



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Análisis de los niveles de cortisol salival y α -amilasa
en cirugía del tercer molar

Analysis of salivary cortisol and α -amylase levels
in third molar surgery

Análise dos níveis de cortisol salivar e α -amilase
em cirurgia de terceiro molar

*Helena Regina Tornelli¹, Bruno Daniel Nader Marcos¹, Kazue Kanegane¹,
Mauricio José Tornelli¹, Rodney Garcia Rocha¹, Renata Martins Silva Prado¹,
Sibele Sarti Penha¹*

RECIBIDO: 18/12/2018

ACEPTADO: 29/05/2019

PUBLICADO: 31/07/2019

1. Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.

CORRESPONDENCIA

Profa Dra Sibele Sarti Penha
Av Prof Lineu Prestes, 2227- Faculdade de Odontologia
Cidade Universitária - CEP: 05508-000
São Paulo - SP

sibsarti@usp.br



RESUMEN

Los procedimientos dentales implican una alta situación de estrés y ansiedad. **Objetivos:** Verificar una asociación de ansiedad dental medida por la Escala de ansiedad dental modificada (EADM), con variaciones de los niveles de cortisol salival (sC) y de α -amilasa (sAA) en pacientes sometidos a cirugía del tercer molar. **Materiales y métodos:** Treinta y dos pacientes fueron seleccionados en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de São Paulo. EADM se logró en la primera consulta. Se recogieron muestras de saliva durante la entrevista, el día de la cirugía y las visitas de seguimiento postoperatorio a intervalos de una semana a la misma hora. Tres pacientes clasificados como ansiosos y cuatro que informaron un evento traumático previo se reunieron en un grupo. **Resultados:** No hubo diferencia entre este grupo y el grupo no ansioso al comparar el sexo y el dolor. Los niveles de sC (KW, $p = 0,65$) y sAA (KW, $p = 0,69$) en tres días no fueron diferentes en relación con el género. Los niveles de sAA aumentaron en la cirugía de día al comparar pacientes ansiosos / con eventos y no ansiosos, mientras que los niveles de sC fueron más altos durante la entrevista y el seguimiento postoperatorio. **Conclusión:** La ansiedad dental y el evento traumático dental previo mostraron una producción marcada de niveles de sC y sAA en relación con sus contrapartes en esta situación. La relación subjetiva y objetiva de ansiedad dental necesita más investigaciones.

Palabras clave: Ansiedad dental; Cortisol; Psicofisiología; α -amilasa; Saliva.

ABSTRACT

Dental procedures involve high situation of stress and anxiety. **Objectives:** To verify an association of dental anxiety measured by Modified Dental Anxiety Scale (MDAS), with variations of salivary cortisol (sC) and salivary α -amylase (sAA) levels in patients undergoing third molar surgery. **Materials and Methods:** Thirty two patients were selected in Clínica Odontológica of Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. MDAS was accomplished in first query. Saliva samples were collected during interview, on surgery day and postoperative follow-up visits at intervals of one week at the same hour. Three patients classified as anxious, and four who reported prior traumatic event were gathered in a group. **Results:** There was no difference between this group and the non-anxious group when comparing gender and pain. sC levels (KW, $p = 0.65$) and sAA (KW, $p = 0.69$) on three days weren't different in relation to gender. Levels of sAA increased in day surgery when comparing anxious/ event and non-anxious patients, while sC levels were higher during interview and postoperative follow up. **Conclusion:** Dental anxiety and previous dental traumatic event showed marked production of sC and sAA levels in relation to their counterparts in this situation. Subjective and objective dental anxiety relationship needs further investigations.

Keywords: Dental anxiety; Cortisol; Psychophysiology; α -amylase; Saliva.

RESUMO

Procedimentos odontológicos envolvem uma alta situação de estresse e ansiedade. **Objetivos:** Verificar a associação da ansiedade odontológica medida pela Escala Modificada de Ansiedade Dental (EMAD), com variações dos níveis de cortisol salivar (sC) e α -amilase salivar (sAA) em pacientes submetidos à cirurgia de terceiro molar. **Materiais e Métodos:** Trinta e dois pacientes foram selecionados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O EMAD foi realizado na primeira consulta. As amostras de saliva foram coletadas durante a entrevista, no dia da cirurgia e no acompanhamento pós-operatório em intervalos de uma semana na mesma hora. Três pacientes classificados como ansiosos e quatro que relataram evento traumático prévio foram reunidos em um grupo. **Resultados:** Não houve diferença entre esse grupo e o grupo não ansioso ao comparar sexo e dor. Os níveis sC (KW, $p = 0,65$) e sAA (KW, $p = 0,69$) em três dias não diferiram em relação ao sexo. Os níveis de sAA aumentaram em cirurgias diurnas quando comparados pacientes ansiosos / evento e não ansiosos, enquanto os níveis sC foram maiores durante a entrevista e acompanhamento pós-operatório. **Conclusão:** A ansiedade odontológica e o evento traumático dentário prévio mostraram marcada produção de níveis de sC e sAA em relação a suas contrapartes nessa situação. Relação de ansiedade dental subjetiva e objetiva precisa de mais investigações.

Palavras-chave: Ansiedade dentária; Cortisol; Psicofisiologia; α -amilase; Saliva.

INTRODUCCIÓN

Los procedimientos dentales implican una alta prevalencia de estrés y ansiedad. La experiencia de acondicionamiento, el miedo y la expectativa de dolor, las actitudes temerosas aprendidas de los miembros de la familia con ansiedad dental y las fobias sociales contribuyen al inicio y las manifestaciones de la ansiedad dental. Es una emoción compleja con múltiples componentes¹. El estrés es un fenómeno multifacético que requiere un enfoque de medición multidimensional².

La ansiedad dental se puede medir mediante parámetros subjetivos, como escalas de ansiedad y parámetros objetivos como cambios corporales de biomarcadores fisiológicos. En 1969, Corah³ desarrolló una escala formal para la evaluación de este problema, la Escala de ansiedad dental (EAD). En 1995, Humphris, Morrison & Lindsay⁴ introdujeron cambios en la EAD, generando la Escala de ansiedad dental modificada (EADM). En 2003, en Brasil, el EADM fue validado en portugués, mediante un estudio con un grupo de pacientes sometidos a atención dental de emergencia⁵.

Dos sistemas de respuesta al estrés bien reconocidos se activan cuando se identifica un estímulo de estrés. Primero, el sistema de respuesta simpática o autónoma se activa casi de inmediato, aumentando la secreción de epinefrina por la médula suprarrenal y de noradrenalina por las neuronas simpáticas centrales y periféricas. Esta respuesta está relacionada con el inicio de la alarma o la etapa de "lucha-vuelo"⁶. Otro elemento de respuesta fisiológica al estrés emocional en los individuos es la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), que proporciona la secreción de cortisol por la corteza de la glándula suprarrenal⁷. El eje HPA se activa en ocasiones que requieren adaptación homeostática⁸; Desempeña un papel importante en el conflicto de la reacción fisiológica y psicológica al estresante, a través del control de los efectos del estrés en la salud (desarrollo de la enfermedad), el humor y el comportamiento⁶.

Las condiciones relacionadas con la ansiedad son seguidas por cambios autónomos⁹ y la medición de la α -amilasa salival (sAA) puede proporcionar información adicional sobre estos cambios que ocurren en pacientes ansiosos, como un biomarcador de ansiedad². Más recientemente, se sugirió que sAA también puede ser un marcador útil en situaciones de dolor¹⁰. La investigación ha demostrado que los niveles de sAA aumentan bajo diversas condiciones de estímulos físicos, como ejercicios, calor y frío, y estrés psicológico, como los exámenes escritos, en humanos.

El cortisol (producto final del eje HPA) ingresa al sistema circulatorio y se extiende al cuerpo, donde se administrarán los órganos y las células objetivo. La mayor parte del cortisol en la sangre está unida a proteínas (globulina y albúmina que se unen al cortisol). Solo un pequeño porcentaje

INTRODUCTION

Dental procedures involve a high prevalence of stress and anxiety. Conditioning experience, fear and expectation of pain, fearful attitudes learned from dentally anxious family members, and social phobias contribute to the onset and manifestations of dental anxiety. It is a complex emotion with multiple components¹. Stress is a multi-faceted phenomenon that requires a multidimensional measurement approach².

Dental anxiety can be measured by subjective parameters, like anxiety scales and objective parameters as bodily changes of physiologic biomarkers. In 1969, Corah³ developed a formal scale for the assessment of this problem, the Dental Anxiety Scale (DAS). In 1995, Humphris, Morrison & Lindsay⁴ introduced changes to the DAS, generating the Modified Dental Anxiety Scale (MDAS). In 2003, in Brazil, the MDAS was validated in Portuguese, by means of a study with a group of patients undergoing emergency dental care⁵.

Two well-recognized stress response systems are activated when a stress stimulus is identified. First, the sympathetic or autonomic response system is activated almost immediately, increasing the secretion of epinephrine by adrenal medulla and of norepinephrine by central and peripheral sympathetic neurons. This response is connected to the initiation of alarm or "fight-flight" stage⁶. Another element of physiological response to emotional stress in individuals is the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which provides cortisol secretion by the cortex of adrenal gland⁷. The HPA axis is activated on occasions that require homeostatic adaptation⁸; it plays an important role in the conflict of the physiologic and psychological reaction to stressor, through the control of the effects of stress in health (disease development), humor, and behavior⁶.

Conditions related to anxiety are followed by autonomous changes⁹, and the measurement of salivary α -amylase (sAA) can provide additional information about these changes that occur in anxious patients, as an anxiety biomarker². It was suggested, more recently, that sAA may also be a useful marker in pain situations¹⁰. Research has shown that the levels of sAA increase under various conditions of physical stimuli, as exercises, heat and cold, and psychological stress, like written exams, in humans.

Cortisol (final product of the HPA axis) enters into the circulatory system and spreads to the body, where it will be delivered the organs and target cells. The greatest part of the cortisol in blood is protein-bound (cortisol-binding-globulin and albumin). Only a small percentage (5% to 10%) of



(5% a 10%) de cortisol circulante es libre y biológicamente activo¹¹. Este cortisol libre se difunde pasivamente a la saliva casi de inmediato, y las concentraciones de cortisol libre en plasma y en la saliva están altamente correlacionadas⁷.

Las muestras de saliva tienen ventajas sobre otros métodos, ya que se recogen fácilmente de una manera no estresante y no invasiva, lo que facilita el consentimiento para la recolección o incluso la repetición del procedimiento. Por lo tanto, la recolección de muestras salivales da como resultado un menor riesgo de exposición al VIH y la hepatitis para los profesionales de la salud y una menor incomodidad para los pacientes, lo que también simplifica la recolección de muestras en serie para monitorear los estados generales de salud y enfermedades a lo largo del tiempo¹². Además, la medición de cortisol salival (sC) y sAA es confiable y proporciona datos cuantitativos para la fracción biológica activa de sC y sAA. Aunque el eje HPA es sensible al estrés, lo que causa una reducción en la velocidad del flujo salival, esto tiene poco o ningún efecto sobre los niveles de sC⁶.

Otra ventaja es la estabilidad de los esteroides en la muestra de saliva, por lo que la recolección de muestras se puede realizar en un entorno no de laboratorio¹¹. Además, un estudio reciente mostró que el sAA es estable a temperatura ambiente (22°C) e incluso a temperaturas más altas (37°C) durante tres semanas sin una pérdida significativa de actividad¹³. Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras de saliva deben congelarse a -20°C o temperaturas más bajas. Se demostró que ni sAA ni sC se ven afectados por los ciclos de congelación y descongelación¹⁴. Por lo tanto, no hay necesidad de conservantes.

La asociación entre la exposición a una situación dental que provoca estrés y la evaluación de la ansiedad dental tiene aplicaciones prácticas para establecer estrategias para ayudar a los pacientes a hacer frente a estas situaciones. La extracción quirúrgica de las muelas del juicio generalmente no amenaza la vida del paciente y, por lo general, tiene un tiempo de recuperación breve. Sin embargo, los efectos físicos y psicológicos hacen de la cirugía oral una experiencia estresante, lo que crea un gran obstáculo para cualquier atención clínica y dental.

El objetivo de este estudio fue verificar si la presencia de ansiedad dental, medida por el EADM y el estrés provocado por la cirugía del tercer molar inferior en los pacientes pueden causar variaciones en los niveles de sC y sAA. Este artículo agrega una evaluación inicial de una asociación entre una medición subjetiva de la ansiedad dental y los mecanismos fisiológicos de respuesta antes de un procedimiento de cirugía dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación de la Faculdade de Odontologia de la Universidade

circulating cortisol is free and biologically active¹¹. This free cortisol is passively diffused to saliva almost immediately, and the concentrations of free cortisol in plasma and in saliva are highly correlated⁷.

Saliva samples have advantages over other methods as being easily collected in a non-stressful and non-invasive way, which facilitates consent for collection or even repetition of the procedure. Therefore, collection of salivary samples results in lower risk of exposure to VIH and hepatitis for the health care professionals and lower discomfort for patients, which also simplifies the collection of serial samples for monitoring general health and diseases states over time¹². Furthermore, measurement of salivary cortisol (sC) and sAA is reliable and provides quantitative data for biological active fraction of sC and sAA. Although HPA axis is sensitive to stress, which causes a reduction in salivary flow rate, this has little to no effect over sC levels⁶.

Another advantage is the stability of steroids in saliva sample, so the collection of samples can be made in a non-laboratory environment¹¹. Also, a recent study showed that sAA is stable at room temperature (22°C), and even at higher temperatures (37°C) for three weeks without significant loss of activity¹³. For long-term storage, the saliva samples must be frozen at -20°C or lower temperatures. It was demonstrated that neither sAA nor sC is affected by cycles of freezing and thawing¹⁴. Thus, there is no need for preservatives.

The association between exposure to a stress evoking dental situation and the assessment of dental anxiety has practical applications to establish strategies to help patients to cope with these situations. Surgical removal of wisdom teeth generally does not threaten patient's life and usually has a short time recovery. However, physical and psychological effects make oral surgery a stressful experience, which creates a great hurdle to any clinical and dental care.

The objective of this study was to verify if the presence of dental anxiety, measured by the MDAS, and stress provoked by inferior third molar surgery in patients might cause variations in sC and sAA levels. This paper adds an initial evaluation of an association between a subjective measurement of dental anxiety to physiological mechanisms of response before a dental surgery procedure.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the research ethics committee of Faculdade de Odontologia, Universidade de São

de São Paulo (FOUSP), bajo el número FR 33567 Protocolo 88/2010. Todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado. Esta investigación se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Se seleccionó un total de 32 pacientes para este estudio, pero dos no se presentaron a la segunda cita, por lo que la muestra final estaba compuesta por 30 pacientes sanos (Sociedad Americana de Anestesiólogos clase I) para la investigación. Los criterios de inclusión fueron la necesidad de extracción del tercer molar inferior, erupción y sin caries, no fumadores, edad igual o superior a 18 años, sin preferencia de género o clase social. Los criterios de exclusión fueron embarazo, uso de cualquier tipo de fármacos antidepresivos o agentes antiinflamatorios, ya que estas condiciones alteran los niveles de biomarcadores medidos⁷. La radiografía panorámica se realizó antes de la cirugía en todos los voluntarios.

Los pacientes fueron evaluados en el Setor de Urgência Odontológica o en la disciplina de la Clínica Integrada de FOUSP. Se entregaron instrucciones a los pacientes para la toma de muestras de saliva que incluían evitar el alcohol en las 24 horas previas a la recolección, la abstinencia de las comidas principales y evitar alimentos con alta concentración de azúcar o ácidos y bebidas con alta concentración de cafeína. al menos una hora antes de la recolección de muestras.

Los pacientes seleccionados para el procedimiento fueron programados para la entrevista y la primera recolección de saliva a las 09:00 am. en la Clínica de Pesquisa del Departamento de Estomatología de FOUSP. Llenaron el protocolo de investigación, incluido el sexo, la edad, una pregunta sobre experiencias traumáticas previas que causaron miedo al tratamiento dental y la ansiedad dental medida con EADM. Esta escala se compone de cinco preguntas, cada una con cinco opciones de respuesta. A cada respuesta se le asigna un valor, y estos valores se suman en un puntaje final que varía de 5 a 25. Los pacientes con puntajes de 5 a 15 se consideran no ansiosos, y aquellos con puntajes de 16 y más tienen un cierto grado de ansiedad y 19 o superior indica un paciente altamente ansioso dentalmente.

Antes de la recolección de muestras, el paciente se enjuagó la boca con agua para eliminar el desperdicio de alimentos y aumentar la hidratación. La recolección de saliva se realizó 15 minutos después del enjuague. La saliva entera no estimulada se recogió mediante baba pasiva, en un vaso desechable y se transfirió a un kit SalivetteTM (Sarstedt Inc., Numbrecht, Alemania), compuesto por un tubo de centrifugación, un recipiente suspendido, un trozo de algodón y una tapa superior. Para esta investigación, no se usó el trozo de algodón. El tubo fue tapado e identificado. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20 ° C hasta su procesamiento y análisis. Las muestras también se recolectaron el día de la cirugía y el día del seguimiento postoperatorio, a la misma hora. Todas las cirugías se reali-

Paulo (FOUSP), under the number FR 33567 Protocol 88/2010. All participants signed an informed consent form. This research has been conducted in full accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

A total of 32 patients were selected for this study, but two did not show up for the second appointment, so final sample was comprised of 30 healthy patients (American Society of Anesthesiologists class I) for the research. Inclusion criteria were necessity of inferior third molar extraction, erupted and caries free, non-smokers, age equal to or above 18 years, with no gender or social class preference. Exclusion criteria were pregnancy, use of any kind of antidepressant drugs or anti-inflammatory agents, as these conditions alters the levels of measured biomarkers⁷. Panoramic radiograph was performed prior to surgery on all volunteers.

Patients were triaged in Setor de Urgência Odontológica or in the discipline of Clínica Integrada of FOUSP. Instructions were handed to the patients for the sampling of saliva that included the avoidance of alcohol in the 24 hours prior to the collection, abstinence from main meals, and avoidance of food with high concentration of sugar or acids and drinks with high concentration of caffeine at least one hour before the collection of samples.

Patients selected for the procedure were scheduled for interview and first collection of saliva at 09:00 AM at the Clínica de Pesquisa of Departamento de Estomatologia of FOUSP. They filled up the research protocol including gender, age, a question about previous traumatic experience that caused fear of dental treatment and dental anxiety measured using MDAS. This scale is composed of five questions, each with five answer choices. To each answer is given a value, and these values are summed in a final score that ranges from 5 to 25. Patients with scores 5 to 15 are considered non-anxious, and those with scores of 16 and higher have a certain degree of anxiety, and 19 or above indicates a highly dentally anxious patient.

Before the collection of samples, patient rinsed his mouth with water to remove food waste and increase hydration. Saliva collection was made 15 minutes after the rinse. Unstimulated whole saliva was collected by passive drool, in a disposable cup and transferred to a SalivetteTM Kit (Sarstedt Inc., Numbrecht, Germany), composed of a tube to centrifugation, a suspended container, a piece of cotton, and a top cap. For this research, the piece of cotton was not used. The tube was then capped and identified. Samples were stored at a temperature of -20° C until processing and analysis. Samples were collected also on the day of the surgery, and on the day of the postoperative follow-up, at the same hour. All surgeries were performed with local anesthesia, by the same operator. Visual analogue scale (VAS)



zaron con anestesia local, por el mismo operador. La escala analógica visual (VAS) para la evaluación de la intensidad del dolor se aplicó en el día postoperatorio.

La sC se midió por duplicado con el kit de inmunoensayo enzimático de cortisol salival de alta sensibilidad (Salimetrics, LLC, Pennsylvania, EE. UU.). sAA se midió con un kit de α -amilasa salival (Salimetrics, LLC, Pennsylvania, EE. UU.) diseñado y validado para la medición cinética de la actividad sAA. Las pruebas se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en Science Pro Ltda Laboratories.

Análisis estadístico

Los datos categóricos se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2). Los niveles de sAA y sC de los pacientes clasificados como ansiosos o no, en los diferentes días, se analizaron mediante pruebas de Mann-Whitney (MW) y Kruskal-Wallis (KW), ya que la distribución de datos no era normal ni homogénea. La correlación entre la ansiedad dental y la edad, y sAA y sC también se evaluaron mediante la correlación de Spearman. El nivel de significancia estadística fue del 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

La edad media de 16 pacientes mujeres que recibieron tratamiento fue de 28.625 años, con un rango de 19 a 60 años. La edad media de 14 hombres participantes fue de 28.357 años, con un rango de 18 a 45 años. Las puntuaciones de EADM variaron de 5 a 20 y tres pacientes fueron clasificados como ansiosos. Cuatro pacientes relataron una experiencia traumática en el pasado y uno de ellos también fue clasificado como ansioso.

No se analizaron tres muestras de sC de dos pacientes debido a problemas de laboratorio, y luego, para el análisis de sC, se utilizaron muestras de 28 pacientes. La Tabla 1 presenta el nivel medio de sAA y sC medido en los tres días, según el género. El sAA (KW, $p = 0,69$) y el sC (KW, $p = 0,65$) no fueron diferentes en relación con el género en tres días.

for pain intensity evaluation was applied on postoperative day.

sC was measured in duplicate with the High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics, LLC, Pennsylvania, USA). sAA was measured with a Salivary α -amylase kit (Salimetrics, LLC, Pennsylvania, USA) designed and validated for kinetic measurement of sAA activity. Testing was performed in accordance with the instructions of the manufacturer, in Science Pro Ltda Laboratories.

Statistical Analysis

Categorical data were analyzed through chi-square test (X^2). sAA and sC levels of the patients classified as anxious or not, on the different days, were analyzed through Mann-Whitney (MW) and Kruskal-Wallis (KW) tests, as data distribution was neither normal nor homogeneous. Correlation between dental anxiety and age, and sAA and sC were also evaluated through Spearman correlation. Statistical significance level was 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS

The mean age of 16 female patients who received treatment was 28.625 years, ranging from 19 to 60 years. The mean age of 14 male participants was 28.357 years ranging from 18 to 45 years. Scores of MDAS ranged from 5 to 20 and three patients were classified as anxious. Four patients related a traumatic experience in the past and one of them was also classified as anxious.

Three sC samples from two patients were not analyzed due to laboratory issues, and then, for sC analysis, samples from 28 patients were used. Table 1 presents the mean level of sAA and sC measured on the three days, according to gender. The sAA (KW, $p=0.69$) and the sC (KW, $p=0.65$) were not different in relation to gender on three days.

Tabla 1: Media de la concentración de α -amilasa salival y cortisol salival en relación con el género en las tres evaluaciones

Table 1: Mean concentration of salivary α -amylase and salivary cortisol in relation to gender in the three evaluations

	α -amilasa salival (U/ml)			Cortisol salival (μ g/dl)		
	Entrevista	Cirugía	Post	Entrevista	Cirugía	Post
	Interview	Surgery	Post	Interview	Surgery	Post
Femenino						
Female	154.41	174.05	183.16	0.2043	0.1868	0.2075
Masculino						
Male	111.1	150.178	141.007	0.2488	0.1684	0.1555

Los pacientes clasificados como ansiosos y los que informaron un evento traumático previo fueron reunidos (un total de 6 sujetos), para fines de comparación. Los pacientes clasificados como ansiosos presentaron niveles medios de sC de 0.4142 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.3104) en la entrevista, 0.1925 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.1262) en cirugía y 0.300 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.2333) en el post. Los pacientes no ansiosos presentaron un sC medio de 0.1784 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.0970), 0.1791 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.0847) y 0.1607 $\mu\text{g/dl}$ (DE = 0.0672) en primer lugar, en segundo y último día, respectivamente.

La comparación de los niveles de sC entre los dos grupos no mostró diferencias significativas en los tres días, entrevista (MW, $p = 0.09$), cirugía (MW, $p = 0.86$) y seguimiento postoperatorio (MW, $p = 0.09$).

En pacientes ansiosos / con eventos, los niveles medios de sAA fueron 115.6833 U / ml (DE = 124.4465) en la entrevista, 181.7167 U / ml (DE = 134.2235) en cirugía y 193.6667 U / ml (DE = 156.7393) en post. En el grupo no ansioso, los niveles medios fueron 138.8292 U / ml (DE = 107.8196) en la entrevista, 158.2083 U / ml (DE = 127.2390) en cirugía y 155.9458 U / ml (DE = 130.9002) en el post.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de sAA entre pacientes ansiosos / eventos y pacientes no ansiosos. El día de la entrevista, no hubo diferencias significativas entre los niveles de esta enzima (MW $p = 0.64$), como el día de la cirugía (MW $p = 0.68$) y el día postoperatorio (MW $p = 0.47$), como se describe en la Figura 1)

Patients classified as anxious and those who reported a previous traumatic event were gathered (total of 6 subjects), for purposes of comparison. Patients classified as anxious presented mean sC levels of 0.4142 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.3104) in interview, 0.1925 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.1262) in surgery, and 0.300 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.2333) in post. Non-anxious patients presented mean sC of 0.1784 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.0970), 0.1791 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.0847), and 0.1607 $\mu\text{g/dl}$ (SD= 0.0672) in first, in second and in last day, respectively.

Comparison of sC levels between the two groups showed no significant difference in the three days, interview (MW, $p=0.09$), surgery (MW, $p=0.86$), and postoperative follow-up (MW, $p=0.09$).

In anxious/event patients, mean levels of sAA were 115.6833 U/ml (SD= 124.4465) in interview, 181.7167 U/ml (SD= 134.2235) in surgery, and 193.6667 U/ml (SD=156.7393) in post. In non-anxious group, mean levels were 138.8292 U/ml (SD= 107.8196) in interview, 158.2083 U/ml (SD=127.2390) in surgery, and 155.9458 U/ml (SD= 130.9002) in post.

No significant difference was found in levels of sAA between anxious/event patients and non-anxious patients. On the day of the interview, there was no significant difference between levels of this enzyme (MW $p=0.64$), as on day of the surgery (MW $p=0.68$) and postoperative day (MW $p=0.47$), as described in Figure 1.

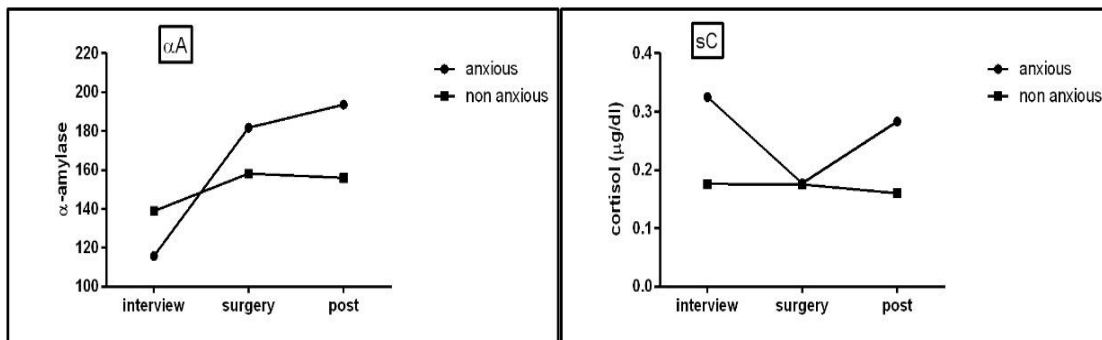


Figura 1: Niveles de amilasa y cortisol salivales en pacientes ansiosos y no ansiosos

Figure 1: Salivary amylase and cortisol levels of anxious and non-anxious patients

En los dos grupos estudiados, la intensidad del dolor postoperatorio fue baja, con una media de 19.1 mm entre los individuos ansiosos / con eventos, y 16.4 mm en el grupo no ansioso. Un paciente solo necesitó medicación analgésica, y uno usó antiinflamatorios y analgésicos tres días después de la cirugía.

Se realizó una correlación entre los puntajes de ansiedad dental y la edad (coeficiente de Spearman = 0.29, $p = 0.11$), presentada en la Figura 2.

In the two studied groups, postoperative pain intensity was low, with mean of 19.1 mm among anxious/event individuals, and 16.4 mm in non-anxious group. One patient needed only analgesic medication, and one used anti-inflammatory and analgesic three days after the surgery.

Correlation was made between dental anxiety scores and the age (Spearman coefficient = 0.29, $p=0.11$), presented in Figure 2.

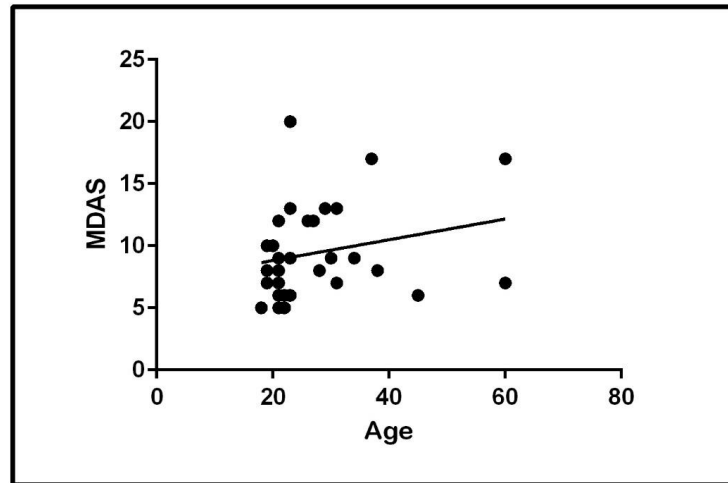


Figura 2: Correlación de Spearman de EADM en comparación con la edad

Figure 2: Spearman Correlation of MDAS compared with age

Correlación entre los niveles de sC y sAA, en los tres días evaluados, con el grupo no ansioso a la izquierda y el grupo ansioso / evento a la derecha es presentado en la figura 3.

Correlation between levels of sC and sAA, in the three evaluated days, with non-anxious group at the left and anxious/ event group at the right is presented in Figure 3.

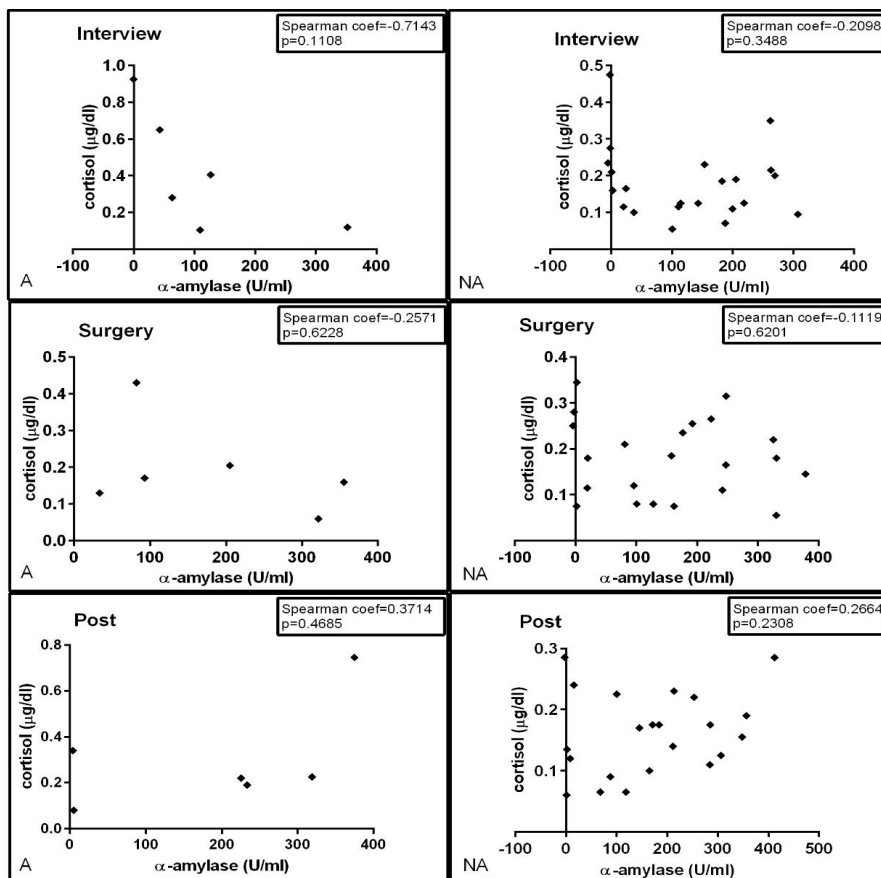


Figura 3: Correlación entre niveles de sC y sAA en los 3 días evaluados

Figure 3: Correlation between levels of sC and sAA in the 3 days evaluated

DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como objetivo encontrar una relación entre las reacciones fisiológicas y un procedimiento dental invasivo, uno de los que causan más ansiedad en los pacientes¹⁵, y contribuir a una mejor comprensión de la interrelación entre la variación de las concentraciones de sAA y sC y la evaluación subjetiva de ansiedad dental medida mediante EADM.

La extracción del tercer molar es el procedimiento más frecuente en cirugía oral¹⁶, y generalmente es un procedimiento electivo que requiere al menos tres citas. En la literatura, hay estudios que muestran que los pacientes con ansiedad dental evitan ir al dentista y presentan un mayor número de dientes perdidos y menos dientes restaurados¹⁷. La ansiedad dental se ha relacionado con la ocurrencia de una experiencia traumática previa^{1,5,18,19}. Por lo tanto, fue difícil llevar a estos pacientes a participar en este estudio que incluye más que una consulta y también un procedimiento invasivo. El número de pacientes que declararon tener ansiedad dental en este estudio y que declararon haber vivido un evento anterior fue muy pequeño, por lo que se reunieron en un grupo. Un paciente refirió una experiencia previa y también presentó ansiedad dental, por lo que el número total de pacientes en este grupo fue de seis.

Los signos neuroendocrinos juegan un papel importante en el establecimiento de reacciones corporales al estrés y pueden estudiarse mediante la medición de la activación del eje HPA y el sistema nervioso simpático (SNS) mediante cambios en la concentración de biomarcadores que también se encuentran en la saliva. El diagnóstico salival está evolucionando hacia un campo científico sofisticado, una herramienta útil para el diagnóstico de enfermedades y su seguimiento clínico, por lo tanto, para la toma de decisiones clínicas en el tratamiento del paciente.

La ansiedad es una emoción relacionada con la anticipación de un evento²⁰ y la expectativa de tratamiento¹⁵. En el momento de la entrevista, se instruyó a los pacientes sobre la investigación y su dinámica. Los niveles de sC fueron más altos en este día que en los otros dos días de recolección de saliva, lo que sugiere que sC puede estar relacionado con la anticipación del evento. En los otros días de recolección de saliva, como los pacientes ya estaban al tanto de la investigación, no se esperaba lo que sucedería. sAA mostró un patrón diferente, niveles más bajos el primer día y más altos en los otros dos, lo que indica la respuesta de SNS a un evento inductor de estrés, no ansiedad. De manera diferente, Robles et al.²¹ encontraron que los niveles de sAA disminuyeron durante la visita de cirugía y sugirieron que la respuesta autónoma a la cirugía pendiente podría haber alcanzado su punto máximo durante o antes de que los participantes llegaran a la clínica.

El primer sistema que responde al estrés es el SNS, que está involucrado en la liberación de sAA directamente en la cavidad oral¹⁴. En contraste, el eje HPA tiene una activa-

DISCUSSION

This research aimed to find a relationship between physiological reactions and an invasive dental procedure, one of those that cause most anxiety in patients¹⁵, and to contribute to a better understanding of the interrelation between the variation of concentrations of sAA and sC and the subjective evaluation of dental anxiety measured by means of MDAS.

Third molar extraction is the most frequent procedure in oral surgery¹⁶, and is usually an elective procedure which requires at least three appointments. In the literature, there are studies showing that dentally anxious patients avoid going to the dentist, and present a higher number of lost teeth and fewer restored teeth¹⁷. Dental anxiety has been related to the occurrence of a previous traumatic experience^{1,5,18,19}. Therefore, it was difficult to bring these patients to participate in this study that include more than a consultation and also an invasive procedure. The number of patients who declared to be dentally anxious in this study and who stated to have lived a previous event was very small, so they were gathered in a group. One patient referred a previous experience and also presented dental anxiety, so the total number of patients in this group was six.

Neuroendocrine signs play an important role in establishing body reactions to stress and they can be studied by means of measurement of activation of HPA axis and sympathetic nervous system (SNS) by changes in concentration of biomarkers also found in saliva. Salivary diagnosis is evolving into a sophisticated scientific field, useful tool for the diagnosis of disease and its clinical follow-up, and so for clinical decision-making in patient treatment.

Anxiety is an emotion related to the anticipation of an event²⁰ and the expectation of treatment¹⁵. At the moment of interview, patients were instructed about the research and its dynamics. Levels of sC were higher on this day than on the other two days of saliva collection, which suggests that sC may be related to the anticipation of the event. On the other days of saliva collection, as the patients were already aware of the research there were no expectation of what would happen. sAA showed a different pattern, lower levels on first day and higher on other two, indicating the response of SNS to a stress inducing event, not anxiety. Differently, Robles et al.²¹ found that sAA levels decreased during the surgery visit and suggested that autonomic response to the pending surgery might have peaked during or before participants arrived to the clinic.

The first system that responds to stress is the SNS, which is involved in liberation of sAA directly in oral cavity¹⁴. In contrast, the HPA axis has slower activation⁷; and it is



ción más lenta⁷; y está relacionado con la regulación homeostática del estrés¹⁷ como preparación para la confrontación fisiológica y psicológica⁶. Por lo tanto, sC se elevó en el momento en que el paciente imaginaba lo que iba a suceder, y sAA, en los momentos antes de que el paciente se sometiera a alguna intervención.

Cuando los niveles de sC se separaron en dos grupos, ansiosos / evento y no ansiosos, fueron más altos en la entrevista, disminuyeron en la cirugía y aumentaron en el día postoperatorio entre el primer grupo. Esto puede deberse a la activación del eje HPA al principio y al final de su participación en la investigación. La variación de sC fue mayor entre el grupo ansioso / evento en contraste con el grupo no ansioso, que mostró medias similares en tres días.

sAA ha sido descrito como un marcador biológico, que puede usarse para evaluar la respuesta al estímulo estresante^{22,23,24} y su aumento se ha asociado con el estrés físico, como el estímulo eléctrico, especialmente en pacientes con trastorno depresivo mayor²⁵. Los pacientes ansiosos / de eventos también mostraron más variación en los niveles de sAA, más bajos en la entrevista, aumentando en la cirugía y en el día postoperatorio, que los pacientes no ansiosos. La variación de sAA en el grupo de pacientes no ansiosos también fue menor que el otro grupo.

En esta muestra, los puntajes de ansiedad dental mostraron una tendencia a relacionarse positivamente con la edad, aunque la literatura informa que las personas mayores están menos ansiosas y que la experiencia puede reducir la ansiedad dental⁴. Los pacientes que participaron en esta investigación eran jóvenes en su mayoría y esto puede sobrestimar sus resultados. Probablemente tenían acceso a agua fluorada y a acciones de prevención de caries. Habiendo tenido poca o ninguna experiencia con la caries, tuvieron menos oportunidades de someterse a una intervención dental invasiva y traumática. Los pacientes ansiosos en esta investigación eran mayores, con más posibilidades de tener experiencias negativas relacionadas con el tratamiento dental.

Para la correlación entre sC y sAA en los tres días, fue positiva en la entrevista y en el día postoperatorio y negativa en la cirugía, para ambos grupos, pero los valores de los coeficientes fueron más altos para el grupo de ansiedad / evento. En la entrevista y el día postoperatorio, se activaron ambos sistemas de respuesta, el SNS y el eje HPA, y en el día de la cirugía, el SNS todavía se activó mientras que el eje HPA mostró una activación reducida. Los diferentes patrones de relación entre el eje HPA y el SNS en diferentes situaciones abordan investigaciones adicionales²⁵.

Dado que el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable con daño tisular real o potencial, esta definición amplia permite considerarlo como algo más que una sensación. Incluye respuestas cognitivas, emocionales y de comportamiento, que también están influenciadas por factores psicológicos y sociales. Cada individuo aprende

related to homeostatic regulation to stress¹⁷ as preparation for physiological and psychological confrontation⁶. Therefore, sC was elevated at the moment the patient was imagining what was going to happen, and sAA, at the moments before the patient underwent some intervention.

When levels of sC were separated into two groups, anxious/ event and non-anxious, they were higher at interview, decreased at surgery, and increased in postoperative day among first group. This may be due to the activation of the HPA axis at the beginning and ending of their participation in the research. Variation of sC was higher between the anxious/event group in contrast to the non-anxious group, that showed similar means on three days.

sAA has been described as a biologic marker, that can be used to evaluate the response to stressful stimulus^{22,23,24} and its increase has been associated with physical stress, such as electric stimulus, especially in patients with major depressive disorder²⁵. Anxious/event patients also showed more variation in sAA levels, lower at interview, increasing at surgery and at postoperative day, than non-anxious patients. The variation of sAA in the group of non-anxious patients was also smaller than the other group.

In this sample, dental anxiety scores showed a tendency to be positively related with age, although literature reports that older people are less anxious, and that experience can reduce dental anxiety⁴. Patients who participated in this research were young in the majority and this may overestimate their results. They probably had access to fluoridated water and to caries prevention actions. Having had little or no experience with caries, they had fewer chances to go through invasive and traumatic dental intervention. Anxious patients in this research were older, with more chances of having negative experiences related to dental treatment.

For correlation between sC and sAA on the three days, it was positive at interview and at postoperative day and negative at surgery, for both groups, but the values of the coefficients were higher for the anxious/event group. At interview and postoperative day, both of response systems, SNS and HPA axis, were activated, and at the surgery day, SNS was still activated while HPA axis showed a reduced activation. The different patterns of relationship between the HPA axis and the SNS in different situations address further investigation²⁵.

Since pain is defined as an unpleasant sensory and emotional experience with actual or potential tissue damage, this broad definition allows to consider it as more than a sensation. It includes cognitive, emotional and behavioral responses, which are also influenced by psychological and social factors. Each individual learns the



la aplicación de la palabra a través de experiencias relacionadas con lesiones en la vida temprana²⁶. Estas influencias, la expectativa de dolor y la ansiedad dental pueden hacer que los pacientes reporten una intensidad de dolor más alta que la experiencia real²⁷. En los dos grupos estudiados, la intensidad del dolor fue baja, lo que puede atribuirse a las características de los dientes elegidos que facilitarían la cirugía; y a la confianza en el profesional que realizó la cirugía.

Algunos puntos dificultaron la interpretación de los resultados. En este estudio, la cirugía del tercer molar ocurrió en la segunda visita del paciente después de su selección. Como la propuesta se aclaró en un triaje y se le pidió al paciente que regresara tres veces, los pacientes ansiosos no pudieron regresar, lo que contribuyó a un pequeño número de estos participantes. Además, las comparaciones con respecto a la edad fueron difíciles ya que la mayoría de la muestra era joven. El aumento del número de participantes ansiosos dentales y la investigación en diferentes entornos dentales pueden proporcionar más información para aclarar los mecanismos de respuesta del eje HPA y SNS en estos pacientes.

La evaluación subjetiva utilizada, con la aplicación del EADM y la pregunta sobre un evento dental traumático, podría detectar individuos con liberación diferenciada de sC y sAA cuando se exponen a una situación dental, en esta investigación.


CONCLUSIÓN

Este estudio mostró un patrón diferente en las respuestas psicológicas y fisiológicas en pacientes ansiosos / con eventos durante los tres días. sC parecía ser más sensible para predecir la ansiedad dental y sAA para el estrés dental. La evaluación de los cambios fisiológicos sugiere que pueden usarse para guiar si las medidas para reducir la ansiedad y el estrés dental, que deberían formar parte de un protocolo quirúrgico para todos los pacientes, son efectivas, en particular los ansiosos dentales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyado por Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), una fundación del Ministério da Educação de Brasil.

ORCID

Helena Tornelli:  <https://orcid.org/0000-0002-2963-1848>
Sibele Penha:  <https://orcid.org/0000-0003-0157-9563>

application of the word through experiences related to injury in early life²⁶. These influences, pain expectation and dental anxiety can make patients report higher pain intensity than the real experience²⁷. In the two studied groups, pain intensity was low, which can be attributed to the characteristics of teeth chosen that would facilitate the surgery; and to the confidence in the professional who performed the surgery.

Some points hindered the results interpretation. In this study, third molar surgery occurred on the second visit of the patient after his selection. As proposal was elucidated in a triage, and the patient was asked to return three times, anxious patients could not return, which contributed to small number of these participants. Also, comparisons regarding to age were difficult as the majority of the sample was young. Increasing the number of dental anxious participants and research in different dental environment may provide more information to make clear the response mechanisms of HPA axis and SNS in these patients.

The subjective evaluation used, with application of the MDAS and question about traumatic dental event, could detect individuals with differentiated release of sC and sAA when exposed to dental situation, in this research.

CONCLUSION

This study showed different pattern in psychological and physiological responses in anxious/ event patients during the three days. sC seemed to be more sensitive for predicting dental anxiety and sAA for dental stress. Assessment of physiologic changes suggests that they can be used to guide if measures to reduce dental anxiety and stress, that should be part of a surgical protocol to all patients, are being effective, in particular dentally anxious ones.

ACKNOWLEDGMENTS

This research study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a foundation of Ministério da Educação of Brazil.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Locker D, Liddell A, Shapiro D. Diagnostic categories of dental anxiety: a population-based study. *Behav Res Ther.* 1999 37: 25-37.
2. Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 34: 486-96.
3. Corah NL. Development of a Dental Anxiety Scale. *J Dent Res* 1969 48: 596.



4. Humphris GM, Morrison T, Lindsay SJE. The modified dental anxiety scale: validation and United Kingdom norms. *Community Dent Health*. 1995 12: 143-50.
5. Kanegane K, Penha SS, Borsatti MA, Rocha RG. Ansiedade ao tratamento odontológico em atendimento de urgência. *Rev Saúde Pública*. 2003 37: 786-92.
6. King SL, Hegadoren KM. Stress hormones: how do they measure up? *Biol Res Nurs*. 2002 4: 92-103.
7. Bakke M, Tuxen A, Thomsen CE, et al. Salivary cortisol level, salivary flow rate and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology*. 2004 50: 383-92.
8. Aires M M. *Fisiologia* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
9. Lang PJ, Davis M, Ohman A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J Affect Disord*. 2000 61: 137-59.
10. Shirasaki S, Fujii H, Takahashi M et al. Correlation between salivary alpha-amylase activity and pain scale in patients with chronic pain. *Reg Anesth Pain Med*. 2007 32: 120-3.
11. Castro M, Moreira AC. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2003 47: 358-67.
12. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc*. 2002 68: 170-4.
13. DeCaro JA. Methodological considerations in the use of salivary alpha-amylase as a stress marker in field research. *Am J Hum Bio*. 2008 20: 617-9.
14. Granger DA, Blair C, Kivlighan KT et al. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Dev Psychobiol*. 2007 1098: 122-44.
15. Wong M, Lytle WR. A comparison of anxiety levels associated with root canal therapy and oral surgery treatment. *J Endod*. 1991 17: 461-5.
16. Fuster-Torres MA, Gargallo-Albiol J, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Evaluation of the indication for surgical extraction of third molars according to the oral surgeon and the primary care dentist. Experience in the Master of Oral Surgery and Implantology at Barcelona University Dental School. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 13: 499-504.
17. Cohen SM, Fiske J, Newton JT. The impact of dental anxiety on daily living. *Br Dent J*. 1996 189: 385-90.
18. Thomson WM, Locker D, Poulton R. Incidence of dental anxiety in young adults in relation to dental treatment experience. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 28: 289-94.
19. Eli I, Uziel N, Blumensohn R, Baht R. Modulation of dental anxiety – the role of past experiences, psychopathologic traits and individual attachment patterns. *Br Dent J*. 2004; 196: 689-94.
20. Lazarus R S. *Stress and Emotion: a new synthesis*. London: Free Association Books, 1999.
21. Robles TF, Sharma R, Park K et al. Utility of a salivary biosensor for objective assessment of surgery-related stress. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 70: 2256-2263.
22. Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC et al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*. 1996 16: 433-48.
23. Schoofs D, Hartmann R, Wolf OT. Neuroendocrine stress responses to an oral academic examination: No strong influence of sex, repeated participation and personality traits. *Stress*. 2008 11: 52-61.
24. Cozma S, Dima-Cosma LC, Ghiciuc CM, Pasquali V, Saponaro A, Patacchioli FR. Salivary cortisol and alpha-amylase: subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. *Braz J Med Biol Res*. 2017 50(2): e5577
25. Tanaka Y, Ishitobi Y, Maruyama Y, et al. Salivary alpha-amylase and cortisol responsiveness following electrical stimulation stress in major depressive disorder patients. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012 36: 220-4.
26. International Association for the Study of Pain. Introdução. Retrieved March 01, 2017, from: http://www.sbbed.org.br/materias.php?cd_secao=76
27. Rhudy JL, Meagher MW. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain*. 2000 84: 65-75.

CITE ESTE ARTÍCULO COMO / CITE THIS ARTICLE AS

Tornelli HR, Marcos BDN, Kanegane K, Tornelli MJ, Rocha RG, Prado RMS, Penha SS. Análisis de los niveles de cortisol salivar y α -amilasa en cirugía del tercer molar. *Odontología*. 2019; 21(1): 44-55. <http://dx.doi.org/10.29166/odontologia.vol21.n1.2019-44-55>