0,128 - 0,303)	0,305 (0,237 - 0,519)***	0,261 (0,197 - 0,449)*
CUPRAC, mmol/L	0,154 (0,104 - 0,245)	0,282 (0,223 - 0,493)***	0,265 (0,194 - 0,422)**
FRAP, mmol/L	0,249 (0,169 - 0,677)	0,613 (0,478 - 1,085)***	0,844 (0,397-0,878)**
TEA, IU/L	61,45 (30,44 - 68,30)	49,78 (29,23 - 59,97)	45,70 (36,11 - 68,53)
AOOP, umol	226,4 (107,4 - 360,6)	448,1 (305,3 - 1577,0)**	331,7 (1334,9 - 568,2)
ROS, cps	39679 (38033 - 40944)	29600 (29525 - 29914)***	29707 (29497 - 29952)***
NO, umol	17,85 (10,94 - 88,60)	145,7 (107,6 - 326,1)*	159,3 (20,35 - 245,7)
Nitritos, umol	22,02 (7,10 - 83,95)	141,0 (76,95 - 328,8)**	95,75 (32,95 - 203,2)
Nitratos, umol	17,62 (1,41 - 72,25)	23,85 (2,01 - 70,93)	29,00 (0,75 - 94,00)

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ vs. grupo control.



4.2. EFICACIA CLÍNICA DE LA *CHAMAEMELUM NOBILE* AL 2% /PLACEBO EN PACIENTES CON LPO APLICADO DE FORMA TÓPICA EN GEL DURANTE UN PERIODO DE 4 SEMANAS

4.2.1. Características de la población de estudio de pacientes con LPO .

Se incluyeron 60 pacientes con LPO de los cuales del grupo de tratamiento finalizaron 26 y del grupo placebo 29. Al final del tratamiento la muestra estaba formada por 55 pacientes entre pacientes de LPO y control. En la tabla 4.3 se observan las características de edad, sexo y hábitos de cada uno de los grupos (prueba t de Student y χ^2 de Pearson).

Tabla 4.3. Edad, sexo y hábitos de cada uno de los grupos (prueba t de Student y χ^2 de Pearson)

	Tratamiento (n=26)	Placebo (n=29)	p
Edad. media (SD)	63,1 (14,3)	62,8 (10,3)	0,917
Sexo			0,251
Hombre	10 (38,5)	7 (24,1)	
Mujer	16 (61,5)	22 (77,9)	
Tabaco			0,786
Sí	6 (23,1)	5 (17,2)	
No	19 (73,1)	22 (75,9)	
Ex fumador	1 (3,8)	2 (6,9)	
Alcohol			0,550
Sí	3 (11,59)	2 (6,9)	
No	23 (88,5)	27 (93,1)	

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos considerando las medidas de pretratamiento (tabla 4.4). Estos resultados permiten ofrecer garantías de que los resultados observados indican que no hay sesgo en la formación de los grupos en relación a las variables de resultado antes del tratamiento. Con esto podremos garantizar que los grupos son homogéneos en los niveles pre de las variables y por tanto comparables con los niveles posteriores al analizar las variables clínicas.



Tabla 4.4. Características clínicas de cada uno de los grupos antes de iniciar el estudio

	Tratamiento (n=26)	Placebo (n=29)	
	Mediana; IQR	Mediana; IQR	p-valor
GRADO1	2; 2-4	2; 2-4	0,586
DOLOR 1	5; 4-6	4; 3-5	0,065
ARDOR1	3; 1-5	3; 1-4	0,473
ESCOZOR1	1; 0-5	2; 0-4	0,599
THONGPRASOM 1	2; 2-2	1; 1-2	0,100
ANSIEDAD1	7; 5-9	8; 6-10	0,277
DEPRESION1	4; 1-6	6; 2-8	0,079
OHIP-14 (1)	12; 10-15	12; 10-13	0,139

La prueba U de Mann-Whitney se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales.

En la Tabla 4.5 se presentan los descriptivos y contrastes estadísticos del análisis Modelo Lineal General (MLG): ANOVA de un factor con medidas repetidas para las variables con efectos significativos (principales o interacción). Cabe destacar, que cuando el efecto de la interacción es significativo, la interpretación de los efectos principales pierde importancia por lo que se procede a comentar la interacción.

En todas las variables la interacción de grupo y tiempo mostró un efecto significativo, lo que indica que el paso del tiempo influyó de manera distinta en los pacientes, dependiendo de si participó en el grupo de tratamiento o no. En el pre test las diferencias entre grupo no fueron significativas mientras que el post test el nivel de las variables en el grupo de tratamiento fue significativamente inferior con respecto al grupo placebo ($p < .001$). Por otra parte, en el grupo de tratamiento el nivel en las variables disminuyó significativamente del pre al post ($p < .001$), mientras que en el grupo placebo el cambio no fue significativo ($p > .05$). Las interacciones se muestran en la Figura 9.



Tabla 4.5. Análisis Modelo Lineal General MLG: Medias .desviación típica (DT) y contrastes estadísticos.

Variable (n)	Medidas		Efecto		
	Pre	Post	Grupo	Tiempo	Grupo*Tiempo
	Media (DT)	Media (DT)	p-valor (eta ²)	p-valor (eta ²)	p-valor (eta ²)
Dolor			0,107 (0,05)	<0,001 (0,75)	<0,001 (0,77)
Tratamiento(26)	5,15 (1,7)	1,88 (1,3)			
Placebo (29)	4,21 (1,8)	4,31 (1,9)			
Ardor			0,322 (0,02)	<0,001 (0,44)	<0,001 (0,37)
Tratamiento(26)	3,04 (2,3)	1,12 (1,5)			
Placebo (29)	2,66 (2)	2,52 (2,1)			
Escozor			0,204 (0,03)	<0,001 (0,21)	0,011 (0,12)
Tratamiento(26)	2,35 (2,6)	1,15 (1,5)			
Placebo (29)	2,59 (2,2)	2,38 (2,4)			
THONGPRASOM			0,738 (0,00)	<0,001 (0,51)	0,001 (0,19)
Tratamiento (26)	2,08 (0,9)	1,09 (0,5)			
Placebo (29)	1,72 (0,9)	1,64 (0,7)			
OHIP-14			0,470 (0,01)	<0,001(0,66)	<0,001 (0,53)
Tratamiento(26)	12,88 (3,5)	8,38 (3)			
Placebo (29)	11,48 (2,6)	10,86 (2,4)			
ANSIEDAD			0,258 (0,03)	0,307 (0,02)	0,044 (0,08)
Tratamiento(25)	7,2 (2,4)	7,32 (2,4)			
Placebo (25)	8,4 (3,6)	8,04 (3,4)			
DEPRESION			0,089 (0,06)	0,060 (0,07)	0,264 (0,03)
Tratamiento(25)	3,8 (2,9)	3,64 (2,9)			
Placebo (24)	5,38 (3,7)	5,33 (3,7)			

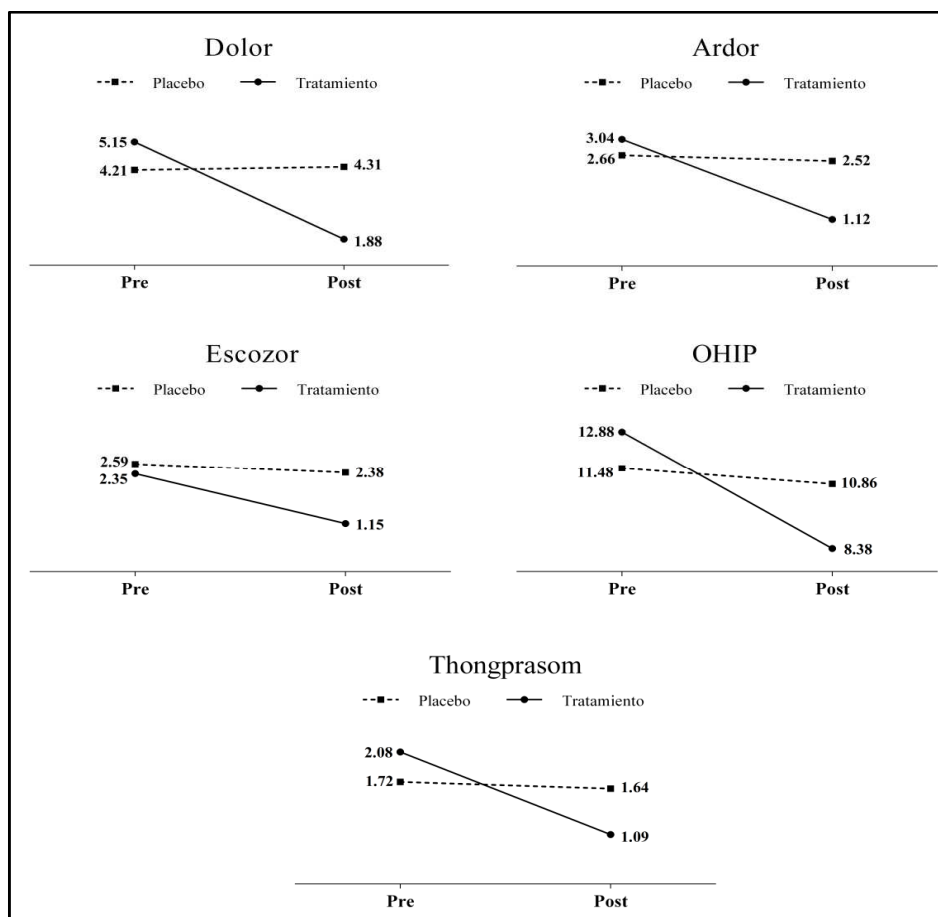


Figura 9. Efecto del tratamiento en las variables de estudio.

Como vemos en la figura anterior se ve una clara disminución del dolor en los pacientes sometidos al tratamiento, así como también un claro descenso del ardor y el escozor, por lo que se ve una notable mejoría de la sintomatología de estos pacientes. En los sujetos del grupo placebo no se observan cambios significativos pero también vemos mejoría en la calidad de vida de los pacientes del grupo de tratamiento y mejora de las lesiones.



Figura 10. Líquen plano oral en imagen 1 antes de tratamiento y en imagen 1a después de 4 semanas de tratamiento. Imagen 2: líquen plano oral en encía antes de tratarlo y en la imagen 2a después de 4 semanas de tratamiento con *Chamaemelum nobile* al 2%.

Tabla 4.6. Respuesta al tratamiento según los criterios de Carrozzo y Gandolfo (1999)
 $\chi^2(2)=31.71$; $p < .001$

	Tratamiento (n=26)	Placebo (n=29)
Respuesta	n (%)	n (%)
Completa	5 (19,2)	0
Parcial	19 (73,1)a	5 (17,2)b
No respuesta	2 (7,7)a	24 (82,8)b

Al analizar no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos respecto al tiempo de evolución de la patología de LPO (entre 6 meses y 8 años) con relación a la gravedad de las lesiones. La mediana de la gravedad



del LPO fue de grado 2 (2-4) en el grupo de tratamiento y 2 (2-4) en el grupo placebo, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.58$), por lo que no se relacionó la gravedad de las lesiones con el tiempo de evolución de las mismas.

4.3. EFECTO DE LA *CHAMAEMELUM NOBILE* AL 2% SOBRE TAC EN SALIVA DE LOS PACIENTES CON LPO:

En este tercer objetivo, finalmente, la muestra de saliva fue recogida de un total de 55 pacientes mediante drenaje antes y cuatro semanas después del tratamiento con camomila. En el grupo de tratamiento, 10 sujetos eran hombres (38,5%) y 16 eran mujeres (61,5%). En el grupo placebo, 7 (24,1%) eran hombres y 22 (77,9%) mujeres ($p=0,25$). La edad media en el grupo de tratamiento fue $63,1 \pm 14,36$ años y $62,8 \pm 10,3$ en el grupo placebo ($p=0,91$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos con respecto al tiempo de evolución del LPO, que osciló entre 6 meses y 8 años con respecto a la gravedad de las lesiones. La mediana (rango) de la gravedad de la patología de LPO fue 2 (2-4) en el grupo de tratamiento y 2 (2-4) en el grupo placebo ($p = 0.58$).

La tabla 4.7 muestra los datos medianos (rango intercuartílico) de TEAC1, TEAC2, CUPRAC y FRAP en la línea de base (T1) ya las cuatro semanas para ambos grupos. En la línea de base (T1) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los analitos entre los dos grupos de pacientes. Después de cuatro semanas de tratamiento, se detectó un aumento estadísticamente significativo en el FRAP en el grupo placebo ($P < 0,05$). No se detectaron otros cambios estadísticamente significativos para ninguno de los otros analitos.



Tabla 4.7. Datos medianos (rango intercuartílico) para TEAC1, TEAC2, CUPRAC y FRAP en la línea de base (T1) y cuatro semanas después (T2) en los grupos placebo y de tratamiento.

Analito	Placebo			Tratamiento		
	T1	T2	P	T1	T2	P
TEAC1, mmol/L	0,201 (0,136 - 0,299)	0,233 (0,150 - 0,393)	0,390	0,288 (0,166 - 0,404)	0,278 (0,209 - 0,445)	0,477
TEAC2, mmol/L	0,400 (0,258 - 0,589)	0,421 (0,223 - 0,522)	0,972	0,457 (0,295 - 0,513)	0,397 (0,276 - 0,526)	0,946
CUPRAC, mmol/L	0,130 (0,088 - 0,255)	0,191 (0,116 - 0,359)	0,401	0,199 (0,113 - 0,348)	0,225 (0,149 - 0,408)	0,391
FRAP, mmol/L	0,323 (0,090 - 0,467)	0,406 (0,197 - 0,848)	0,039	0,392 (0,195 - 0,685)	0,464 (0,298 - 0,568)	0,781

Cuando los datos de los dos grupos y los dos muestreos se agruparon, se observó una correlación significativa entre el dolor y el drenaje y TEAC1, CUPRAC y FRAP; y entre xerostomía y TEAC1, TEAC2, CUPRAC y FRAP (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Correlación entre la capacidad antioxidante total y los parámetros clínicos.

Variable	Dolor <i>r; P</i>	Drenaje <i>r; P</i>	Xerostomía <i>r; P</i>
TEAC1, mmol/L	NS*	NS*	0,233; 0,013
TEAC2, mmol/L	0,239; 0,010	-0,323; 0,001	0,326; 0,001
CUPRAC, mmol/L	0,182; 0,040	-0,359; <0,001	0,271; 0,005
FRAP, mmol/L	0,331; <0,001	-0,345; <0,001	0,322; 0,001

*NS: no significativo



5. DISCUSIÓN



5.1. ESTRÉS OXIDATIVO EN SALIVA DE LPO VERSUS CONTROLES VERSUS SBA

La saliva es un medio que refleja la salud general del organismo (Mandel, 1989; 1980), como muestra posee una serie de ventajas y limitaciones con respecto a cualquier otro fluido biológico. Posee facilidad de obtención, almacenamiento, transporte de la muestra y bajo coste. En relación al paciente, es una muestra que se obtiene de forma no invasiva, por lo que se encuentra libre de estrés, no existen problemas para poder obtener muestras repetidas y poder monitorizar un analito seriado.

La saliva es rica en antioxidantes y actúa como la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. Los aumentos en los niveles de ROS están implicados en la patogénesis de muchas enfermedades incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedad periodontal (Wang y cols. 2015; Tóthová y cols. 2015; Valko y cols. 2007). En el presente estudio, la capacidad antioxidante salival total se incrementó y ROS disminuyó en pacientes con LPO y SBA en comparación con los sanos control. Además, la saliva de pacientes con LPO presentó niveles más altos de NO, nitrito y PCR.

El LPO es un proceso inflamatorio crónico en el que el óxido nítrico juega un papel importante, sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico, una molécula de señalización, actúa como una "espada de doble filo" que afecta a muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los niveles bajos de óxido nítrico se asocian con acciones hemostáticas, como funciones inmunes, flujo sanguíneo, agregación plaquetaria, neurotransmisión y memoria, mientras que el exceso de producción de óxido nítrico está involucrado en trastornos inflamatorios e inmunológicos, dolor, enfermedades neurológicas, aterosclerosis y cáncer (Korde Choudhari y cols. 2013). También desempeña un papel importante en la aparición y progresión de los tumores, con la participación de mecanismos como el daño del ADN, la inducción de la angiogénesis tumoral y la promoción de la invasión tumoral y la metástasis. Se han publicado varios estudios sobre



el papel del óxido nítrico en la etiopatogenia del LPO (Ohashi y cols. 1999; Mehdi pour y cols. 2014). En este estudio se encontraron niveles incrementados de NO y nitritos en la saliva de pacientes con LPO con diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos SBA y control. También se identificó una correlación entre los niveles de NO y el tiempo de evolución de LPO. Estos hallazgos coinciden con Ohashi y cols. (1999), quienes obtuvieron un aumento de los niveles de NO en la saliva de pacientes con LPO y úlceras aftosas recurrentes. Sunitha y Shanmugam (2006) también encontraron un aumento de los niveles de NO en la saliva recolectada de los pacientes con LPO en comparación con los sujetos control, indicando que los niveles salivales NO pueden estar involucrados en la fisiopatología de lesiones y úlceras erosivas de LP. Sin embargo, Brennan y cols. (2000) investigaron el NO en 30 pacientes con LPO reticular mediante el análisis inmunohistoquímico pero no lograron validar ninguna diferencia significativa entre los pacientes con LPO y los sujetos control, tal vez esto podría explicarse porque estos autores utilizan muestras de tejido para el análisis que pueden haber producido resultados falsos negativos.

La proteína C reactiva (PCR), un marcador de inflamación (Pepys y cols. 2003), sintetizado principalmente en el hígado, ha sido reconocido como un importante marcador biológico de una amplia gama de condiciones tales como inflamación sistémica, osteomielitis, artritis reumatoide y vasculitis. Algunos estudios también han revelado una asociación entre los niveles de PCR y la inflamación crónica, que se correlaciona con lesiones potencialmente malignas. Kumar ABS y Bahar G y cols. (2011) respaldan la hipótesis de que los aumentos de PCR preceden a la aparición de algunos cánceres como el cáncer de pulmón, el cáncer colorrectal y también señalan un mal pronóstico del carcinoma de células escamosas (SCC); sin embargo, la naturaleza exacta de la participación de la PCR en el desarrollo y progresión del cáncer sigue siendo poco clara (Kumar y cols. 2011; Bahar y cols. 2007).

La función principal de esta proteína radica en la defensa del huésped (Pepys y cols. 2003). El presente estudio encontró aumento de la PCR en muestras de



saliva tomadas de pacientes con LPO en comparación con pacientes con SBA y sujetos control con diferencias estadísticamente significativas. Aunque este marcador en suero es ampliamente utilizado en la práctica clínica, pocos estudios han evaluado los niveles de PCR en saliva.

Hasta la fecha, ninguna otra iniciativa de investigación ha examinado una posible asociación entre la PCR y la LPO como trastorno potencialmente maligno. La PCR puede desempeñar un papel en la carcinogénesis, actuando como biomarcador pronóstico de trastornos potencialmente malignos y cáncer oral (Pepys y cols. 2003) una posibilidad que requiere una investigación más profunda.

El síndrome de boca ardiente (SBA) es una enfermedad de origen desconocido sin etiología definida que se caracteriza por sensaciones dolorosas de ardor en la cavidad bucal. Los pacientes refieren una sensación persistente de quemazón, pero la exploración visual de la mucosa y los resultados de pruebas analíticas no detectan anomalías que las expliquen. Aunque relativamente común, se sabe poco aún acerca de su etiología y fisiopatología.

Los hallazgos del presente estudio ponen en relieve el descenso de los niveles de ROS en los pacientes afectados por SBA. Estos resultados no concuerdan con Tatullo y cols. (2012) que realizaron la evaluación del estrés oxidativo en la sangre de 18 pacientes SBA y 5 sujetos control, obteniendo mayores niveles de estrés oxidativo entre los pacientes con SBA cuando la condición se encontraba en su fase más dolorosa.

El presente estudio se incluyeron 20 pacientes con LPO y 19 con SBA, ambas entidades que a menudo se acompañan de xerostomía, por lo que los datos derivados del análisis de la saliva requieren una evaluación cuidadosa ya que algunos analitos pueden ser modificados por el flujo salival (Imura y cols. 2016; Agha-Hosseini y cols. 2016; Spadari y cols. 2015; Lee y cols. 2015). La saliva es sensible al cambio y por esta razón el estudio aplicó condiciones estándar para la recolección de muestras, que fue realizada por un solo



clínico bajo las mismas condiciones ambientales y ritmos circadianos, excluyendo a cualquier paciente con enfermedad periodontal.

Una limitación del estudio fue que la exclusión de las muestras de saliva con la contaminación sanguínea se aplicó sobre la base de la inspección visual, por lo tanto en este trabajo no se midió el nivel de transferrina salival para determinar el nivel de contaminación sanguínea en muestras de saliva de este modo pequeñas huellas de sangre podrían haber alterado los niveles de proteína en las muestras de saliva.

5.2. Eficacia clínica de la *Chamaemelum nobile* al 2%/placebo en pacientes con LPO aplicado de forma tópica en gel durante un periodo de 4 semanas de duración

En este ensayo clínico aleatorizado doble ciego de tratamiento versus placebo encontramos que la aplicación del gel de tratamiento resultó ser significativamente más eficaz que un placebo. Los resultados muestran que la aplicación tópica de gel de *Chamaemelun nobile* al 2% a la mucosa oral 3 veces al día mejoró los síntomas de LPO, las lesiones y la calidad de vida del paciente.

La manzanilla se ha utilizado para tratar diversas patologías de la mucosa oral debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas con resultados variables (Mazokopakis y cols. 2005; Braga y cols. 2015; Batista y cols. 2014; Reddy y cols. 2010; Ramos-e-Silva y cols. 2006; Seyyedi y cols. 2014; Carl y Emrich 1991; Fidler y cols. 1996). Sin embargo, en la medida en que los autores son conscientes, después de realizar una exhaustiva revisión bibliográfica en las bases de datos científicas no hemos encontrado ninguna investigación previa sobre la manzanilla utilizada para tratar las lesiones de LPO.

Durante el periodo del estudio no se observó ningún efecto adverso en ninguno de los grupos. Cinco de los pacientes (19,2%) en el grupo de



tratamiento respondieron completamente al tratamiento y 19 (73,1%) mostraron una respuesta parcial después de 4 semanas de tratamiento. Además, la calidad de vida de los pacientes medida mediante el test OHIP-14 mejoró incluso en ausencia de resolución de todos los síntomas.

El LPO es a menudo tratado con fármacos como los corticosteroides y los inhibidores de la calcineurina, cuya toxicidad y efectos secundarios (candidiasis, xerostomía, sensación de ardor, osteoporosis, diabetes mellitus, hipertensión, insuficiencia suprarrenal) a veces limitan su uso (Zakrzewska y cols. 2005; Lodi y cols. 2012; López-Jornet y cols. 2010). En estos casos, puede ser útil, si no esencial, adoptar una terapia alternativa. En este escenario, la fitoterapia se ha adoptado como una alternativa terapéutica para aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes con LPO. También ofrece las ventajas de bajo costo, disponibilidad y ausencia de efectos adversos (Thongprasom y cols. 2013; Chainani-Wu y cols. 2011; Srivastava y cols. 2010, 2009; McKay y Blumberg, 2006; Singh y cols. 2011). De hecho, la fitoterapia ha sido ampliamente aceptada y la Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya la investigación científica en su eficacia en este campo, esto ha conducido la investigación a una gama de remedios homeopáticos naturales incluyendo curcuminoides, quercetina para tratar síntomas generales de LPO, y miel aplicada a las lesiones erosivo-atróficas (Thongprasom y cols. 2013; Chainani-Wu y cols. 2011; Rivarola de Gutierrez y cols. 2014; Choonhakarn y cols. 2008; Salazar-Sanchez y cols. 2010; Mousavi y cols. 2009; Sanatkhanani y cols. 2014).

Choonhakarn y cols. (2008) observaron síntomas mejorados en el 81% de los pacientes con LPO tratados con Aloe Vera, con remisión completa en el 7%, mientras que sólo el 4% de los pacientes del grupo placebo mostraron mejoría. Reddy y cols. (2012) utilizaron un gel de aloe vera, comparándolo con acetónido de triamcinolona y concluyeron que el gel de aloe vera puede considerarse un tratamiento alternativo seguro. Sin embargo, Salazar-Sánchez y cols. (2010) evaluaron la eficacia de las aplicaciones tópicas de aloe vera



para el tratamiento de LPO en comparación con un placebo; y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el dolor.

Los componentes de la manzanilla incluyen la apigenina 7-O-glucósido, la luteolina, los compuestos terpénicos, el chamazuleno y el alfa-bisabolol, la miricetina y la rutina, todos los cuales muestran una fuerte actividad antiinflamatoria (Srivastava y cols. 2010; Srivastava y cols. 2009; Avallone y cols. 2000; Zargaran y cols. 2014).

Srivastava y cols. (2009) investigaron el mecanismo de acción de la manzanilla sobre la inhibición de la producción de PGE2. Concluyeron que esto se debía a la supresión de la expresión del gen COX-2 y la inhibición directa de la actividad de la enzima COX-2. Estas pueden ser acciones importantes para la prevención de la inflamación y así contribuir a los efectos antiinflamatorios, antineoplásicos e inmunorreguladores de la manzanilla.

Varias investigaciones han demostrado que la manzanilla controla la inflamación en la cavidad bucal y los enjuagues bucales de manzanilla se han prescrito para lesiones aftosas, gingivitis, laringitis y mucositis oral (Mazokopakis y cols. 2005; Braga y cols. 2015; Batista y cols. 2014; Reddy y cols. 2010; Ramos-e-Silva y cols. 2006; Seyyedi SA y cols. 2014; Thongprasom y cols. 2003; Kyokong y cols. 2002). También se ha utilizado ampliamente para tratar enfermedades periodontales. Pourabbas y cols. (2005) y Batista y cols. (2014) observaron reducciones en el sangrado gingival como resultado de la aplicación de manzanilla. Reddy y cols. (2010) informaron que las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas de la manzanilla ayudaron a reducir la inflamación oral causada por periodontitis.

Aunque la manzanilla ha sido evaluada en estudios previos en relación con enfermedades orales, no se ha ensayado para tratar el LPO, por lo que no es posible comparar el presente trabajo con hallazgos previos. La manzanilla es un producto de bajo coste y fácilmente disponible. Se han observado algunos efectos secundarios (generalmente leves) y se recomienda monitorizar a los



pacientes que toman anticoagulantes como la warfarina (Amy y cols. 2000) debido a un posible riesgo de interacción.

Hay investigaciones previas que sugieren que la manzanilla utilizada en una variedad de concentraciones podría ser eficaz en la reducción del tiempo necesario para la cicatrización de heridas (Martinsy cols. 2009). La concentración utilizada en el presente estudio se eligió como se había utilizado para tratar otras enfermedades de la mucosa (Mazokopakis y cols. 2005; Braga y cols. 2015; Batista y cols. 2014; Reddy y cols. 2010; Ramos-e-Silva y cols. 2006; Seyyedi SA y cols. 2014; Singh y cols. 2011).

Los pacientes tratados con manzanilla mostraron mejoría estadísticamente significativa en comparación con el grupo placebo. No se observaron efectos adversos.

Una limitación posible en el presente estudio podría ser que, aunque las respuestas al tratamiento se evaluaron utilizando los criterios recomendados por Gandolfo y cols. (1999), no se han establecido métodos normalizados para evaluar la gravedad de la enfermedad y no existen criterios consensuales para determinar los niveles de mejoría o curación, además, la evolución de la enfermedad varía entre un paciente y otro según su forma clínica. Wang y Van der Waal (2015) en un trabajo reciente hicieron una revisión crítica de los sistemas de evaluación de respuesta a los tratamientos indicando la necesidad de diseñar un sistema de puntuación de la calidad de vida adaptado a los pacientes con LPO.

El presente estudio también tenía un tamaño de muestra relativamente pequeño, aunque el tamaño era lógico y estadísticamente aceptable en términos de lograr los objetivos del estudio. El estudio tiene una duración de cuatro semanas donde se evaluó la eficacia de tratamiento frente a placebo. Los estudios con más tiempo de seguimiento pueden ser necesarios para confirmar el presente hallazgo de que las aplicaciones tópicas de *Chamaemelum nobile* son un tratamiento alternativo eficaz para LPO. Se necesitan estudios adicionales de naturaleza multicéntrica e involucrando series de pacientes mayores y períodos de tratamiento más largos con el fin



de obtener más información sobre la eficacia de la manzanilla para el tratamiento del LPO.

5.3. EFECTO DE LA CAMOMILA SOBRE TAC EN SALIVA DE LOS PACIENTES CON LPO

Existen evidencias de que el LPO está asociado con el estrés oxidativo en la saliva, ya que diversos biomarcadores oxidativos como TAC, malondialdehído (MDA), ácido úrico o gamma-glutamyl transferasa (Sezer y cols. 2008; Ergun y cols. 2011; López-Jornet y cols. 2014; Tvarijonaviciute y cols. 2016) se mostraron alterados en esta enfermedad. El TAC salival se midió previamente en controles sanos y en los pacientes con LPO (Agha-Hosseini y cols. 2009; Ergun y cols. 2011; Tvarijonaviciute y cols. 2016), mientras que no se encontraron estudios sobre la dinámica del TAC en la saliva de pacientes con LPO. La mejora de este conocimiento podría ayudar a aclarar el comportamiento y la posible implicación de los antioxidantes en la progresión de la enfermedad. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el TAC salival en un grupo de pacientes con LPO sometido al tratamiento con ungüento de manzanilla y en grupo placebo.

La capacidad antioxidante salival se puede medir con una variedad de métodos. El presente estudio utilizó los métodos más utilizados para medir la capacidad antioxidante total, ya que se sugirió que el mejor enfoque era combinar diferentes ensayos de TAC (Cao y Prior, 1998; Tvarijonaviciute y cols. 2016). La determinación de un TAC de manera global ofrece el beneficio de la evaluación de todos los componentes antioxidantes de una muestra, en contraste con la determinación de cada componente antioxidante por separado, lo que es intensivo en mano de obra, consume mucho tiempo y es caro (Erel 2004ab). Por ejemplo, la medición de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) refleja las concentraciones plasmáticas de albúmina, urato, ácido ascórbico, a-tocoferol y bilirrubina, mientras que el valor de FRAP se refleja principalmente niveles de ácido úrico (hasta 60%) y



menos ácido ascórbico y a-tocoferol (Benzie y Strain 1996; Erel 2004b). Por esta razón, en el presente estudio, el TAC salival se evaluó mediante cuatro métodos diferentes. Esto permite una mayor comprensión del comportamiento de los diferentes antioxidantes para el seguimiento de la evolución de las enfermedades crónicas con riesgo de malignidad, como LPO.

Es importante mencionar que los pacientes incluidos en el presente estudio no presentaron una forma muy dolorosa de la enfermedad (el índice de gravedad medio fue 2 sobre 5 en ambos grupos), lo que permitió la aplicación de tratamiento alternativo o incluirlos en el grupo placebo. Sería éticamente inadecuado incluir a los pacientes gravemente enfermos y mantenerlos durante un mes sin ningún tratamiento (en el caso del grupo placebo). Sin embargo, esto debe tenerse en cuenta al extrapolar los resultados a otros estudios, ya que la diferente gravedad de la enfermedad podría resultar en un comportamiento diferente de los antioxidantes (Pascual y cols. 1998).

Los datos del presente estudio sugieren que los antioxidantes totales salivales aumentan en pacientes con LPO en el grupo placebo, ya que se detectó un FRAP mayor en el grupo placebo después de cuatro semanas con respecto a los datos basales. Para el conocimiento de los autores, este es el primer estudio, en el que se evaluó la evolución del TAC salival en los controles y los pacientes con LPO. Sin embargo, aunque se necesitan más estudios, podría postularse que los pacientes con LPO de gravedad mediana-baja sin el tratamiento (grupo placebo) empeoran y necesitan más protección por los antioxidantes para contrapesar las concentraciones elevadas de ROS asociadas con el liquen plano y que está correlacionada con la gravedad de las lesiones (Batu y cols. 2015). Esta hipótesis también sería apoyada por los mayores niveles de TAC, evaluados por TEAC1, TEAC2, CUPAC y FRAP, en LPO en comparación con los controles (Tvarijonaviciute y cols. 2016). De manera similar, Agha-Hosseini y cols. (2009) encontraron mayor TAC salival, utilizando el método FRAP, en pacientes con LPO en comparación con controles, aunque esto no fue estadísticamente significativo. En contraste, Ergun y cols. (2011) no encontraron diferencias significativas en el FRAP salival entre los pacientes



sanos y LPO. Aunque son necesarios más estudios para investigar esta cuestión, al menos en parte, podría explicarse por la inclusión de pacientes con diferentes grados de gravedad de LPO, aunque se indicarán otros estudios para aclarar este tema.

El uso del tratamiento tópico con *Chamaemelum nobile* al 2% durante un mes estuvo asociado con la mejoría clínica en pacientes con LPO (López-Jornet y Aznar-Cayuela, 2016). Sin embargo, no hemos podido detectar cambios en el TAC salival, hecho que podría indicar la estabilización de la enfermedad. Sin embargo, el presente estudio se realizó sólo un corto período de tiempo al tratar una enfermedad crónica, siendo una de las principales limitaciones del presente estudio. Por lo tanto, se necesitan más estudios de larga duración para evaluar los posibles efectos de la *Chamaemelum nobile* sobre los marcadores salivales relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con LPO.

Cuando se evaluaron las variables clínicas en relación con los niveles de TAC salival, se observó correlación positiva entre TAC y dolor. Este hallazgo, al menos en parte, podría explicarse por el hecho de que el dolor da lugar a un aumento del cortisol (un glucocorticoide endógeno), que a su vez se asoció con una mayor capacidad antioxidante del suero (Seo y Yoon, 2008, Tvarijonaviciute y cols. 2015) . Además, se observaron correlaciones negativas y positivas entre TAC salival y drenaje y xerostomía, respectivamente. Estas dos correlaciones se complementan y se confirman entre sí, e indican que en los casos en que se produce menos saliva y por lo tanto la sensación de boca seca aumenta los niveles de TAC salivales son mayores.

Por lo tanto queda de manifiesto la necesidad de seguir con la investigación en este campo ya que puede ser de gran relevancia para este tipo de patologías.

Nuestro trabajo forma parte de la investigación conjunta llevada a cabo por el Departamento de Estomatología en el área de la Medicina Oral y grupos de Laboratorio Interdisciplinario de Análisis Clínicos Interlab-UMU, Facultad de



Medicina Veterinaria, Campus Regional de Excelencia Internacional 'Campus Mare Nostrum', Universidad de Murcia, por lo que no se pretende que esto sea un texto aislado sino una línea creciente de investigación.



6. CONCLUSIONES



Una vez analizados los resultados de este estudio llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con LPO presentan un aumento estadísticamente significativo de TAC salival y disminución de ROS, así como los marcadores de inflamación PCR, NO y nitritos con respecto a un grupo control .
2. Encontramos que la aplicación tópica de gel de *Chamaemelum nobile* al 2% en la mucosa oral 3 veces al día mejora de forma estadísticamente significativa la sintomatología (dolor, ardor y escozor) y la calidad de vida en los pacientes de LPO durante el mes de tratamiento, por lo que puede ser considerado como un tratamiento alternativo eficaz para el LPO.
3. Al analizar la saliva no estimulada de los pacientes con LPO antes y después del tratamiento con *Chamaemelum nobile* al 2% en la mucosa oral, no encontramos ningún efecto a corto plazo sobre el TAC salival.

Se precisa más investigación sobre los mecanismos de acción de la camomila con el fin de aprovechar mejor sus efectos en beneficio del paciente con LPO.



7. BIBLIOGRAFÍA



REFERENCIAS

- Abdolsamadi H, Rafieian N, Goodarzi MT, Feradmal J, Davoodi P, Jazayeri M, Taghavi Z, Hoseyni SM, Ahmadi-Motamayel F. Levels of salivary antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with oral lichen planus and healthy individuals. *Chonnam Med J* 2014;50:58-62.
- Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Farmanbar N, Abdollahi M. Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2012;41:736-740.
- Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *Int J Dent Hyg* 2009;7:246-50.
- Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mohammadpour N. Muscarinic cholinergic receptors (MR3) in saliva of patients with oral lichen planus. *Arch Dermatol Res*. 2016.
- Amy M, Heck, Beth A, Dewitt A, Lukes AL. Potential interactions between alternative therapies and warfarin. *Am J Health Syst Pharm* 2000;57:1221-1227.
- Antolovich M; Prenzler P.D; Patsalides E; McDonald S; Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002;127,183-198.
- Arena E; Fallico B; Maccarone E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem*. 2001;74,423-427.
- Arnao M B, Cano A, Acosta M. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Re Devel Agric Food Chem* 1998;2:893-905.
- Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemistry Pharmacology* 2000;59:1386-94.



- Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 2007;109:54-59.
- Barikbin B, Yousefi M, Rahimi H, Hedayati M, Razavi SM, Lotfi S. Antioxidant status in patients with lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 2011;36:851-4.
- Batista AL, Lins RD, de Souza Coelho R, do Nascimento Barbosa D, Moura Belém N, Alves Celestino FJ. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complement Ther Clin Pract* 2014;20:93-8.
- Battino M, Greabu M, Totan A, et al. Oxidative stress markers in oral lichen planus. *BioFactors* 2008;33:301-10.
- Batu Ş, Ofluoğlu D, Ergun S, Warnakulasuriya S, Uslu E, Güven Y, Tanyeri H. Evaluation of prolidase activity and oxidative stress in patients with oral lichen planus and oral lichenoid contact reactions. *J Oral Pathol Med*. 2015.
- Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 1996;239:70-76.
- Bermejo Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso P, Salazar-Sánchez. Naturaleza premaligna del liquen plano oral. Un estudio retrospectivo de 550 pacientes liquen plano oral de Sur-este de España. *Oral Oncology* 2009; 45: 54-6.
- Borello ED. Las lesiones blancas de la mucosa bucal. Ed. La Médica. Rosado, Argentina 1971;63-80.
- Braga FT, Santos AC, Bueno PC, Silveira RC, Santos CB, Bastos JK, Carvalho EC. Use of chamomilla recutita in the prevention and treatment of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a randomized, controlled, phase II clinical trial. *Cancer Nurs* 2015;38:322-9.



- Brennan PA, Umar T, Palacios-Callender M, Spedding AV, Mellor TK, Buckley J, et al. A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2000;29:249-254.
- Bricker SL. Oral lichen planus: a review. *Semin Dermatol* 1994;13:87-90.
- Campos C, Guzmán R, López-Fernández E, Casado Á. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC-BCS assay. *Analytical biochemistry* 2009; 392:37-44.
- Carl W, Emrich LS. Management of oral mucositis during local radiation and systemic chemotherapy: a study of 98 patients. *J Prosthet Dent* 1991;66:361-369.
- Carrozzo M, Gandolfo S. The management of oral lichen planus. *Oral Dis* 1999;5:196-205.
- Cerero Lapiedra R. Liquen Plano Oral. Estudio clínicopatológico. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1991
- Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2011;132:901-9.
- Choonhakarn C, Busaracome P, Sripanidkulchai B, Sarakarn P. The efficacy of aloe vera gel in the treatment of oral lichen planus: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2008;158:573-7.
- Cintra R.M. G.; Mancini-Filho J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire* 2001;22, 49-62.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:277-285.
- Ergun S, Trosala SC, Warnakulasuriya S, et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2011;40:286-293.



- Fidler P, Loprinzi CL, O'Fallon JR et al. Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of 5-FUinduced oral mucositis. *Cancer* 1996;77:522-525.
- García-Robledo E, Corzo A, Papaspyrou S. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry* 2014;162:30-36.
- González-Moles MA, Ruiz-Ávila I, Rodríguez-Archilla A, Morales-García P, Mesa-Aguado F, Bascones-Martínez A, et al. Treatment of severe erosive gingival lesions by topical application of clobetasol propionate in custom trays. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:688-92.
- González-Moles MA, Morales P, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Ávila I, González-Moles S. Treatment of severe Chronic oral erosive lesions with clobetasol propionate in aqueous solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:264-70.
- González-Moles MA, Morales-García P, Rodríguez-Archilla A. Comment and response: the treatment of oral aftous ulceration of erosive lichen planus with topical clobetasol propionate in an adhesive denture paste. *Clinical Study on 54 patients. J Oral Pathol Med* 2002;31:284-5.
- González-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis* 2008;14:229-43.
- Gordon SC, Daley Td. Foreign body gingivitis: clinical and microscopic features of 61 cases. *Oral Surg Med Oral Pathol Radiol Endod* 1997;83:562-70.
- Haagen L, Brock A. A New Automated Method for Phenotyping Arylesterase (EC 3.1.1.2) Based Upon Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of 4-Nitrophenyl Acetate by Phenyl Acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992;30:391-395.
- Hallopeau H. Sur un cas de lichen de Wilson gingival avec néoplasie voisine dans la région maxillaire. *Bull Soc Fr Derm Syph* 1910;17:32.



- Hashemy SI, Gharaei S, Vasigh S, Kargozar S, Alirezaei B, Jahed Keyhani F, Amirchaghmaghi M. Oxidative stress factors and C-reactive protein in patients with oral lichen planus before and 2 weeks after treatment. *J Oral Pathol Med* 2016;45:35-40.
- Iannitti T, Rottigni V, Palmieri B. Role of free radicals and antioxidant defences in oral cavity-related pathologies. *J Oral Pathol Med* 2012;41:649-61.
- Imura H, Shimada M, Yamazaki Y, Sugimoto K. Characteristic changes of saliva and taste in burning mouth syndrome patients. *J Oral Pathol Med*. 2016;45:231-6.
- Katrina M. Miranda, Michael G. Espey and David A. Wink. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, Issue 1, 2001;62-71.
- Kaur J, Politis C, Jacobs R. Salivary 8-hydroxy-2- deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action. *Clin Oral Invest*. 2015.
- Korde Choudhari et al. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology* 2013;11:118.
- Kumar ABS. Altered C-Reactive Protein Levels in Serum of Oral Precancer Patients in Comparison With Healthy Controls. *Int J Oral Maxillofac Pathol* 2011;2:16-9.
- Kyokong O, Charuluxananan S, Muangmingsuk V, Rodanant O, Subornsug K, Punyasang W. Efficacy of chamomile-extract spray for prevention of post-operative sore throat. *J Med Assoc Thai* 2002;85:S180-S185.
- Lee Y, Hong I, Na S, Eun YG. Evaluation of salivary function in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis* 2015;21:308-13.
- Lodi G, Carrozzo M, Furness S, Thongprasom K. Interventions for treating oral lichen planus : a systematic review. *Br J Dermatol* 2012;166:938-47.
- Lopez J, Ferré J, Roselló X. Liquen plano oral: Revision. *Av. Odontoestomatol* 1993;9:461-472.



- López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez N. Topical tacrolimus and pimecrolimus in the treatment of oral lichen planus: an update. *J Oral Pathol Med* 2010;39:201-5.
- Lopez-Jornet P, Martinez-Canovas A, Pons-Fuster A. Salivary biomarkers of oxidative stress and quality of life in patients with oral lichen planus. *Geriatr Gerontol Int* 2014;14:654-9.
- Lozada-Nur F, Huang MZ, Zhou GA. Open preliminary clinical trial of clobetasol propionate ointment in adhesive paste for treatment of chronic oral vesiculoerisive diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:283-7.
- Mallaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:370-377.
- Mandel ID. Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *CRC Crit Rev Lab Sci* 1980;12:321.
- Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Assoc* 1989;119:298-304.
- Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, Pavesi VC, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. *Phytother Res* 2009;23:274-278.
- Mazokopakis EE, Vrentzos GE, Papadakis JA, Babalis DE, and Ganotakis ES. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. *Phytomedicine* 2005; 2:25-27.
- McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* 2006;20:519-30.
- Mehdipour M, Taghavi Zenouz A, Bahramian A, Gholizadeh N, Boorghani M. Evaluation of Serum Nitric Oxide Level in Patients with Oral Lichen Planus *J Dent (Shiraz)*. 2014;15:48-51.
- Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Mignogna C, de Rosa G, Porter SR. Field cancerization in oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:383-9.



- Moreira A.V.B.; Mancini-Filho J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire* 2003;24.
- Mortazavi N. Role of oxidative stress in malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Oncol* 2013;49:e41-2.
- Mousavi F, Sherafati S, Mojaver YN. Ignatia in the treatment of oral lichen planus. *Homeopathy* 2009;98:40-4.
- Moyer R.A.; Hummer K.E; Finn C.E.; Frei B.; Wrolstad R.E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50, 519-525.
- Nagao T, Warnakulasuriya S, Ikeda N *et al.* Serum antioxidant micronutrient levels in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2001;30:264-267.
- Navazesh M, Kumar SK; University of Southern California School of Dentistry. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc* 2008;139:35S-40S.
- Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1999;28:355-59.
- Pepys MB, Gideon M, Hirschfield. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-12.
- Pourabbas R, Delazar A, Chitsaz MT. The effect of german chamomile mouthwash on dental plaque and gingival inflammation. *IJPR* 2005;2:105e9.
- Ramos-e-Silva M, Ferreira AF, Bibas R, Carneiro S. Clinical evaluation of fluid extract of *Chamomilla recutita* for oral aphthae. *J Drugs Dermatol* 2006;5:612-617.
- Reddy PD, Satyanarayana TD, SwarnaLatha and Purushothaman M. Local Drug Delivery of Herbs for Treatment of Periodontitis. *JITPS* 2010;1:245-251.



- Reddy RL, Reddy RS, Ramesh T, Singh TR, Swapna LA, Laxmi NV. Randomized trial of aloe vera gel vs triamcinolone acetonide ointment in the treatment of oral lichen planus. *Quintessence Int* 2012;43:793-800.
- Rivarola de Gutierrez E, Di Fabio A, Salomón S, Lanfranchi H. Topical treatment of oral lichen planus with anthocyanins. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19:e459-66.
- Robards K; Prenzler P.D; Tucker G; Swatsitang P; Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*. 1999;66, 401-436.
- Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus-a review. *J Oral Pathol Med* 2010;39:729-34.
- Salazar-Sanchez N, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Sanchez-Siles M. Efficacy of topical aloe vera in patients with oral lichen planus: a randomized double blind study. *J Oral Pathol Med* 2010;39:735-40.
- Sanatkhani M, Mosannen Mozafari P, Amirchaghmaghi M, Najafi Fathi M, Sanatkhani M, Sarjami N. et al. Effect of cedar honey in the treatment of oral lichen planus. *Iran J Otorhinolaryngol* 2014;26:151-61.
- Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:586-92.
- Sander CS, Cooper SM, Ali I, Dean D, Thiele JJ, Wojnarowska F. Decreased antioxidant enzyme expression and increased oxidative damage in erosive lichen planus of the vulva. *BJOG* 2005;112:1572-5.
- Scala A, Checchi L, Montevicchi M, Marini I, Giamberardino MA. Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:275-91.
- Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46:15-21.



- Scully C, Porter SR. The clinical spectrum of desquamative gingivitis. *Semin Cutan Med Surg* 1997;16:308-13.
- Seyyedi SA, Sanatkhan M, Pakfetrat A, Olyae P. The therapeutic effects of chamomilla tincture mouthwash on oral aphthae: a randomized clinical trial. *J Clin Exp Dent* 2014;1:e535-8.
- Sezer E, Ozugurlu F, Ozyurt H, Sahin S, Etikan I. Lipid peroxidation and antioxidant status in lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:430-4.
- Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An over view. *Pharmacogn Rev* 2011;5:82-95.
- Sitlra O. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surg* 1972, 33: 367-388.3.
- Spadari F, Venesia P, Azzi L, Veronesi G, Costantino D, Croveri F, Farronato D, Tagliabue A, Tettamanti L. Low basal salivary flow and burning mouth syndrome: new evidence in this enigmatic pathology. *J Oral Pathol Med* 2015;44:229-33.
- Srivastava JK, Pandey M, Gupta S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2009;85:663-9.
- Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile. A herbal medicine of the past with bright future. *Mol Med Rep* 2010;3:895-901.
- Sunitha M, Shanmugam S. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosal diseases: A controlled clinical trial. *Ind J Dent Res*. 2006;17:117-20.
- Tatullo M, Marrelli M, Scacco S, Lorusso M, Doria S, Sabatini R, Auteri P, Cagiano R, Inchingolo F. Relationship between oxidative stress and “burning mouth syndrome” in female patients: a scientific hypothesis *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16:1218-21.
- Thomson WM. Measuring change in dry-mouth symptoms over time using the Xerostomia Inventory. *Gerodontology*. 2007;24:30-35.
- Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2003;32:315-22.



- Thongprasom K, Prapinjumrune C, Carrozzo M. Novel therapies for oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2013;42:721-7.
- Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;20;5:73.
- Tvarijonaviciute A, Tecles F, Caldin M, Tasca S, Cerón JJ. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *AmJ Vet Res.* 2012;73:34-41.
- Upadhyay RB, Cernelio S, Shenoy RP, Gyawali P, Mukherjee M. Oxidative stress and antioxidant defense in oral lichen planus and oral lichenoid reaction. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70:225-8.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.
- 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;43:742-8.
- Van der Meij EH, Reibel J, Slootweg Pj, Van der Wal JE, de Jong WF, Van der Waal I. Interobserver and intraobserver variability in the histologic assessment of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1999;28:274-7.
- Van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, van der Wal JE, Bezemer PD, van der Waal I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endol* 1999;88:307-10.
- 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 Radiol Endod* 2003;96:164-171.
- Van der Meij EH, Van der Waal I, Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available



- diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* 2003;32:507-12.
- Van der Waal I. liquen plano oral y las lesiones liquenoides orales; una evaluación crítica, con énfasis en los aspectos de diagnóstico. *Med Oral Patol Oral Cirug Bucal* 2009; 14: E310-4.
 - Van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Buccal* 2009;14:E310-4.
 - Van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:E310-E314.
 - Vlková B, Stanko P, Minárik G, Tóthová L, Szemes T, Baňasová L, Novotňáková D, Hodosy J, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in patients with oral premalignant lesions. *Arch Oral Biol* 2012;57:1651-1656.
 - Vong L, Lorentz R J, Assa A, Glogauer M, Sherman P M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology* 2014;19:1870-1877.
 - Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review *Free Radic Biol Med*. 2015;85:95-104.
 - Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review *Free Radic Biol Med*. 2015;85:95-104.
 - Wang J, Van der Waal I. Disease scoring systems for oral lichen planus; a critical appraisal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20:e199-204.
 - Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen A T, Zingraff J, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. 1996;49:1304-1313.
 - Zakrzewska JM, Chan ES, Thornhill MH. A systematic review of placebo-



controlled randomized clinical trials of treatments used in oral lichen planus. Br J Dermatol 2005;153:336-41.

- Zargar A, Borhani-Haghighi A, Faridi P, Daneshamouz S, Kordafshari G, Mohagheghzadeh A. Potential effect and mechanism of action of topical chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oil on migraine headache: A medical hypothesis. Med Hypotheses 2014;83:566-9.



8. TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS



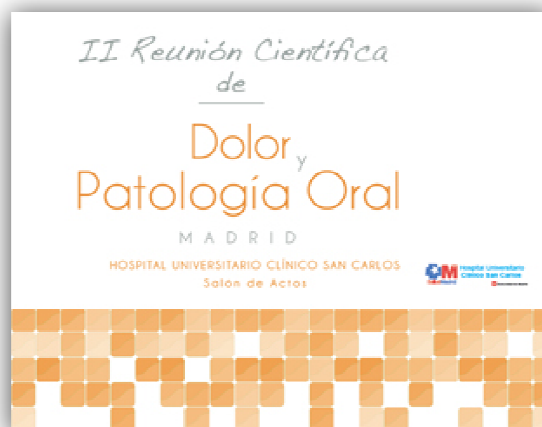
8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS



1. **Título:** Estudio clínico de la eficacia de los antioxidantes naturales en pacientes con liquen plano oral. II JORNADAS DOCTORALES UNIVERSIDAD DE MURCIA, 31 MAYO, 1-2 JUNIO 2016.



2. **Título:** Marcadores de estrés oxidativo y proteína C reactiva en pacientes con síndrome de boca ardiente y liquen plano oral. II REUNIÓN CIENTÍFICA D DOLOR Y PATOLOGÍA ORAL EN HOSPITAL UNIVERSITARIO CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID, 18 DE NOVIEMBRE 2016.





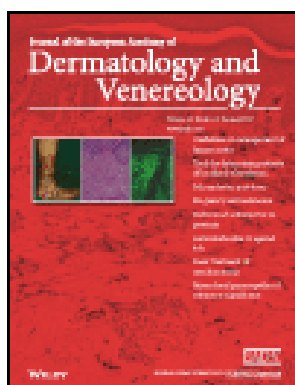
8.2 PUBLICACIONES

8.2.1 PUBLICACIÓN 1

Efficacy of topical chamomile management vs. placebo in patients with oral lichen planus: a randomized double- blind study

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology

© European Academy of Dermatology and Venereology



Editor-in-Chief: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring, München, Germany

Impact Factor: 3.029

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 10/61 (Dermatology)

Online ISSN: 1468-3083



SHORT REPORT

Efficacy of topical chamomile management vs. placebo in patients with oral lichen planus: a randomized double-blind study

P. Lopez Jornet,^{1,*} C. Aznar-Cayuela²

¹Department of Oral Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Murcia, Murcia, Spain

²Colaborate Department of Oral Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Murcia, Murcia, Spain

*Correspondence: P. Lopez Jornet, E-mail: majornet@um.es

Abstract

Background The purpose of this study was to compare the clinical therapeutic efficacy of topical applications of chamomile vs. a placebo for treating oral lichen planus (OLP).

Methods This double-blind study, randomly divided 60 patients with OLP into two groups, 30 treated with 2% *Chamaemelum nobile* gel (0.5 mL/3 times a day) and 30 treated with a placebo (Trial Registration NCT02421770). A visual analogue scale was used to rate pain, itching and burning sensation, and Thongprasom Index, the Oral Health Impact Profile 14 (OHIP-14) and the Hospital Anxiety-Depression Scale. Patients were evaluated at baseline and after 4 weeks of treatment.

Results Patients treated with chamomile showed significant improvements after 4 weeks for pain ($P < 0.001$), burning sensation ($P < 0.001$), itching ($P = 0.011$), OHIP-14 ($P < 0.001$) and Thongprasom index ($P = 0.001$); 92% of patients treated with chamomile showed a partial or total response, while only five subjects (17%) in the placebo group showed any improvement.

Conclusion The topical application of 2% chamomile gel is an effective treatment for OLP.

Received: 13 November 2015; Accepted: 14 April 2016

Conflicts of interest

None.

Funding sources

None.

Introduction

A variety of approaches have been used to treat oral lichen planus (OLP) including corticosteroids, retinoids, topical cyclosporine, antimicrobials azathioprine, calcineurin inhibitors and surgery. The main disadvantage of these treatments are their secondary effects.^{1–7} Several studies have investigated the application of chamomile for treating different oral diseases, particularly gingivitis, mucositis, aphthous stomatitis, but most were not randomized, controlled trials for the application of chamomile to treat OLP patients.^{8–11} The purpose of this study was to compare the clinical therapeutic efficacy of topical applications of chamomile for treating OLP vs. a placebo.

Materials and methods

Patients

The study was designed to meet CONSORT guidelines. The sample consisted of patients diagnosed with oral lichen planus at

the Department of Oral Medicine (Faculty of Medicine and Dentistry, University of Murcia, Spain). The study protocol fulfilled the criteria established in the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of the University of Murcia.

Inclusion criteria were – patients diagnosed clinically and histologically with OLP according to van der Waal criteria¹²; patients who had not received any treatment for OLP in the previous 2 weeks in the case of topical treatments or in the last 4 weeks in the case of systemic therapies. Exclusion criteria were – allergy to some ingredient of the products tested the use of drugs capable of inducing lichenoid reactions, OLP lesions in contact with silver amalgam fillings, the presence of dysplasia in the histopathological study of OLP and the presence of extraoral lesions.

Study design

This randomized, double-blind, parallel-group study had a duration of 4 weeks (Trial Registration Number Identifier:

NCT02421770). Treatment and allocation were randomized centrally using the website <http://www.randomization.com>.

Study products

The product assayed was 2% *Chamaemelum nobile*, with a gel consistency supplied in 500 ml containers, as was the placebo. Both products consisted of the same excipients and composition – water, hydroxyethyl, sorbitol <0.1%, E-202 (potassium sorbate) <0.1%, E-223 (sodium metabisulfite) <0.1%, food colouring <0.1%, Chamomile aroma <0.1% (Ababbo, Murcia, Spain) – except that the experimental gel included 2% chamomile and the placebo did not. Both preparations had the same colour. An operator external to the study, coded the products in identical opaque containers. A randomization code was kept in an opaque envelope in a safe environment and opened only at the end of the study. Both patients and researchers were blind to group assignment (treatment/placebo). The patients received the product together with instructions for their correct use. The preparations (0.5 mL/3 times a day) were applied uniformly to the oral cavity in the areas that presented symptoms, spreading the gel with the finger. Patients were asked not to eat or drink for 20 min after each application and to continue treatment for 1 month.

Measurements

Symptoms were evaluated using visual analogue scales (VAS) for pain, burning sensation and itching at baseline and after 4 weeks of treatment. According to VAS scores, 0 = no pain, no burning

sensation, no itching, and 10 = extreme pain, burning sensation or itching.

The lesions' clinical characteristics were scored using Thongprasom,⁶ Hospital Anxiety-Depression Scale¹³ and Oral Health Impact Profile to evaluate oral quality of life¹⁴ assessments; patients were evaluated at baseline and after 4 weeks of treatment.

Treatment responses were assessed using criteria recommended by Carrozzo and Gandolfo⁵; complete remission = few or no symptoms, the lesions disappear or white streaks remain; partial remission = symptoms have decreased, there are white

Table 1 Patient sample characteristics (age, sex, smoking, alcohol consumption) by group (Student's *t*-test and Pearson χ^2)

	Treatment (n = 26)	Placebo (n = 29)	P-value
Mean age (SD)	63.1 (14.3)	62.8 (10.3)	0.917
Gender			0.251
Male	10 (38.5)	7 (24.1)	
Female	16 (61.5)	22 (77.9)	
Smoking			0.786
Yes	6 (23.1)	5 (17.2)	
No	19 (73.1)	22 (75.9)	
Ex-smoker	1 (3.8)	2 (6.9)	
Alcohol			0.550
Yes	3 (11.59)	2 (6.9)	
No	23 (88.5)	27 (93.1)	

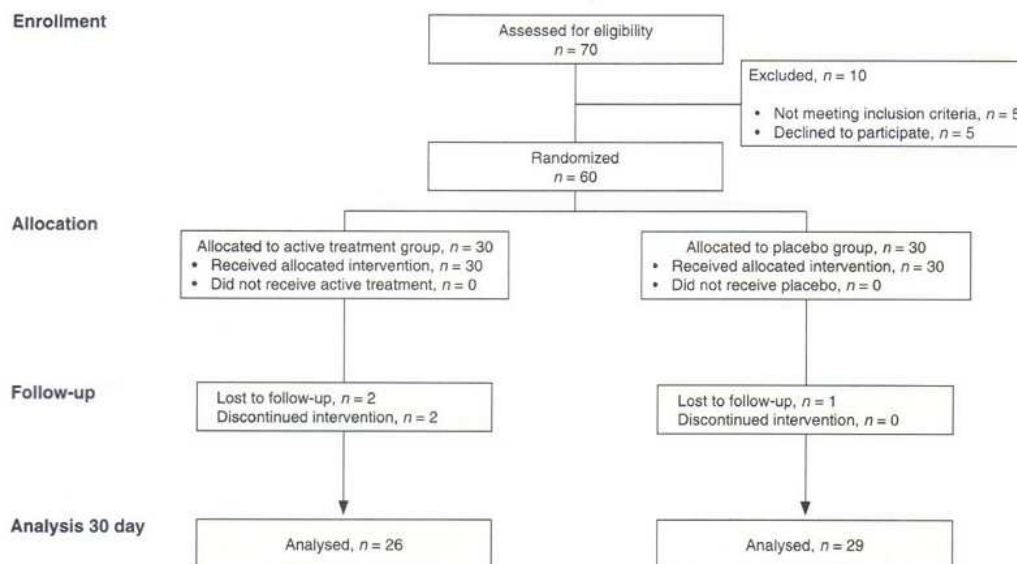


Figure 1 Flow diagram.

streaks with erythematous areas; no response = the symptoms persist and the lesions worsened.

Data were analysed using the SPSS version 12.0 statistical package (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive study of each variable was performed. To compare changes between the two data sets (at baseline and after 4 weeks) by group (treatment or placebo), general linear model analysis was performed with mixed factorial ANOVA for partially repeated measurements. The statistical significance of these models was complemented by adjusted isolation index (η^2) to evaluate the percentage of variance of the dependent variable, associated with time passed between baseline and 4 weeks after treatment. Statistical significance was established as $P < 0.05$.

Table 2 Clinical characteristics by group at baseline (Mann–Whitney U-test)

	Treatment (n = 26)	Placebo (n = 29)	P-value
	Median; IQR	Median; IQR	
SCORING 1	2; 2–4	2; 2–4	0.586
PAIN 1	5; 4–6	4; 3–5	0.065
BURNING SENS. 1	3; 1–5	3; 1–4	0.473
ITCHING 1	1; 0–5	2; 0–4	0.599
THONGPRASOM 1	2; 2–2	1; 1–2	0.100
ANXIETY 1	7; 5–9	8; 6–10	0.277
DEPRESSION 1	4; 1–6	6; 2–8	0.079
OHIP-14SP 1	12; 10–15	12; 10–13	0.139

Results

Of the 60 randomized patients, 55 completed the 4 weeks of treatment (26 in the chamomile group and 29 in the placebo group) (Fig. 1). Demographic data, patients' habits and clinical characteristics are shown in Tables 1 and 2.

The most frequently occurring OLP location was the buccal mucosa (98%), followed by the tongue (19%) and the gums (18%). Pre-treatment values showed no significant differences between groups. After 4 weeks, treatment group variables were significantly lower than at baseline ($P < 0.001$), while the placebo group showed no statistically significant changes ($P > 0.05$) (Table 3).

Ninety-two per cent of patients treated with chamomile gel showed some response to treatment after 4 weeks, while in the placebo group, only five patients (17%) showed a response (Fig. 2). Five patients (19.2%) in the treatment group showed complete resolution of the symptoms but no patient in the placebo group presented a complete response (Table 4). No adverse effects were observed in either of the groups during the study.

Discussion

The results show that the topical application of chamomile gel to the oral mucosa three times a day improved OLP symptoms, lesions and patient quality of life.

Oral lichen planus often requires long-term therapy, and so patients may present other medical problems such as diabetes,

Table 3 General linear model: mean, standard deviation (SD) and statistical contrasts

Variable (n)	Measurements		Effect		
	Pre Mean (SD)	Post Mean (SD)	Group P-value (η^2)	Time P-value (η^2)	Group*Time P-value (η^2)
Pain			0.107 (0.05)	<0.001 (0.75)	<0.001 (0.77)
Treatment (26)	5.15 (1.7)	1.88 (1.3)			
Placebo (29)	4.21 (1.8)	4.31 (1.9)			
Burning			0.322 (0.02)	<0.001 (0.44)	<0.001 (0.37)
Treatment (26)	3.04 (2.3)	1.12 (1.5)			
Placebo (29)	2.66 (2)	2.52 (2.1)			
Itching			0.204 (0.03)	<0.001 (0.21)	0.011 (0.12)
Treatment (26)	2.35 (2.6)	1.15 (1.5)			
Placebo (29)	2.59 (2.2)	2.38 (2.4)			
THONGPRASOM			0.738 (0.00)	<0.001 (0.51)	0.001 (0.19)
Treatment (26)	2.08 (0.9)	1.09 (0.5)			
Placebo (29)	1.72 (0.9)	1.64 (0.7)			
OHIP-14			0.470 (0.01)	<0.001 (0.66)	<0.001 (0.53)
Treatment (26)	12.88 (3.5)	8.38 (3)			
Placebo (29)	11.48 (2.6)	10.86 (2.4)			
ANXIETY			0.258 (0.03)	0.307 (0.02)	0.044 (0.08)
Treatment (25)	7.2 (2.4)	7.32 (2.4)			
Placebo (25)	8.4 (3.6)	8.04 (3.4)			
DEPRESSION			0.089 (0.06)	0.060 (0.07)	0.264 (0.03)
Treatment (25)	3.8 (2.9)	3.64 (2.9)			
Placebo (24)	5.38 (3.7)	5.33 (3.7)			



Figure 2 Oral Lichen planus on the buccal 1a before and 1b after 4 weeks of treatment. Oral Lichen planus on the gingiva 2a before and 2b after 4 weeks of treatment.

Table 4 Response to treatment according to criteria recommended by Carrozzo and Gandolfo ($\chi^2(2) = 31.71$; $P < 0.001$).

Response	Treatment (n = 26) n (%)	Placebo (n = 29) n (%)
Complete	5 (19.2)	0
Partial	19 (73.1)a	5 (17.2)b
No response	2 (7.7)a	24 (82.8)b

hypertension or liver disease.^{3,4} OLP is often treated with drugs such as corticosteroids and calcineurin inhibitors, whose toxicity and side-effects – candidiasis, xerostomia, burning sensation, osteoporosis, diabetes mellitus, hypertension, adrenal insufficiency – sometimes limit their use.²⁻⁷ In these cases, it may be useful, if not essential, to adopt an alternative therapy. In this scenario, phytotherapy has been adopted as a therapeutic alternative to alleviate symptoms and improve OLP patients' quality of life; it also offers the advantages of low cost, availability and absence of adverse effects.⁸⁻¹¹

Carl and Emrich¹⁵ studied 98 cases of patients with cancers of the head and neck treated with radiation, observing that chamomile mouthwashes improved oral mucositis. Fidler *et al.*,¹⁶ in a double-blind placebo-controlled study of 164 patients treated by chemotherapy with bolus-administered 5-fluorouracil (5-FU), tested the efficacy of a chamomile mouthwash. No differences were found between the chamomile group and the control group in either the incidence or severity of mucositis.

Ramos-e-Silva *et al.*¹⁰ evaluated the safety and effectiveness of a fluid extract of chamomile on pain relief in recurrent aphthous stomatitis. The analgesic effect was considered excellent by 82% and good by 18% of the patients. Tolerance was also found to be excellent by 97% of the participants.

One possible limitation in this study could be that, although responses to treatment were assessed using criteria recommended by Carrozzo and Gandolfo *et al.*,⁵ no standardized methods for evaluating the severity of the disease have been established, and there are no consensual criteria for determining levels of improvement or cure.¹⁷

The study evaluated the efficacy of 4 weeks of treatment. Studies with longer follow-ups may be needed to confirm the present finding that topical applications of chamomile are an effective alternative treatment for OLP.

References

- Baccaglini L, Thongprasom K, Carrozzo M, Bigby M. Urban legends series: lichen planus. *Oral Dis* 2013; **19**: 128–143.
- Scully C, Eisen D, Carrozzo M. Management of oral lichen planus. *Am J Clin Dermatol* 2000; **1**: 287–306.
- Lodi G, Carrozzo M, Furness S, Thongprasom K. Interventions for treating oral lichen planus: a systematic review. *Br J Dermatol* 2012; **166**: 938–947.
- Thongprasom K, Prapinjurum C, Carrozzo M. Novel therapies for oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 721–727.
- Carrozzo M, Gandolfo S. The management of oral lichen planus. *Oral Dis* 1999; **5**: 196–205.
- Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetate: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med* 2003; **32**: 315–322.
- Chainani-Wu N, Silverman S Jr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2011; **132**: 901–909.
- Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an over view. *Pharmacogn Rev* 2011; **5**: 82–95.
- Braga FT, Santos AC, Bueno PC, *et al.* Use of chamomilla recutita in the prevention and treatment of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a randomized, controlled, phase II clinical trial. *Cancer Nurs* 2015; **38**: 322–329.
- Ramos-e-Silva M, Ferreira AF, Bibas R, Carneiro S. Clinical evaluation of fluid extract of Chamomilla recutita for oral aphthae. *J Drugs Dermatol* 2006; **5**: 612–617.
- Seyyedi SA, Sanatkhan M, Pakfetrat A, Olyae P. The therapeutic effects of chamomilla tincture mouthwash on oral aphthae: a randomized clinical trial. *J Clin Exp Dent* 2014; **1**: e535–e538.
- Van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; **14**: E310–E314.
- Bjelland I, Dhal A, Huag T, Neckelmann D. The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale. An updated literature review. *J Psychosom Res* 2002; **2**: 69–77.
- Montero-Martín J, Bravo-Pérez M, Albaladejo-Martínez A, Hernández-Martín LA, Rosel-Gallardo EM. Validation the Oral Health Impact Profile (OHIP-14sp) for adults in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; **14**: E44–E50.
- Carl W, Emrich LS. Management of oral mucositis during local radiation and systemic chemotherapy: a study of 98 patients. *J Prosthet Dent* 1991; **66**: 361–369.
- Fidler P, Loprinzi CL, O'Fallon JR, *et al.* Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of 5-FU induced oral mucositis. *Cancer* 1996; **77**: 522–525.
- Wang J, van der Waal I. Disease scoring systems for oral lichen planus: a critical appraisal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015; **20**: e199–e204.



8.2.2 PUBLICACIÓN 2

Evaluation of salivary oxidate stress biomarkers, nitric oxide and C-reactive protein in patients with oral lichen planus and burning mouth syndrome

Journal of Oral Pathology & Medicine

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Peter Brennan

Impact Factor: 1.859

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 25/91 (Dentistry Oral Surgery & Medicine);
41/79 (Pathology)

Online ISSN: 1600-0714



Evaluation of salivary oxidate stress biomarkers, nitric oxide and C-reactive protein in patients with oral lichen planus and burning mouth syndrome

Asta Tvarijonavičiute^{1,2}, Cristina Aznar-Cayuela³, Camila P. Rubio¹, José J. Ceron¹, Pia López-Jornet³

¹Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis Interlab-UMU, Faculty of Veterinary Medicine, Regional Campus of International Excellence Campus Mare Nostrum, University of Murcia, Espinardo, Murcia, Spain; ²Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary School, the Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Oral Medicine, Faculty of Medicine, University of Murcia, Espinardo, Murcia, Spain

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate oxidative stress factors and C-reactive protein in the saliva of patients with oral lichen planus (OLP) and burning mouth syndrome (BMS).

METHODS: This consecutive, cross-sectional study included 20 patients with OLP, 19 with burning mouth syndrome (BMS), and 31 control subjects. The oral cavity of each patient was examined and patients responded to a quality of life questionnaire (OHIP-14) and the xerostomia inventory. The following parameters were measured in whole non-stimulated saliva: trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC); total antioxidant capacity (TAC); cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC); ferric reducing ability of plasma (FRAP); C-reactive protein (CRP); nitric oxide; nitrates; and nitrites.

RESULTS: The OLP group presented statistically significant differences in reactive oxygen species (ROS) (29 600 cps) in comparison with the control group (39 679 cps) ($P < 0.05$). In the BMS group, ROS was 29 707 cps with significant difference in comparison with the control group ($P < 0.05$). Significantly higher salivary nitric oxide (145.7 μmol) and nitrite (141.0 μmol) levels were found in OLP patients in comparison with control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Increases in nitric oxide and C-reactive protein were found in the saliva of OLP patients in comparison with BMS and control patients. Further studies are required to confirm these findings.

Keywords: antioxidant capacity; burning mouth syndrome; markers of oxidative stress; oral lichen planus; saliva

Introduction

The multiple components of saliva protect the integrity of oral tissues and can provide information about local and systemic diseases. Therefore, saliva is a useful tool for identifying and monitoring disease, and well worth exploring because of the simplicity of sample collection (1, 2).

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of free radicals and antioxidants, and it was related to various diseases such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, diabetes, and aging among others (2). Presence of oxidative stress in saliva has been also described and was associated with periodontal disease and dental caries (1, 3).

Oral lichen planus (OLP) and burning mouth syndrome (BMS) are chronic diseases of the oral mucosa characterized by persistent pain and/or discomfort that compromises quality of life of patients (3, 4). OLP is an inflammatory disease of unknown origins. Its pathogenesis has yet to be fully understood (4), although oxidative stress would appear to play an important role. In 2007, Sezer et al. (5) observed an increase in oxidative stress, since detected increased peroxidation lipids together with an imbalance in the antioxidant defense system, in patients with cutaneous lichen planus, which suggests that reactive oxygen species (ROS) could be involved in the pathogenesis of LP; recent studies have supported these findings (6–10). Sunitha and Shanmugam (11) also found an increase in nitric oxide levels in LP patients in comparison with control subjects and concluded that free radicals represent a route in pathogenesis and that excess salivary nitric oxide could be involved physiopathologically in the erosive lesions of lichen planus.

BMS is characterized by a burning sensation that affects the oral mucosa and by the absence of clinical or laboratory

J Oral Pathol Med (2016)

Correspondence: Pia López-Jornet, Hospital Morales Meseguer, Clínica Odontológica Universitaria, Adv. Marques de los vezes s/n, Murcia 30008, Spain. Tel: +34 968 398 588, Fax: +34 868 888 576, E-mail: majornet@um.es

Accepted for publication November 3, 2016



2

data that might otherwise explain this symptom. The pathogenesis of this entity remains unclear and has generated controversy in recent years (3). Its etiopathogenesis is complex and probably involves interactions between local and systemic and/or psychogenic factors (3). Although increases in ROS mechanisms in the pathogenesis of pain have been investigated, no such studies have been conducted among patients with BMS (6, 12–14). Nor is there much published research into oxidative stress among patients with BMS. Nevertheless, markers associated with the oral mucosa defense system (MUC1 y TLR2) in patients with BMS have been studied, observing increased MUC1 in patients with BMS in comparison with patients with OLP and control subjects, which suggests that MUC1 plays an important role in the appearance and evolution of burning mouth (12).

Overall, research about markers of oxidative stress and inflammation as means of explaining the role that saliva might play in OLP and BMS is scarce and poorly documented. For this reason, this study aimed to evaluate possible presence of oxidative stress in the saliva of patients with OLP and BMS, measuring total antioxidant capacity (TAC), salivary protein oxidation status, and ROS. In addition, biomarkers related with inflammation such as NO, nitrates, nitrites, and C-reactive protein (CRP) levels were also determined.

Materials and methods

Participants

This cross-sectional, consecutive study included 20 patients with OLP, 19 with BMS, and 31 control subjects attending the dental clinic at the Morales Meseguer University Hospital (University of Murcia, Spain). The study protocol was approved by the University of Murcia Research and Ethics Committee. Informed consent was obtained from all participants.

OLP patients

Inclusion criteria: Patients aged over 18 years, presence of lichen planus affecting the oral mucosa that fulfilled the clinical and histopathological criteria for OLP proposed by van der Waal (4).

Exclusion criteria: Presence of epithelial dysplasia, in receipt of drug treatment (including specific OLP treatment such as systemic corticosteroids, retinoic acid, or immunosuppressants), presence of lesions that were asymmetrical or close to silver amalgam restorations, smoking. Subjects with significant systemic diseases (e.g., diabetes mellitus, cancer, or coronary heart disease) and pregnant or lactating women were also excluded.

BMS patients

Inclusion criteria: Positive diagnosis of BMS according to Scala (3) and the International Classification of Headache Disorders.

Exclusion criteria: Patients with a history of head and neck malignancy, radiation therapy to the head and neck area, poorly managed diabetes mellitus, chronic thyroid disease, known Sjögren's syndrome, pregnancy, or unwillingness to give consent to participate.

Control subjects

The control group was made up of healthy patients recruited consecutively from the University of Murcia Dental School.

Exclusion criteria: Patients receiving medication or with habits that might potentially interfere with the study, such as the administration of immune suppressants, non-steroidal anti-inflammatories, vitamins, smoking, or alcohol consumption. Subjects with significant systemic diseases (e.g., diabetes mellitus, cancer or coronary heart disease, infection), or pregnant or lactating females were also excluded.

Oral examination

A clinical history was registered for each subject, and complete examination of the oral cavity was performed by an oral medicine professional. A periodontal examination of each patient was made, and any patients with periodontitis were excluded.

All patients responded to the following questionnaires

- 1 The Xerostomia Inventory (15): The xerostomia inventory takes the form of a questionnaire designed to investigate symptoms. It consists of 11 items. Patients respond by scoring from zero to five according to the absence (0) or severity (5) of the symptom, a higher score indicating greater severity.
- 2 Oral Health Impact Profile (OHIP-14) (16): This questionnaire detects changes in oral quality of life. It consists of 14 items that explore different aspects of oral function and quality of life.

Saliva collection

Patients were asked not to brush their teeth, take food, or any other substance for 2 h before saliva collection. Each patient rinsed his/her mouth with distilled water before collection. All the samples were collected at stable room temperature. Non-stimulated saliva was obtained using the draining method (17) in the absence of chewing movements, in dry plastic vials with the test subject sitting in a relaxed position. In all cases, saliva samples were taken in the morning between 9:00 and 11:00 am. Samples with blood contamination (determined by visual inspection) were excluded.

Laboratory methods

Saliva was centrifuged immediately after collection at 3000 rpm for 10 min 4°C, placed in an Eppendorf tube, and stored at –80°C until analysis <1 month in all cases.

Sample analysis

TAC was evaluated by measurement of TEAC1, TEAC2, CUPRAC, FRAP.

TEAC1 assay

TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) 1 was based on the method described by Arnao et al. (18). In brief, ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) is a peroxidase substrate, which when oxidized in the presence of H₂O₂ in a peroxidative reaction, generates a radical cation radical (ABTS^{•+}) (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid).



The formation of ABTS^{•+} produces a blue-green color and the antioxidants present in the sample suppress this color production to a degree that is considered proportional to their concentrations. ABTS^{•+} was generated using horseradish peroxidase, H₂O₂ and ABTS. To perform the assay, 5 µl of the sample was added to the reaction medium containing 2 mmol/l ABTS, 0.25 µmol/l HRP and 40 µmol/l H₂O₂ in 50 mmol/l phosphate buffer (pH 7.5); disappearance of the radical was estimated by the decrease in absorbance at 700 nm. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA) solution at concentrations of 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 and 0.0 mmol/l were used to calibrate the assay. The assay results were expressed in millimoles of Trolox equivalents per liter.

TEAC2 assay

TEAC2 was determined using the method described by Erel (19), based on 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) decolorization by antioxidants according to their concentrations and antioxidant capacities. The color change was measured as a change in light absorbance at 600 nm. The first reagent consisted in 40 mmol/l acetate buffer (pH 5.8) and the second reagent contained 2 mmol/l H₂O₂ and 10 mmol/l ABTS in 30 mmol/l acetate buffer solution (pH 3.6). The assay was calibrated with Trolox and activity was expressed as mmol/l. All analytes were assayed with an automated analyzer (AU 600 automated biochemical analyzer, Olympus, Minneapolis, Minn, USA).

CUPRAC assay

The CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) assay is based on the reduction of Cu²⁺ into Cu¹⁺ by the action of the non-enzymatic antioxidants present in the sample. The oxidant complex consisted of Cu²⁺-bathocuproinedisulfonic acid (Cu²⁺-BCS) (bathocuproinedisulfonic acid disodium salt), which reacts with the antioxidants in the sample and is reduced to a Cu¹⁺-bathocuproinedisulfonic acid (Cu¹⁺-BCS), a stable complex that has a maximum absorbance at 490 nm (20). The antioxidant capacity of the sample is assumed to be equal to the extent of the complex Cu¹⁺-BCS formation. Final concentrations of 0.25 mmol/l bathocuproinedisulfonic acid disodium salt (reagent 1) and 0.5 mmol/l CuSO₄ (reagent 2) were used for the assay. In brief, a 5 µl volume of sample was pipetted. Then, 195 µl of the reagent 1 were added and a first reading at 480 nm was taken. Subsequently, 50 µl of the reagent 2 were added to the reaction. A second reading was taken and the difference between the first and the last absorbance was used to calculate antioxidant activity. Trolox solution at concentrations of 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 and 0.0 mmol/l were used to calibrate the assay. The results obtained from test samples were compared with a standard curve obtained with Trolox and were expressed as millimoles of Trolox equivalents per liter.

FRAP assay

FRAP (ferric reducing ability of plasma) measurement was based on the method described by Benzie and Strain (21) with some modification. The method relies on the principle that antioxidants present in the sample reduce the ferric-

tripyriddytriazine (Fe³⁺-TPTZ) complex to ferrous tripyriddytriazine (Fe²⁺-TPTZ), which has a blue color. The color intensity is proportional to the reducing capacity of the mainly non-enzymatic antioxidants in the plasma (Benzie and Strain, 1996). In brief, 300 µl freshly prepared FRAP reagent were pipetted and 10 µl of sample were added to the reagent. Absorbance readings at 600 nm were taken before and after the addition of the sample. The calibration curve was obtained with known concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/l) of Fe (II) solution, and the results were expressed in millimoles Fe(II) equivalents per liter. Total esterase activity (TEA) was measured as previously described (22).

Salivary protein oxidation status was evaluated by measuring advanced oxidation protein product (AOPP) concentrations as described by Witko-Sarsat et al. (1996) (23) with some modification. In brief, 50 µl of sample was mixed with 160 µl of 0.074 M potassium iodide and 25 µl of acetic acid (50%), and incubated at 37°C for 40 s; absorbance was read at 340 nm. Chloramine-T (0–500 µM) was used to generate a calibration curve. The intra-assay coefficient of variation was below 10% for saliva samples.

Reactive oxygen species (ROS) were estimated by luminol-mediated chemiluminescence assay (24). In brief, 10 µl of saliva sample was mixed with 90 µl of NaCl (0.9%), 125 µl of luminol (0.5 mM), and 25 µl of horseradish peroxidase (HRP, 0.025 mM). Chemiluminescence was measured with a microplate reader (VICTOR 1420 multilabel counter; PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy; Turku, Finland) in counts per second (cps). The intra-assay coefficient of variation was below 11% for saliva samples. NO, Nitrates, and Nitrites in saliva samples were measured according to methods described by García-Robledo and Sokratis Papaspyrou (25). Intra-assay coefficients of variation for salivary NO, nitrites, and nitrates were below 11%, 7%, and 15%, respectively.

C-reactive protein levels were measured in saliva using homemade TR-IFMA. In brief, 200 ng/well of biotinylated goat anti-CRP antibodies was pipetted into streptavidin-coated microtitration wells and incubated for 1 h at room temperature. Next, strips were washed four times and 200 µl/well of samples or standards dissolved in assay buffer (Assay Buffer, PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy; Turku, Finland) was added. Both samples and standards were incubated for 1 h, and after a second wash, 200 µl of europium-labeled mouse anti-CRP antibodies was added to each well. The strips were incubated for 45 min and then washed again. Finally, 200 µl/well of enhancement solution was added, and strips were incubated for 5 min. The enhanced fluorescence, proportional to the quantity of CRP in the sample, was measured with a multilabel counter (VICTOR 1420 multilabel counter, PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy; Turku, Finland).

Statistical analysis

All data were registered as medians and percentiles (unless otherwise stated). These were calculated using routine descriptive statistical procedures and software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were evaluated for approximate normality of distribution using the D'Agostino and Pearson omnibus normality



4

test, giving a nonparametric distribution; the Kruskal–Wallis test with multiple comparison and the Dunn's post-test were used to compare different groups. Correlations between variables were estimated using Spearman's correlation analysis. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

General characteristics of the included patients are shown in Table 1. Salivary total antioxidant capacity as determined by TEAC1, TEAC2, CUPRAC, and FRAP methods was statistically significantly higher in patients with OLP and BMS, when compared with control group (Table 2). ROS was lower in the two patients groups in comparison with healthy controls ($P < 0.001$ in both cases). AOPP, NO, and nitrates were higher in both groups of patients, although statistical significance with respect to control group was observed only in OLP group.

OLP group showed statistically significantly higher salivary CRP levels when compared with healthy and BMS groups (Fig. 1).

OLP group correlations

Correlations were identified between xerostomia inventory results and TEAC1 (mM; $r = 0.526$; $P = 0.011$); FRAP (mM; $r = 0.509$; $P = 0.013$); CUPRAC (mM; $r = 0.477$; $P = 0.019$); and TEAC2 (mM; $r = 0.466$; $P = 0.022$).

BMS group correlations

Correlations were identified between the xerostomia inventory results and ROS ($r = 0.548$, $P = 0.008$), and Nitrates ($r = 0.462$, $P = 0.043$). Correlations were also identified

between the mean OHIP-14 quality of life score and ROS ($r = 0.635$; $P = 0.002$).

Discussion

Saliva was suggested to be a biofluid that reflects the general health of the organism. As saliva is rich in antioxidants, it can act as the first line of defense against oxidative stress (5–9). Oxidative stress was involved in the pathogenesis of many diseases including cardiovascular disease, diabetes, and periodontal disease (1). In the present study, the salivary TAC was increased and ROS decreased in patients with OLP and BMS compared with control subjects. Furthermore, saliva from OLP patients presented higher NO, nitrite, and CRP levels.

OLP is a chronic inflammatory process in which nitric oxide plays an important role, synthesized from amino acid L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase. Nitric oxide, a signaling molecule, acts as a 'double-edged sword' that affects many physiological and pathological processes. Low levels of nitric oxide are associated with hemostatic actions, such as immune functions, blood flow, platelet aggregation, neurotransmission, and memory, while excess production of nitric oxide is involved in inflammatory and immunological disorders, pain, neurological diseases, atherosclerosis, and cancer (26–28). It also plays an important role in the appearance and progression of tumors, with the participation of mechanisms such as DNA damage, the induction of tumor angiogenesis, and the promotion of tumor invasion and metastasis. Several studies have been published on the role of nitric oxide in the etiopathology of OLP (26, 27). In a sample of 40 cutaneous LP patients, Sezer et al. (5) found NO increases in serum. Mehdi pour

Table 1 General characteristics of the samples

	Control $n = 31$	OLP $n = 20$	SBA $n = 19$	P
Age	33.0 (18.0–67.0)	57.5 (37.0–75.0)	70.0 (54.0–83.0)	0.008
Sex, M/W	11/20	0/20	1/19	NS
Evolution		2.0 (0.5–9.0)	2.5 (1.0–5.0)	NS
OHIP		10.0 (2.0–36.0)	18.5 (4.0–40.0)	0.07
Xerostomia inventory		14 (3–31)	26 (5–45)	0.003

Table 2 Median (25–75 percentile) data of salivary oxidative stress markers in healthy controls ($n = 31$) and patients suffering from OLP ($n = 20$) and SBA ($n = 19$)

Analyte	Control	OLP	BMS
TEAC1, mM	0.296 (0.210–0.541)	0.546 (0.468–0.771)***	0.478 (0.389–0.678)*
TEAC2, mM	0.172 (0.128–0.303)	0.305 (0.237–0.519)***	0.261 (0.197–0.449)*
CUPRAC, mM	0.154 (0.104–0.245)	0.282 (0.223–0.493)***	0.265 (0.194–0.422)**
FRAP, mM	0.249 (0.169–0.677)	0.613 (0.478–1.085)***	0.844 (0.397–0.878)**
TEA, IU/l	61.45 (30.44–68.30)	49.78 (29.23–59.97)	45.70 (36.11–68.53)
AOPP, μ mol	226.4 (107.4–360.6)	448.1 (305.3–1577.0)**	331.7 (133.9–568.2)
ROS, cps	39 679 (38 033–40 944)	29 600 (29 525–29 914)***	29 707 (29 497–29 952)***
NO, μ mol	17.85 (10.94–88.60)	145.7 (107.6–326.1)*	159.3 (20.35–245.7)
Nitrite, μ mol	22.02 (7.10–83.95)	141.0 (76.95–328.8)**	95.75 (32.95–203.2)
Nitrate, μ mol	17.62 (1.41–72.25)	23.85 (2.01–70.93)	29.00 (0.75–94.00)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control group.

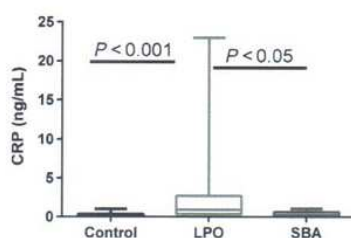


Figure 1 Salivary C-reactive protein (CRP) concentration in healthy controls ($n = 31$), and patients with OLP ($n = 20$) and BMS ($n = 19$). Horizontal lines show median values, boxes show 25–75 percentiles, and whiskers show ranges.

et al. (27) analyzed NO levels in serum of OLP patients finding higher levels than among control subjects; the authors commented that it would appear that NO could act on T4 lymphocytes and inhibit their apoptosis through regulation of mitochondrial intermembrane ionic strength causing erosion and ulceration as a result of cell damage. The present study found increased levels of NO and nitrites in the saliva of OLP patients with statistically significant differences in comparison with the BMS and control groups; a correlation between NO levels and OLP evolution time was also identified. These findings agree with Ohashi et al. (26), who obtained increased NO levels in the saliva of OLP patients and recurrent aphthous ulcers. Sunitha and Shanmugam (11) also found increased NO levels in saliva collected from OLP patients in comparison with control subjects indicating that NO salivary levels may be involved in the physiopathology of LP erosive lesions and ulcers. However, Brennan et al. (28) investigated NO in 30 patients with reticular OLP by means of immunohistochemical analysis but failed to validate any significant difference between OLP patients and control subjects; perhaps this might be explained by the study's use of tissue samples for analysis, which may have produced false-negative results.

CRP, a marker of inflammation (29–32), synthesized by the liver and adipocytes, has been recognized as an important biological marker of a wide range of conditions such as systemic inflammation, osteomyelitis, rheumatoid arthritis, and vasculitis. Some studies have also revealed an association between CRP levels and chronic inflammation, which correlates to premalignant lesions. Some researchers back the hypothesis that CRP increases precede the appearance of some cancers such as lung cancer, colorectal cancer, and also signal a bad prognosis of squamous cell carcinoma (SCC); however, the exact nature of CRP involvement in the development and progression of cancer remains unclear (31).

The main function of this protein lies in the defense of the host (29). The present study found increased CRP in saliva samples taken from OLP patients in comparison with BMS patients and control subjects with statistically significant differences. While this marker in serum is widely used in clinical practice, few studies have evaluated CRP levels in saliva.

Hashemy et al. (32) found no differences in CRP serum levels between patients with OLP and control subjects but

perhaps their results might be explained by the different methods applied in their analysis. To date, no other research initiative has looked into a possible association between CRP and OLP as a potentially malignant disorder. CRP may play a role in carcinogenesis, acting as a prognostic biomarker of potentially malignant disorders including oral cancer, a possibility that calls for further investigation.

BMS is of complex etiopathology, involving interactions between local, systemic and/or psychogenic factors (3). The present study's findings highlight the decreased levels of ROS in patients affected by BMS. These results disagree with Tatullo et al. (14) who carried out oxidative stress assessment in the blood of 18 patients with BMS and five control subjects, obtaining higher oxidative stress among patients with BMS when the condition was at its most painful phase, which progressively returned to normal when pain subsided.

The present study included patients with OLP or BMS, both entities that are often accompanied by xerostomia, so that data deriving from saliva analysis needed careful assessment as some analytes can be modified by saliva flow (8, 10, 33). Saliva is sensitive to change, and for this reason, the study applied standard conditions for sample collection, which was performed by a single clinician under the same environmental conditions and circadian rhythms, excluding any patients with periodontal disease. One study limitation was that the exclusion of saliva samples with blood contamination was applied on the basis of visual inspection, but tiny traces of blood could have altered protein levels in the saliva samples.

In conclusion, the study found increased antioxidant biomarkers in both OLP and BMS patients. Increased levels of the marker of inflammation CRP were observed in OLP patients, as well as increased NO production. The findings suggest that the evaluation of these markers could be beneficial in clinical practice to classify the risk of new events, and to aid the choice of differential interventions for this population. The field demands further investigation to identify potential 'salivary biomarkers' for early diagnosis and/or the monitoring of human diseases.

References

- Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress: a critical review. *Free Radic Biol Med* 2015; **85**: 95–104.
- Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; **5**: 73.
- Scala A, Checchi L, Montevecchi M, Marini I, Giamberardino MA. Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; **14**: 275–91.
- van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; **14**: E310–4.
- Sezer E, Ozugurlu F, Ozyurt H, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**: 430–4.
- Azizi A, Farshchi F. Comparison of salivary and plasma antioxidant levels in lichen planus patients and healthy subjects. *J Oral Pathol Med* 2012; **41**: 524–6.



7. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *Int J Dent Hyg* 2009; **7**: 246–50.
8. Battino M, Greabu M, Totan A, et al. Oxidative stress markers in oral lichen planus. *BioFactors* 2008; **33**: 301–10.
9. Ergun S, Trosala SC, Warnakulasuriya S, et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2011; **40**: 286–93.
10. Lopez-Jornet P, Martinez-Canovas A, Pons-Fuster A. Salivary biomarkers of oxidative stress and quality of life in patients with oral lichen planus. *Geriatr Gerontol Int* 2014; **14**: 654–9.
11. Sunitha M, Shanmugam S. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosal diseases: a controlled clinical trial. *Ind J Dent Res* 2006; **17**: 117–20.
12. Kho HS, Chang JY, Kim YY, Kim Y. MUC1 and Toll-like receptor-2 expression in burning mouth syndrome and oral lichen planus. *Arch Oral Biol* 2013; **58**: 837–42.
13. Srinivasan M, Kodumudi KN, Zunt SL. Soluble CD14 and toll like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Clin Immunol* 2008; **126**: 31–7.
14. Tatullo M, Marrelli M, Scacco S, et al. Relationship between oxidative stress and “burning mouth syndrome” in female patients: a scientific hypothesis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; **16**: 1218–21.
15. Thomson WM. Measuring change in dry-mouth symptoms over time using the Xerostomia Inventory. *Gerodontology* 2007; **24**: 30–5.
16. Montero-Martin J, Bravo-Pérez M, Albaladejo-Martínez A, et al. Validation the Oral Health Impact Profile (OHIP-14sp) for adults in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; **14**: E44–50.
17. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *J Dent Res* 1992; **71**: 1363–9.
18. Arnao MB, Cano A, Acosta M. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Re Devel Agric Food Chem* 1998; **2**: 893–905.
19. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; **37**: 277–85.
20. Campos C, Guzmán R, López-Fernández E, Casado Á. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC–BCS assay. *Anal Biochem* 2009; **392**: 37–44.
21. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; **239**: 70–6.
22. Tecles F, Tvarijonaviciute A, De Torre C, et al. Total esterase activity in human saliva: validation of an automated assay, characterization and behaviour after physical stress. *Scand J Clin Lab Invest* 2016; **76**: 324–30.
23. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; **49**: 1304–13.
24. Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2014; **192**: 1870–7.
25. García-Robledo E, Corzo A, Papaspyrou S. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Mar Chem* 2014; **162**: 30–6.
26. Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1999; **28**: 355–9.
27. Mehdipour M, Taghavi Zenouz A, Bahramian A, Gholizadeh N, Boorghani M. Evaluation of serum nitric oxide level in patients with oral lichen planus. *J Dent (Shiraz)* 2014; **15**: 48–51.
28. Brennan PA, Umar T, Palacios-Callender M, et al. A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2000; **29**: 249–54.
29. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1805–12.
30. Kumar ABS. Altered C-reactive protein levels in serum of oral precancer patients in comparison with healthy controls. *Int J Oral Maxillofac Pathol* 2011; **2**: 16–9.
31. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 2007; **109**: 54–9.
32. Hashemy SI, Gharaii S, Vasigh S, et al. Oxidative stress factors and C-reactive protein in patients with oral lichen planus before and 2 weeks after treatment. *J Oral Pathol Med* 2016; **45**: 35–40.
33. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mohammadpour N. Muscarinic cholinergic receptors (MR3) in saliva of patients with oral lichen planus. *Arch Dermatol Res* 2016; **308**: 481.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Program ‘Juan de la Cierva’ of ‘Ministerio de Economía y Competitividad’, Spain, through a postdoctoral grant and by the Seneca Foundation of Murcia Region (19894/GERM/15).

Conflict of interest

The authors declare there are no conflict of interests.



9. ANEXOS



ANEXO 9.1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña.....deaños de
edad con D.N.I nº.....

DECLARO BAJO MI RESPONSABILIDAD:

Que he sido informado del propósito y naturaleza del tratamiento al que seré sometido, cuyo objetivo es formar parte del Proyecto de Investigación titulado: **EFICACIA CLÍNICA DE LA APLICACIÓN TÓPICA ANTIOXIDANTE EN PACIENTES CON LIQUEN PLANO ORAL**, así como los riesgos que pueden existir en el mismo.

Que no padezco ninguna enfermedad que no haya declarado.

Que acepto y autorizo la realización de los exámenes complementarios necesarios para el tratamiento (sialometrías basal y estimulada) así como las encuestas de bienestar y salud oral.

Que autorizo la utilización del material de mi examen para que se utilice de manera anónima en la enseñanza, investigación o publicación científica.

Que doy mi consentimiento para realizar el tratamiento programado y las alternativas al mismo que puedan surgir, eximiendo de las responsabilidades jurídicas y legales derivadas de las causas de la realización de dicho tratamiento.

Que doy mi consentimiento explícito para que mis datos sean incluidos en un fichero que estará sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de protección de datos.

Y para que así conste a todos los efectos.

Murcia,..... de.....de.....



ANEXO 9.2. NOTA INFORMATIVA AL PACIENTE

La unidad docente de Medicina Bucal de la Universidad de Murcia le invita a participar en un estudio que tiene por objetivo valorar la **EFICACIA CLÍNICA DE LA APLICACIÓN TÓPICA ANTIOXIDANTE PACIENTES CON LIQUEN PLANO ORAL**.

La duración del estudio es de 4 semanas, lo cual implica que usted solamente se tendrá que desplazar al centro dos veces en ese periodo de tiempo, el día de la primera visita, en el que se le incluirá en el estudio, y en la visita de finalización del estudio, 4 semanas después de la primera.

A las 2 semanas de haber acudido a la primera visita, el investigador se pondrá en contacto con usted, mediante una llamada telefónica, para controlar la evolución de los síntomas, al igual que para registrar cualquier posible efecto adverso que se presentara.

Las sustancias que se van a utilizar en el estudio son *Chamaemillum nobile* al 2% y una sustancia de las mismas características externas que tiene efecto placebo. Este principio activo ya ha sido utilizado en humanos específicamente en la mucosa oral.

Debemos de tener en cuenta que en el caso de que no surja efecto, no debe de empeorar sus síntomas.

No se han encontrado efectos secundarios para la camomila, aunque su uso está contraindicado si tiene algún tipo de hipersensibilidad a esta sustancia, se puede utilizar en mujeres embarazadas y en lactancia, y no afecta al manejo de la maquinaria.

Si padeciera algún síntoma adverso deberá de ponerse en contacto con la Dra. Pía López Jornet en el siguiente número de teléfono 868-888583/9. Del mismo modo, que si le surgiera cualquier duda sobre el estudio o necesite una mayor información.



En el transcurso del estudio puede ser necesaria alguna prueba complementaria, analítica de sangre, etc. lo que conllevará a visitas médicas adicionales.

Para llevar a cabo este estudio su colaboración resulta completamente necesaria, siempre de forma anónima y voluntaria, pudiendo renunciar a seguir con el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte a la relación con su médico ni repercuta en cuidados y tratamientos posteriores por parte de este.

Todos los datos van a ser utilizados según las medidas de seguridad establecidas por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal y si estos datos se transmitieran a terceros se hará según lo establecido en la mencionada Normativa y en el R.D. 994/99. Además usted tiene el derecho al acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento.



ANEXO 9.3. INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Investigación



Comisión de
Ética de
Investigación



CAMPUS MARE NOSTRUM

INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión
de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D^a. María Pía López Jornet ha presentado el proyecto de
investigación titulado "*Tratamiento tópico Chamaemelum nobile 2% en
pacientes con Liquen plano oral*", a la Comisión de Ética de Investigación de la
Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de
conformidad con lo acordado el día 4 de marzo de 2015¹, por unanimidad, se
emite INFORME FAVORABLE.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta
certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia a 6
de marzo de 2015.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Antonio Juan García Fernández

ID: 1022/2015

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las
Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de
aprobación



ANEXO 9.4. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS (CDR)

Código de protocolo

ESTUDIO PACIENTES LIQUEN PLANO ORAL

CÓDIGO PACIENTE			
INICIALES PACIENTE			
	NOMBRE	PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO
CÓDIGO PACIENTE	LPO-		
INICIALES PACIENTE			



VISITA 1: BASAL

Fecha de la visita Basal:/...../.....

DATOS DEL PACIENTE

Edad/..... Años Sexo: 1: Masculino 2: Femenino

Fecha de nacimiento:/...../.....

Historia clínica Nº:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Paciente mayor de 18 años...../.....

Liquen plano oral...../.....

Consentimiento informado escrito antes de participar en el estudio...../.....



CRITERIOS EXCLUSIÓN

Consumo de fármacos con reacción liquenoide.....

Embarazo o lactancia...../.....

No firmar el consentimiento informado

DESARROLLO DEL ESTUDIO

¿Se ha instruido al paciente respecto a la pauta correcta
de utilización del medicamento?

SÍ..... NO.....

¿Se ha entregado al paciente un bote para
usar durante las cuatro semanas de duración del tratamiento (etiquetado como basal)

SÍ..... NO.....

PLANIFICACIÓN DE LAS VISITAS DEL ESTUDIO

INVESTIGADOR: Dra.:.....

Firma:/...../.....



CONSENTIMIENTO INFORMADO (ANEXO 9.1)

¿El paciente ha leído la hoja de “Información al paciente” y ha dado su consentimiento por escrito para participar en el estudio?

SÍ..... NO.....

El paciente ha recibido la hoja de información general

con fecha/...../.....

MEDICACIÓN CONCOMITANTE

Por favor, indique la medicación concomitante del paciente en la hoja de

MEDICACION CONCOMITANTE

PRESENCIA DE ESTRIAS SI..... NO.....

PRESENCIA DE AREAS ATRÓFICAS SI..... NO.....

PRESENCIA DE AREAS EROSIVAS SI.....

- Datos del paciente: edad, fecha de nacimiento y sexo.
- Verificación de los criterios de selección: inclusión/exclusión.
- Medicación concomitante.
- Criterios Clínicos según Thongprason y cols, 1992:



- 0: no lesión.
- 1: estrías blancas, no área eritematosa.
- 2: estrías blancas con áreas atróficas < 1cm².
- 3: estrías blancas con áreas atróficas > 1cm².
- 4: estrías blancas con áreas erosivas < 1cm².
- 5: estrías blancas con áreas erosivas > 1cm² o lesión ulcerativa.
- Escala Visual Analógica para el dolor, ardor o escozor (0 = no sintomatología, 10 = sintomatología extrema).
- OHIP-Sp (Spanish version of the Oral Health Impact Profile): cuestionario de calidad de vida.
- Escala HAD: cuestionario de ansiedad-depresión hospitalaria que determina los problemas psicológicos.
- Toma de registros fotográficos.

ENFERMEDADES SISTÉMICAS

MEDICACIÓN

HÁBITOS

Tabaco si Numero cigarrillos / No
Ex fumador si

Consumo de Alcohol: >11.5g/día – 0 puntos 1.5 a 11.5 – 1 punto <1.5 – 2 puntos

Tratamientos utilizados:

Corticoides tópicos

Corticoides sistémicos

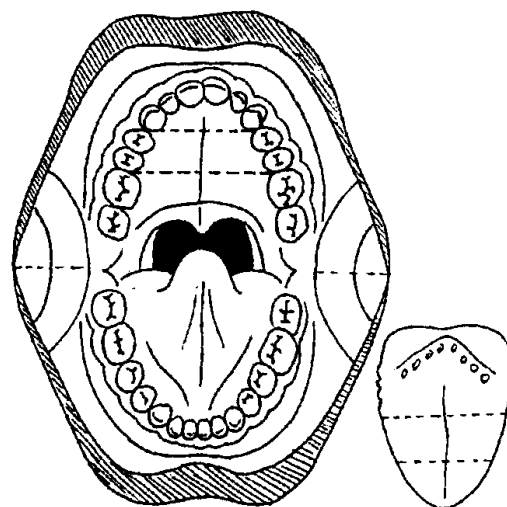
Otros tratamientos LPO

1. Tiempo de evolución de la enfermedad:

2. Presencia de lesiones metacéntricas y bilateralidad.

- Localización:

- borde rojo
- mucosa labial
- mucosa yugal
- mucosa alveolar
- encía
- paladar duro
- mucosa faucial
- lengua dorso
- lengua vientre
- suelo de boca



- Tipo: LPO:

3. Predominio blanco versus LPO predominio rojo.

INICIALES PACIENTE

Localización	M bucal	Encía	Paladar	Lengua	F Vesti	Suelo b	Labios
Número							
Tamaño							
Forma clín.							
Total :							



4. Sintomatología:

ESCALA VISUAL ANALÓGICA (EVA) : DOLOR

0 (bien) ————— (mal) 10

ESCALA VISUAL ANALÓGICA: ARDOR 0 ————— 10

ESCALA VISUAL ANALÓGICA: ESCOZOR 0 ————— 10

CÓDIGO PACIENTE

LPO- Estudio histológico

Índice de O'Leary:

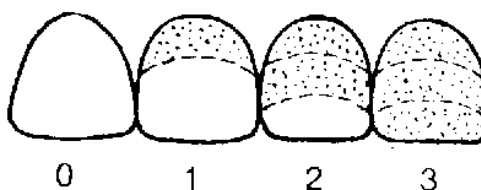
- Depósitos Blandos:

0 → No hay depósitos ni pigmentaciones.

1 → Existen depósitos en no más del 1/3, o no hay pigmentación.

2 → Existen depósitos que cubren más del 1/3, pero menos que 2/3.

3 → Los depósitos cubren más de 2/3 de la superficie dentaria.



-Depósitos Duros:

0 → No hay tártaro.

1 → Tártaro supragingival no es más de 1/3.

2 → Tártaro supragingival cubre más de 1/3, pero no más de 2/3 (es típico en molares superiores)

3 → Cubre más de 2/3 o existe banda de tártaro subgingival que rodea la porción cervical del diente (más típico en piezas anteroinferiores por la salida de la Gl. Submaxilar).



Pruebas funcionales saliva:

Test de severidad para xerostomía (Xerostomia Inventory) (Thomson y cols., 1999) referido en las últimas 4 semanas (PUNTUACIÓN MÁXIMA 55)

Situaciones	Nunca	Rara vez	Ocasionalmente	Bastantes veces	Muchas veces
1. ¿Con qué frecuencia ha sentido su boca seca?					
2. Mi boca está seca					
3. Mis labios están secos					
4. Me levanto en mitad de la noche a beber líquido					
5. Mi boca está seca cuando como comida					
6. Tomo líquidos para ayudarme a tragar la comida					
7. Chupar caramelos mejora la sensación de boca seca					
8. Mi garganta está seca					
9. La piel de mi cara está seca					
10. Mis ojos están secos					
11. El interior de mi nariz está seco					

TEST DE DRENAJE

ml / 5 min **Características**

CRITERIOS CLÍNICOS THONGPRASOM Y COLS, 1992

0: NO LESIÓN

1: ESTRÍAS BLANCAS, NO ÁREA ERITEMATOSA

2: ESTRÍAS BLANCAS CON ÁREAS ATRÓFICAS < 1 cm²

3: ESTRÍAS BLANCAS CON ÁREAS ATRÓFICAS > 1 cm²

4: ESTRÍAS BLANCAS CON ÁREAS EROSIVAS < 1 cm²

5: ESTRÍAS BLANCAS CON ÁREAS EROSIVAS > 1 cm² O LESIÓN ULCERATIVA



OHIP-14sp ORAL HEALTH IMPACT PROFILE-Spanish Version

Piense en los últimos 3 meses y responda con qué frecuencia su sequedad de boca le ha generado alguna de las siguientes situaciones:

Situaciones	Nunca	Rara vez	Ocasionalmente	Bastantes veces	Muchas veces
Problemas al pronunciar correctamente					
Sensación de mal sabor					
Sensación de molestia o dolor					
Incomodidad a la hora de comer					
Timidez					
Preocupación					
Insatisfacción con la alimentación que lleva					
Interrupción de comidas					
Tensión o ansiedad					
Vergüenza o lástima					
Susceptibilidad/Irritabilidad con los demás					
Alteración de sus tareas/ocupaciones habituales					
Sensación de tener una vida menos satisfactoria					
Totalmente incapaz de llevar una vida normal					



Escala Hospitalaria de ansiedad-depresión (HAD)

NOMBRE:

FECHA:

LOS MÉDICOS CONOCEN LA IMPORTANCIA DE LOS FACTORES EMOCIONALES EN LA MAYORÍA DE ENFERMEDADES. SI EL MÉDICO SABE CUÁL ES EL ESTADO EMOCIONAL DEL PACIENTE, PUEDE PRESTARLE ENTONCES MAYOR AYUDA.

ESTE CUESTIONARIO HA SIDO CONFECCIONADO PARA AYUDAR A QUE SU MÉDICO SEPA COMO SE SIENTE USTED AFECTIVA Y EMOCIONALMENTE. NO ES PRECISO QUE PRESTE ATENCIÓN A LOS NÚMEROS QUE APARECEN AL MARGEN IZQUIERDO. LEA CADA PREGUNTA Y SUBRAYE LA RESPUESTA QUE USTED CONSIDERE QUE COINCIDA CON SU PROPIO ESTADO EMOCIONAL EN LA ÚLTIMA SEMANA.

NO ES NECESARIO QUE PIENSE MUCHO TIEMPO CADA RESPUESTA; EN ESTE CUESTIONARIO LAS RESPUESTAS ESPONTÁNEAS TIENEN MAYOR VALOR QUE LAS QUE SE PIENSAN MUCHO.

A	Me siento tenso/a o nervioso/a:
3	Casi todo el día
2	Gran parte del día
1	De vez en cuando
0	Nunca



D		Sigo disfrutando con las mismas cosas de siempre:
0		Ciertamente igual que antes
1		No tanto como antes
2		Solamente un poco
3		Ya no disfruto con nada
	A	Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder:
	3	Si y muy intenso
	2	Sí, pero no muy intenso
	1	Sí, pero no me preocupa
	0	No siento nada de eso
D		Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas:
0		Igual que siempre
1		Actualmente algo menos
2		Actualmente mucho menos
3		Actualmente en absoluto
	A	Tengo la cabeza llena de preocupaciones:
	3	Casi todo el día
	2	Gran parte del día



	1	De vez en cuando
	0	Nunca
D		Me siento alegre:
3		Nunca
2		Muy pocas veces
1		En algunas ocasiones
0		Gran parte del día
	A	Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajadamente:
	0	Siempre
	1	A menudo
	2	Raras veces
	3	Nunca
D		Me siento lento/a o torpe:
3		Gran parte del día
2		A menudo
1		A veces
0		Nunca
	A	Experimento una desagradable sensación de "nervios y hormigueo":



	0	Nunca
	1	Solo en algunas ocasiones
	2	A menudo
	3	Muy a menudo
D		He perdido el interés por mi aspecto personal:
3		Completamente
2		No me cuido como debería hacerlo
1		Es posible que no me cuide como debiera
0		Me cuido como siempre lo he hecho
A		Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme:
3		Realmente mucho
2		Bastante
1		No mucho
0		En absoluto
D		Espero las cosas con ilusión:
0		Como siempre
1		Algo menos que antes
2		Mucho menos que antes
3		En absoluto



	A	Experimento de repente sensaciones de gran angustia o temor: 3 Muy a menudo 2 Con cierta frecuencia 1 Raramente 0 Nunca
D		Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión: 0 A menudo 1 Algunas veces 2 Pocas veces 3 Casi nunca
		Revise el cuestionario por si ha olvidado de responder a alguna pregunta Espacio a rellenar por el médico. D (8-10) ----- A (8-10) -----



EFFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATAMIENTO:

NINGUNO

MAL SABOR

Se valora la respuesta al tratamiento según los criterios establecidos por Carrozo y Gandolfo.

En general, el uso de este producto ha sido:

1. Extremadamente beneficioso (desaparición de todos o la mayoría de los síntomas)
2. Beneficioso (solo persisten síntomas mínimos)
3. Un poco beneficioso (alivio de algunos síntomas con poca satisfacción)
4. Sin cambios (no hay cambios en los síntomas o necesita otro tratamiento)
5. Perjudicial (empeoramiento o incremento de síntomas)

CUMPLIMIENTO DEL USO DEL PRODUCTO

Cumplimiento

Días de uso

Uso del producto:.....

.....

Cumplimiento:

1.- Correcto (aceptable; uso real aproximado >80 % del previsto): Uso mínimo de 22 días.



2.- Regular (aceptable; uso real aproximado entre 60-80% del previsto): Uso entre 22 - 17 días.

3.- Insuficiente (no aceptable; uso real aproximado < 60% del previsto): Uso inferior a 17 días.

ABANDONO / RETIRADA

¿El paciente ha abandonado el estudio antes de finalizarlo?

NO

☐

SÍ

☐

En caso afirmativo, causa del abandono:

☐ 1. Ineficacia del tratamiento.

☐ 2. Acontecimiento adverso

☐ 3. Pérdida en el seguimiento

☐ 4. Incumplimiento en el plan. Especificar:.....

☐ 5. Otras. Especificar:.....



ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Por favor, indique si el paciente ha presentado algún acontecimiento adverso a lo largo del tratamiento:

Descripción	Gravedad	Relación Causal	Frecuencia	Intensidad	Fecha Inicio	Fecha Final	Medidas adoptadas y resultado
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							

A. Gravedad: 1 (Grave); 2 (No grave)

B. Relación causal: A (Probable); B (Posible); N (Sin relación causal); O (No clasificado)

C. Frecuencia: 0 (una vez); 1 (ocasionalmente); 2 (Frecuentemente); 3 (Permanentemente)

D. Intensidad: 1 (Leve); 2 (Moderado); 3 (Intensa)



ANEXO 9.5. DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL

Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964
y enmendada por la

29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983

41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989

48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996

52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la
AMM,

Washington 2002

Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la
AMM,

Tokio 2004

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008



A. INTRODUCCIÓN

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.
2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.
3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.
4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".
5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.
6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.
7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de



la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.
9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.
10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

B. PRINCIPIOS BÁSICOS PARA TODA INVESTIGACION MÉDICA

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.
12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.



13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.
14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiados.
15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.
16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las



personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.
19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.
20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.
21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.
22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.
23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de



su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posible conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.
25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.
26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el



- consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.
27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.
28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.
29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.
30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de



la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MÉDICA

- 31.El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.
- 32.Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:
- 33.El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- 34.Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.
- 35.Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones



identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

36. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.