

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ESTOMATOLOGIA CLÍNICA**

JULIANA ANDRADE CARDOSO

**ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-AMILASE SALIVAR E VARIÁVEIS
PSICOLÓGICAS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE**

**Porto Alegre
2013**

JULIANA ANDRADE CARDOSO

**ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-AMILASE SALIVAR E VARIÁVEIS
PSICOLÓGICAS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Estomatologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum

Porto Alegre

2013

C268a Cardoso, Juliana Andrade

Atividade da enzima alfa-amilase salivar e variáveis psicológicas em pacientes com ulceração aftosa recorrente / Juliana Andrade Cardoso. – Porto Alegre, 2013. 104f.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Estomatologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum

1. Estomatologia. 2. Afta. 3. Alfa-Amilase. 4. Estresse Psicológico. 5. Ansiedade. 6. Estresse Fisiológico. 7. Qualidade de Vida. I. Salum, Fernanda Gonçalves. II. Título.

CDD 617.607

Bibliotecária Responsável:
Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

JULIANA ANDRADE CARDOSO

**ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-AMILASE SALIVAR E VARIÁVEIS
PSICOLÓGICAS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Estomatologia Clínica.

Aprovada em: 26 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Maria Martha Campos

Maria Cristina Munerato

Silvia Ataíde Pithan (suplente)

Fernanda Gonçalves Salum (orientadora)

Porto Alegre

2013

Dedico esta dissertação aos meus pais, João Bosco e Luciana,
por todo amor, dedicação, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me permitido realizar mais um sonho. Meu querido pai, **João Bosco**, pelo apoio e incentivo. Minha mãe, **Luciana**, exemplo de mulher, guerreira e profissional. Minha fonte de inspiração.

Aos meus irmãos **André Luiz** e **Ana Julia**, eternos companheiros. Amo vocês.

À Profa. Dra. **Fernanda Gonçalves Salum**, pela belíssima orientação e tutoria, por acreditar em mim, pela sua total disponibilidade e pelo modelo de professora e pesquisadora que representa. Obrigada.

Às queridas professoras de Estomatologia Clínica Dra **Fernanda Gonçalves Salum**, Dra **Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo** e Dra **Karen Cherubini**, por terem me acolhido, pelos grandes ensinamentos profissionais e pessoais que levarei para sempre comigo, pelo exemplo de dedicação e amor à Estomatologia.

Ao Magnífico Reitor da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Prof. Dr. **Joaquim Clotet**.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, nas pessoas dos Professores **Alexandre Bahlis** (Diretor) e **Angélica Maria Genehr Fritscher** (Vice-Diretora).

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa da Profa. Dra. **Ana Maria Spohr** (Coordenadora).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

Ao INTOX, na pessoa da Profa. Dra. **Maria Martha Campos**, pelo suporte desde o acondicionamento do material até a execução do experimento.

Ao doutorando **André Avelino Santos Junior**, pelo suporte na execução da parte experimental deste estudo.

Aos professores Dr. **Hélio Bittencourt** e Dr. **Sérgio Kato**, pelo auxílio na realização da análise estatística do estudo.

Aos colegas do Curso, em especial, **Victoria Trucci, Clarissa Medeiros, Mariana Abreu, Lisiane Cândido, Juliana Spanemberg, Ruchielli Borgetti, Felipe Martins, Jamil Saleh, Renata Boff**, pela companhia, pelas risadas e pelos bons momentos que compartilhamos. Obrigada por tentarem amenizar a distância e a dor da saudade dos meus familiares e amigos.

Aos **pacientes**, que confiaram no meu trabalho e colaboraram para o meu aprendizado.

À secretária do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, **Cristiane Freitas**. Obrigada pelo carinho, pela sua disponibilidade me ajudando sempre, pelo sorriso com que me recebeu a cada dia no Serviço.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação: **Paulo, Davenir, Kleber e Ana**. Obrigada pela atenção e por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

Ao Prof. Dr. **Jener Gonçalves de Farias**, coordenador do núcleo de Propedêutica da Faculdade de Odontologia da União Metropolitana de Educação e Cultura, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos de convivência desde a graduação, pelo conhecimento passado, pelo incentivo e principalmente pela amizade. Sem você eu não teria chegado aqui.

À **Carla Martins Ferreira**, minha grande amiga, pelo apoio, incentivo e cumplicidade.

Aos queridos amigos professores da UNIME, responsáveis pela minha formação básica, em especial **Eugênio Leite, Livia Prates, Weber Cavalcante, Viviane Sarmiento, Luis Rasquin, Patrícia Mascarenhas, Marcelo Rios, Adriano**

Monteiro, Carolina Miranda, Márcia Noya, Erasmo, Viviane Maia, João Macêdo, Ana Carla Rios, Patrícia Sakima, Alexandre Sakima, Alexandre Protásio. Se hoje consegui chegar até aqui foi por que um dia vocês me prepararam e me permitiram. Essa vitória também é de vocês!

Aos amigos da minha amada São Salvador, que apesar da distância, sempre estiveram me apoiando. Em especial, **Franciane Menezes, Virgínia Uzêda, Viviane Palmeira, Janir Queiroga, Vitor Brandão, Larissa Brandão, João Neto, Laura Toledo, Bruno Ribeiro, Simone Mustafa, Raquel Gapiúna, Marina Esteves.**

À minhas avós **Conchita** e **Caçula** por todo o carinho. Ao meu avô, **Felizberto**, que não cheguei a conhecer, ao meu avô **Luiz** e minhas tias avós **Yvonne** e **Ivanise**, mesmo ausentes fisicamente, tenho a certeza de que vocês guiaram todos os meus passos e devo também a vocês mais esta conquista.

Ao **Jorge Filho**, pela amizade, atenção e paciência. Por ter conseguido me fazer enxergar o melhor lado das coisas sempre.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu muito obrigado.

À **Deus.**

"Obstáculo é aquilo que você enxerga quando tira os olhos do seu objetivo."

Henry Ford

RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar a atividade da enzima alfa-amilase salivar (AAS), os níveis de estresse e de ansiedade de pacientes com ulceração aftosa recorrente (UAR), bem como o impacto que esta doença exerce na qualidade de vida dos indivíduos. A amostra foi constituída por 52 pacientes adultos, distribuídos em grupo UAR (n=22) e grupo-controle (n=30), emparelhados por gênero e idade. Para a investigação dos sintomas de estresse foi utilizado o Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp e para a ansiedade, o Inventário de Ansiedade de Beck. Os questionários *World Health Organization Quality of Life-bref* (WHOQOL-abreviado) e *Oral Health Impact Profile-14* (OHIP-14) foram utilizados para avaliação da qualidade de vida geral e relacionada à saúde bucal, respectivamente. As amostras de saliva foram coletadas pela manhã e à tarde, e a atividade da enzima alfa-amilase salivar foi analisada por método cinético enzimático com o *Salivary α -Amylase Assay Kit*. Não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à atividade da AAS ($p=0.306$) nas amostras da manhã ou da tarde. Os pacientes do grupo UAR apresentaram escores superiores de ansiedade ($p=0.016$) e, embora a prevalência de estresse tenha sido superior neste grupo, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo-controle ($p=0.498$). Os escores dos domínios físico ($p=0.026$), psicológico ($p=0.005$), social ($p=0.001$) e meio ambiente ($p=0.040$) do inventário WHOQOL-abreviado foram significativamente inferiores nos pacientes com UAR. Os valores obtidos por meio do OHIP-14 foram significativamente superiores nestes pacientes ($p=0.002$). Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a UAR afeta negativamente a qualidade de vida dos indivíduos. Pacientes com a doença apresentam maiores

níveis de ansiedade, evidenciando sua possível associação à etiopatogenia da doença. Por outro lado, apesar de a AAS ser um marcador biológico de estresse, sua liberação oscila rapidamente e pode ser influenciada por diversos fatores, não tendo sido eficaz para avaliação de alterações psicológicas em pacientes com UAR neste estudo.

Descritores: afta; alfa-amilase; saliva; ansiedade; estresse psicológico; estresse fisiológico; qualidade de vida.

ABSTRACT

This study aimed at analyzing the activity of the salivary alpha-amylase enzyme (SAA), levels of stress and anxiety of patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS), as well as the impact of this disease on the life quality. The sample consisted of 52 adult patients, distributed in RAS group (n=22) and control group (n=30), matched for sex and age. For the investigation of stress symptoms the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults and for anxiety, the Beck Anxiety Inventory were used. The World Health Organization Quality of Life-bref (WHOQOL-BREF) and the Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14) tests were used to evaluate the overall life quality and the life quality related to oral health respectively. Saliva samples were collected in the morning and afternoon and the activity of the salivary alpha-amylase enzyme was analyzed by enzymatic kinetic method with the Salivary α -Amylase Assay Kit. No significant difference was observed between groups regarding the SAA activity ($P=0.306$) in the morning or afternoon samples. Patients in the RAS group had higher scores of anxiety ($P=0.016$) and, although the prevalence of stress has been higher in this group, there was no significant difference compared to the control group ($P=0.498$). The scores of physical ($P=0.026$), psychological ($P=0.005$), social ($P=0.001$) and environmental ($P=0.040$) domains of the WHOQOL-BREF inventory were significantly lower in patients with RAS. The values obtained through OHIP-14 were significantly higher in these patients ($P=0.002$). We can conclude that RAS negatively affects the life quality of individuals. Patients with the disease have higher levels of anxiety, suggesting its possible association with the etiopathogenesis of RAS. Moreover, despite being a biomarker of stress, the release of SAA oscillates

rapidly and may be influenced by several factors, not being efficient for the evaluation of psychological changes in patients with RAU in this study.

Keywords: aphthous stomatitis; alpha-amylase; saliva; anxiety; psychological stress; physiological stress; quality of life.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO

Table 1	Studies on the influence of stress on salivary alpha-amylase (SAA) levels in adults.....	35
Table 2	Studies on the influence of stress on salivary alpha-amylase (SAA) levels in babies, children and adolescents...	37

ARTIGO DE PESQUISA

Table 1	Activity of the salivary alpha-amylase enzyme (U/ml) in the RAS and control groups.....	56
Table 2	Scores of the Beck Anxiety Inventory (BAI) and the Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14) in the RAS and control groups.....	57
Table 3	Anxiety levels obtained through the Beck Anxiety Inventory (BAI) in the RAS and control groups.....	57
Table 4	Prevalence of stress obtained through the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (LISS) in the RAS and control groups.....	57
Table 5	Scores of physical, psychological, social and environmental domains of the World Health Organization Quality of Life-bref (WHOQOL-BREF) inventory in the RAS and control groups.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	Alfa-amilase Salivar
ACTH	<i>Adrenocorticotrophic hormone</i>
ANS	<i>Autonomic nervous system</i>
BMS	<i>Burning mouth syndrome</i>
BP	<i>Blood pressure</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CgA	<i>Chromogranin A</i>
cm	Centímetros
Da	Dalton
DHEA	Desidroepiandrosterona
FPAFA	Síndrome da febre periódica, afta, faringite e adenite
h	Hora
HPA-axis	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
HR	<i>Heart rate</i>
HSV	<i>Herpes Simples Virus</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IL-2	Interleucina-2
ISSL	Inventário de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp
LISS	<i>Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
n	Frequência
nm	Nanômetro
OHIP-14	<i>Oral Health Impact Profile – 14</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RAS	<i>Recurrent aphthous stomatitis</i>
SAA	<i>Salivary alpha-amylase</i>
SAB	Síndrome da ardência bucal
SANS	<i>Sympathetic autonomic nervous system</i>
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático

SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Th1	Linfócitos T-helper 1
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UAR	Ulceração aftosa recorrente
UK	<i>Uchida-Kraepelin</i>
U/ml	Unidades por microlitro
WHOQOL-abreviado	<i>World Health Organization Quality of Life – abreviado</i>
WHOQOL-BREF	<i>World Health Organization Quality of Life – bref</i>
μm	Micrômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	PROPOSIÇÃO.....	24
3	ARTIGO DE REVISÃO.....	26
	ABSTRACT.....	29
	INTRODUCTION.....	30
	PURPOSE.....	31
	METHODS.....	32
	RESULTS.....	32
	DISCUSSION.....	39
	CONCLUSION.....	40
	REFERENCES.....	41
4	ARTIGO DE PESQUISA.....	47
	ABSTRACT.....	50
	INTRODUCTION.....	51
	MATERIALS AND METHODS.....	52
	RESULTS.....	55
	DISCUSSION.....	58
	REFERENCES.....	61
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXO A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos Voluntários da Pesquisa.....	82
	ANEXO B Inventário de Ansiedade de Beck (BAI).....	84
	ANEXO C Inventário de Sintomas de <i>Stress</i> para Adultos de Lipp (ISSL).....	85
	ANEXO D Inventário de Qualidade de Vida WHOQOL-abreviado..	89
	ANEXO E Inventário de Qualidade de Vida OHIP-14.....	94
	ANEXO F SALIMETRICS™ - Salivary α -amylase Assay Kit.....	95
	ANEXO G Aprovação do Projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	98
	ANEXO H Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em	

	Pesquisa da PUCRS.....	99
APÊNDICE A	Ficha de Coleta de Dados.....	101
APÊNDICE B	Carta de Submissão do Artigo de Revisão.....	103
APÊNDICE C	Carta de Submissão do Artigo de Pesquisa.....	104



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ulceração aftosa recorrente (UAR), também conhecida como estomatite aftosa recorrente ou afta, é uma das enfermidades mais frequentes da mucosa bucal, com prevalência que varia de 2% a 66% na população em geral (WARDHANA; DATAU, 2010). A doença tem predileção por pacientes do gênero feminino entre a segunda e a terceira décadas de vida, embora possa afetar indivíduos de todas as faixas etárias (FRAIHA; BITTENCOURT; CELESTINO, 2002).

As lesões podem ser únicas ou múltiplas, exibem formato arredondado ou ovalado, fundo ulcerado e halo eritematoso. Acometem preferencialmente a mucosa não ceratinizada e três variações clínicas são descritas: ulcerações aftosas menores, maiores e herpetiformes (CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011). As aftas menores são as mais prevalentes, representando aproximadamente 80% das lesões (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; PEREIRA et al., 2006). Possuem menos de 1,0 cm de diâmetro, são recobertas por membrana de fibrina e contornadas por halo eritematoso. Costumam permanecer de 10 a 14 dias e envolvem sem deixar cicatrizes (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011). As ulcerações aftosas maiores medem mais de 1,0 cm de diâmetro e apresentam duração de semanas a meses, podendo deixar cicatrizes. As lesões aftosas herpetiformes são menos comuns, caracterizam-se por múltiplas úlceras com aspecto que se assemelha às provocadas pelo vírus do herpes simples (HSV). Medem de 1,0 a 3,0 mm, não são precedidas por vesículas como nas infecções pelo HSV e, geralmente, cicatrizam em 7 a 10 dias (PEREIRA et al., 2006). As lesões aftosas são bastante dolorosas, dificultam a alimentação, fonação e higiene bucal,

portanto, podem causar impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (KRISDAPONG; SHEIHAM; TSAKOS, 2012).

O diagnóstico da UAR é baseado nos dados da anamnese e nos achados clínicos. O diagnóstico diferencial deve ser estabelecido com doenças bucais de manifestação ulcerativa como a infecção primária ou recorrente pelo HSV. Nas infecções herpéticas, a localização é um fator importante no diagnóstico diferencial, uma vez que as lesões virais ocorrem em mucosa ceratinizada, enquanto a afta desenvolve-se, preferencialmente, em mucosa não ceratinizada e não é precedida por vesículas (PEREIRA et al., 2006). Condições locais ou sistêmicas como úlceras traumáticas, síndrome de Behçet, síndrome FPAFA (síndrome da febre periódica, afta, faringite e adenite), neutropenia cíclica, entre outras devem ser consideradas na distinção clínica (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; PINTO FILHO et al., 2007). Nas lesões traumáticas, normalmente, os pacientes lembram-se do episódio de trauma como escovações abruptas e mordeduras (FRAIHA; BITTENCOURT; CELESTINO, 2002).

A etiologia, bem como possíveis agentes desencadeantes da UAR têm sido investigados em diversos estudos, no entanto, o mecanismo que promove o desenvolvimento das lesões permanece desconhecido. Fatores locais como trauma em indivíduos geneticamente propensos, fatores imunológicos, deficiências nutricionais (OGURA et al., 2001; BORRA et al., 2004; VOLKOV et al., 2005; GIACOMINI et al., 2010; WARDHANA; DATAU, 2010; LALLA et al., 2012), hipersensibilidade causada por alimentos (CALDERÓN et al., 2008), estresse e ansiedade (SOTO-ARAYA; ROJAS ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008; GALLO; MIMURA; SUGAYA, 2009; PREETI et al., 2011) são propostos como agentes etiológicos da doença.

O desenvolvimento das lesões está associado à citotoxicidade direta mediada por linfócitos T (VOLKOV et al., 2005), com desregulação nos mecanismos de resposta da mucosa bucal frente a antígenos exógenos ou endógenos (JURGE et al., 2006). Há desequilíbrio nas células TCD4+, com posterior proliferação de linfócitos TCD8+, mediadores de reação citotóxica contra o organismo, que causam danos teciduais (BUÑO et al., 1998; JURGE et al., 2006). Borra et al. (2004) compararam o perfil de expressão gênica relacionado à resposta imune em pacientes com lesões aftosas e em indivíduos sem histórico da doença. Ao analisarem biópsias de UAR e de mucosa normal, identificaram 41 genes diferentemente expressos e um aumento da atividade dos linfócitos T-helper 1 (Th1), responsável pela produção de interferon-gama, interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A maior produção dessas citocinas implica na elevação do número de linfócitos TCD8+ (SAVAGE; SEYMOUR; KRUGER, 1985; CHAVAN et al., 2012). Segundo Lewkowicz et al. (2008), em pacientes acometidos por aftas há deficiência nas células T regulatórias CD4+ e CD25+. Pinto Filho et al. (2007) sugerem que as úlceras aftosas desenvolvem-se como resultado de uma cascata anormal das citocinas da mucosa bucal, gerando resposta imune exacerbada. No entanto, o único consenso entre os autores é que os níveis de IL-2 apresentam-se mais elevados em portadores de UAR quando comparados a indivíduos-controle.

Fatores que promovam a redução da espessura da barreira mucosa tais como trauma e determinadas deficiências nutricionais podem estar associados ao desenvolvimento da UAR. O trauma causa edema e aumento da viscosidade da matriz extracelular, podendo ser um agente desencadeante das lesões em indivíduos propensos às mesmas (WRAY; GRAYKOWSKI; NOTKINS, 1981;

AKINTOYE; GREENBERG, 2005). A possibilidade de que a predisposição genética possa estar relacionada à ocorrência das lesões é aventada, uma vez que há aumento de determinados subtipos de antígeno leucocitário humano (HLA) em pacientes com histórico familiar de UAR (JURGE et al., 2006; CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011).

A relação entre UAR e deficiências nutricionais, principalmente de ferro, vitamina B12 e ácido fólico tem sido estudada, embora os resultados ainda sejam conflitantes (OGURA et al., 2001; VOLKOV et al., 2005; GIACOMINI et al., 2010; LALLA et al., 2012). Piskin et al. (2002) encontraram níveis séricos de ferro ligeiramente menores em pacientes com UAR, porém sem diferença significativa. Giacomini et al. (2010) investigaram os níveis de vitamina B12, de ferro e de ácido fólico em pacientes com UAR. Apesar de não encontrarem diferenças significativas entre pacientes com a doença e controles, os autores sugerem a investigação desses parâmetros laboratoriais em pacientes com afta. Volkov et al. (2005) observaram melhora significativa em pacientes com UAR após administração parenteral de vitamina B12.

Considera-se a possibilidade de que a ansiedade e o estresse estejam envolvidos na etiopatogenia da UAR (MCCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996; SOTO-ARAYA; ROJAS ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008; GALLO; MIMURA; SUGAYA, 2009; PREETI et al., 2011). Segundo Redwine et al. (2003), o estresse psicológico pode induzir a desregulação das funções imunológicas. Soto-Araya, Rojas Alcaayaga e Esguep (2004) observaram níveis de estresse e de ansiedade mais elevados em pacientes com UAR do que em indivíduos sem a doença. Gallo, Mimura e Sugaya (2009) também constataram que pacientes com UAR exibiram maiores níveis de estresse psicológico quando

comparados a indivíduos-controle. Para esses autores, o estresse psicológico pode desempenhar um papel na manifestação da UAR, servindo como gatilho ou fator de modificação, que aumenta a susceptibilidade de pacientes predispostos a desenvolver as lesões. Albanidou-Farmaki et al. (2008) avaliaram as concentrações de cortisol e níveis de ansiedade, como forma de resposta ao estresse, em pacientes portadores de UAR. Os níveis de ansiedade foram superiores nos pacientes com afta, sugerindo que o estresse pode estar relacionado à patogênese da lesão.

A alfa-amilase salivar (AAS) foi primeiramente descrita por Leuchs em 1831 e é uma das enzimas mais importantes presentes na saliva (ZAKOWSKI; BRUNS, 1985; OPPENHEIM et al, 2007). Corresponde de 10 a 20% do conteúdo proteico produzido pelas glândulas salivares (NATER et al., 2005; OPPENHEIM et al, 2007) e consiste de duas famílias de isoenzimas, cuja massa molecular varia entre 54.000 e 57.000 Da, dependendo do grau de glicosilação (ZAKOWSKI; BRUNS, 1985; NATER; ROHLEDER, 2009). A AAS é produzida pelas glândulas salivares maiores e sua principal função é iniciar a digestão de macromoléculas como carboidratos. Quando imobilizada na superfície da hidroxiapatita dentária, essa enzima apresenta receptores para adesão de diversas espécies de *Streptococcus* e, portanto, contribui para a formação do biofilme dental e para o desenvolvimento de lesões cariosas (SCANNAPIECO; TORRES; LEVINE, 1995; VORRASI et al., 2010; SAMPAIO; MELLO; ALVES, 2011). Sua liberação é regulada pelo sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), cuja ação é de suma importância na psicobiologia do estresse. Estudos demonstram que os níveis da AAS em humanos aumentam sob várias situações de estresse físico e psicológico antes que qualquer outro sinal clínico possa ser percebido (NATER et al., 2005; NIEROP et al., 2006; KANG, 2010).

Uma vez que a literatura sugere o envolvimento de fatores psicológicos na etiopatogenia da UAR, o presente estudo objetivou avaliar os níveis de estresse e de ansiedade, bem como, a atividade da enzima alfa-amilase salivar em pacientes com afta, na tentativa de estabelecer possíveis fatores relacionados com essa doença e sua associação com um biomarcador salivar. Além disso, foi avaliado o impacto que a UAR provoca na qualidade de vida dos indivíduos.



PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo analisar a atividade da enzima alfa-amilase salivar, os níveis de estresse e de ansiedade de pacientes com ulceração aftosa recorrente, bem como o impacto que esta doença exerce na qualidade de vida dos indivíduos.



ARTIGO DE REVISÃO

3 ARTIGO DE REVISÃO

SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS NON-INVASIVE ALTERNATIVE FOR EVALUATION OF STRESS LEVELS

Artigo submetido para publicação (Anexo A)

Periódico: *Nursing & Health Science*

Fator de Impacto: 0.684

**SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS NON-INVASIVE ALTERNATIVE FOR
EVALUATION OF STRESS LEVELS – A REVIEW**

Juliana Andrade Cardoso

Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo

Karen Cherubini

Fernanda Gonçalves Salum

**Oral Medicine Division, São Lucas Hospital - Pontifical Catholic University of
Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.**

Address for correspondence:

Fernanda Gonçalves Salum

Hospital São Lucas PUCRS

Av. Ipiranga, 6690 – Sala 231 – 2º andar

CEP: 90610-000

Porto Alegre – RS – Brazil

Tel/Fax: +55 51 3320-3254

E-mail: fernanda.salum@pucrs.br

Total number of words: 2668

SALIVARY ALPHA-AMYLASE AND STRESS

ABSTRACT

Salivary alpha-amylase is produced by the major salivary glands, especially the parotid, and its principal function is to initiate the digestion of polysaccharides such as carbohydrates. The release of this enzyme is modulated by the sympathetic autonomic nervous system, and studies have demonstrated that the levels of salivary alpha-amylase increase under various conditions of physical and psychological stress before any other clinical sign can be noted. In this study, a review of the literature was conducted with respect to this enzyme, with emphasis on its relation to stress. Alpha-amylase is suggested as a salivary biomarker that can be used as a non-invasive alternative for assessing psychological and metabolic stress, and of diseases whose etiology appears to be associated with stress.

Keywords: alpha-amylases; physiological stress; psychological stress; saliva.

INTRODUCTION

Alpha-amylase is the major form of amylase found in humans and in other animals, where it is secreted especially by the acinar cells of salivary glands (form S) and of pancreas (form P) (Oppenheim et al., 2007). About 40% of circulated amylase comes from the pancreas and the other 60% from the salivary glands (Wong et al., 1993). Its main function is to initiate the digestion of polysaccharides such as carbohydrates, hydrolyzing starch and glycogen to maltose (Meisler et al., 1993). Salivary alpha-amylase catalyzes the hydrolysis of internal α -1,4 starch bonds, for which calcium and halides are required and the optimal pH is 6.9-7.0. Pancreatic amylase hydrolysis α -1,6 bonds. The release of pancreatic amylase is slightly more rapid than salivary amylase, possibly due to the larger proportion of the latter in serum (Wong et al., 1993).

The levels of alpha-amylase decrease in the first 60 min after waking and increase during the day (Nater et al., 2007). The serum and salivary levels of this enzyme do not depend on gender, age or body mass index (Nater et al., 2007; Nater & Rohleder, 2009). However, newborns show insignificant levels of alpha-amylase in the saliva. Its production begins in the first years of life and reaches normal levels at six years of age (O'Donnell & Miller, 1980).

Alpha-amylase activity can be measured by an enzyme kinetics assay, where enzyme action on a substrate is determined spectrophotometrically at 405 nm (Granger et al., 2007). The reference varies with the fluid in which the enzyme is analyzed, as well as the type of test used. Serum levels of alpha-amylase are elevated in abdominal and extra-abdominal disturbances. The abdominal disturbances include particularly pancreatic changes such as acute and chronic

pancreatitis, trauma, carcinoma, abscess, ascites and pseudocyst. Among the non-pancreatic disturbances are diseases of biliary tract, intestinal obstruction, mesenteric infarct, peritonitis and acute appendicitis. Extra-abdominal diseases such as trauma to the salivary glands, radiation sialoadenitis, sialolithiasis, malaria, pneumonia, measles, meningococcal meningitis and diabetes are some factors that increase alpha-amylase activity (Forsmark & Toskes, 2006).

Salivary alpha-amylase (SAA) comes from the serous acinar cells of the major salivary glands, mainly the parotid (Granger et al., 2007; Oppenheim et al., 2007; Nater & Rohleder, 2009). The release of this enzyme is regulated by the sympathetic autonomic nervous system (SANS), whose action is of utmost importance in the psychobiology of stress. Studies have demonstrated that the levels of SAA in humans increase under various situations of physical and psychological stress before any other noticeable clinical sign (Nater et al., 2005; Nierop et al., 2006 Kang, 2010). Researches involving this enzyme can be of great value for determining the possible association of stress with the development and progression of diseases.

PURPOSE

The purpose of this study was to review the literature on salivary alpha-amylase and its relation to stress.

METHODS

Initially studies describing the properties of salivary alpha-amylase enzyme, as well as evaluating the activity of this enzyme in oral diseases were selected by searching the keywords “*salivary alpha-amylase*”, “*stress*” and “*salivary alpha-amylase and oral disease*” in PubMed database. Subsequently studies evaluating the activity of alpha-amylase salivary enzyme and its association with physical and / or psychological stress were selected by crossing the keywords “*salivary alpha-amylase*” and “*stress*”. Finally, eighteen studies in humans evaluating the relationship between the enzyme and stress, published over the past 10 years were included.

RESULTS

Salivary alpha-amylase, described in 1831 by Leuchs by the name of ptyalin, consists of two families of isoenzymes, whose molecular mass varies between 54.000 and 57.000 Da, depending on the degree of glycosylation (Zakowski & Bruns, 1985; Nater & Rohleder, 2009). It is one of the principal and most abundant salivary proteins, corresponding from 10 to 20% of the protein content produced by the salivary glands (Nater et al., 2005; Oppenheim et al., 2007). Alpha-amylase is produced in the serous acinar cells of the major salivary gland, where the parotid is responsible for 40 to 50% of the total synthesis of this enzyme (Meisler et al., 1993; Granger et al., 2007; Oppenheim et al., 2007). Its main function is to initiate the digestion of polysaccharides. However, when immobilized on the tooth surface hydroxyapatite, this enzyme shows receptors for the adhesion of various species of *Streptococcus* and therefore contributes to the formation of dental biofilm and for the

development of caries (Scannapieco et al., 1995; Vorrasi et al., 2010; Sampaio et al., 2011).

Physical activities, gustatory or mechanical stimulation during eating, chronic and reaction stress, use of medication such as antihypertensives, antidepressants, anxiolytics, corticosteroids, beta-blockers, tetracycline or analgesics containing caffeine can be related to the elevation of salivary levels of this enzyme (Nater & Rohleder, 2009). Habits such as smoking and drinking can also influence salivary alpha-amylase levels. According to Goi et al. (2007) and Nater and Rohleder (2009), smoking is able to inhibit the activity of this enzyme. Enberg et al. (2001) determined that alcohol consumption causes a decrease in salivary flow, which results in a decrease in electrolytes and deficient production of total protein and amylase.

Sánchez et al. (2011) evaluated salivary flow rate and salivary levels of mucin and alpha-amylase in patients with periodontal disease in different stages. The patients with moderate and severe periodontal disease showed a decrease in salivary flow rate and increase in salivary levels of alpha-amylase and mucin. Haririan et al. (2012) determined the levels of alpha-amylase and chromogranin A (CgA) in saliva and serum of individuals with periodontal disease. There was a correlation of CgA and SAA with the severity of the disease.

Studies have demonstrated that the levels of this enzyme in humans increase under various conditions of physical and psychological stress (Nater et al., 2005; Nierop et al., 2008; Kang et al., 2010), and therefore, salivary alpha-amylase can be considered a biomarker of stress (Granger et al., 2007; van Veen et al., 2008; Nater & Rohleder, 2009; Kang, 2010). Tables 1 and 2 describe studies conducted in humans over the last 10 years, evaluating salivary alpha-amylase levels and their association with physical and/or psychological stress. Important methodological

differences could be observed in trying to make a comparison between the studies, mainly with respect to size of samples and age of patients. Eighteen studies were suitable for this review in view of the objectives proposed, and they were grouped according to age range of patients.

Table 1: Studies on the influence of stress on salivary alpha-amylase (SAA) levels in adults.

AUTHOR	SAMPLE	OBJECTIVE	RESULTS
Kim et al. (2012)	50 individuals, female: -30 with Burning mouth syndrome (BMS) -20 without BMS	To determine the correlation between salivary levels of alpha-amylase, cortisol, dehydroepiandrosterone, progesterone, 17 β -estradiol and quality of life in patients with BMS.	There was no significant correlation between SAA or other salivary analytes determined and quality of life in patients with BMS.
Rai & Kaur (2011)	12 individuals, male	To evaluate the psychological state (by means of current stress test) and salivary levels of CgA, cortisol, SAA and β -endorphin, 21 days after simulated microgravity.	After a week of microgravity, all volunteers developed psychological stress, and secretions of CgA, cortisol, SAA and β -endorphin were significantly higher.
McGirr et al. (2010)	28 individuals: -14 with 1st degree kinship with those who committed suicide -14 without that family history Both groups without history of psychopathologies or depression.	To investigate the reactivity of ANS and HPA axis to stress in predisposition to suicide and to characterize the effect of this dysregulation in neuropsychological function.	Individuals with family history of suicide showed reduced levels of cortisol and SAA in response to social stress test, which suggests vulnerability to suicide.
Kawada et al. (2009)	8 individuals, male	To evaluate the effects of hyperoxygenation on psychological stress by means of analysis of levels of salivary biomarkers (SAA, CgA and cortisol).	SAA activity increased after induction of situations of stress, but decreased when the individuals inhaled 100% oxygen, suggesting that hyperoxygenation attenuates the excitability caused by psychological stress.
Sugimoto et al. (2009)	16 individuals, female	To evaluate the efficacy of the <i>Uchida-Kraepelin</i> (UK) test as a psychological/mental stressor by means of analysis of ACTH, catecholamines (dopamine, noradrenaline and adrenaline), SAA,	There were no alterations in the levels of ACTH, catecholamines, SAA or IgA during or after the application of the test.

		CgA and IgA.	
Holt-Lunstad et al. (2008)	34 couples (68 individuals)	To investigate if a support intervention <i>warm touch</i> has any influence on the physiological stress in couples. Behavioral monitoring, determination of blood pressure (BP) and levels of oxytocin, cortisol and SAA were analysed.	BP and SAA activity were lower in the group that received the support intervention. The levels of salivary oxytocin were increased in this group. No changes were found in the cortisol levels.
Grillon et al. (2007)	20 doctors	To determine if stress increases anxiety by evaluation of levels of cortisol, SAA, BP and heart rate (HR) after stressor task.	Social stressors induce an increase in levels of cortisol and SAA, as well as of BP, HR and subjective anguish.
Payne et al. (2007)	76 undergraduate students	To examine the impact of stress on the long-term retention of separate emotional and neutral episodes, and to determine whether changes in memory performance would correlate with measures of stress responsivity such as salivary cortisol, SAA and HR.	The stress manipulation increased salivary cortisol, SAA and HR. Stressed individuals reported false memories more so than control individuals.
Nierop et al. (2006)	90 individuals, female: -30 pregnant (second trimester) -30 pregnant (third trimester) -30 not pregnant	To identify endocrine, autonomic and psychological responses to standardized psychosocial stressors in different stages of pregnancy.	HR, SAA and salivary cortisol were significantly increased in the third trimester in comparison to the second trimester of pregnancy and to not pregnant.
Noto et al. (2005)	10 individuals, female	To investigate the relation between salivary biomarkers and anxiety scores in patients under psychological stress.	The levels of anxiety and SAA showed a positive association. However, there was no correlation with the levels of cortisol or CgA.

Burning mouth syndrome (BMS); Salivary alpha-amylase (SAA); Chromogranin A (CgA); Autonomic nervous system (ANS); Hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis); Uchida-Kraepelin (UK); Adrenocorticotrophic hormone (ACTH); Immunoglobulin A (IgA); Blood pressure (BP); Heart rate (HR).

Table 2: Studies on the influence of stress on salivary alpha-amylase (SAA) levels in babies, children and adolescents.

AUTHOR	SAMPLE	OBJECTIVE	RESULT
Räikkönen et al. (2010)	282 children, 8 years of age	To determine if sleep pattern is associated with activity of HPA axis and ANS by measuring levels of cortisol and SAA.	Children who slept less than 7.7 h exhibited higher levels of cortisol and SAA when compared with longer sleep.
Rudolph et al. (2010)	132 children, mean age of 9 years	To evaluate if variations in salivary levels of cortisol and SAA contribute to differences between aggression and victimization.	High levels of SAA were associated with situations of both frustration and aggression in young girls, but there was no variation in cortisol level. No difference was seen in males.
Davis & Granger (2009)	85 pairs of mothers and children (ages of 2, 6, 12 and 24 months)	To examine the levels of SAA and cortisol of babies in response to stress protocols.	Despite of older children (24 months) exhibited higher SAA levels, the increase in enzyme activity after induction of stress was evident only at 6 and 12 months of age.
Spinrad et al. (2009)	84 children, mean age of 54 months	To evaluate levels of cortisol and SAA after the introduction of a stressor task.	52% of the children had an increase in cortisol levels and 47% in SAA levels after carrying out the proposed task.
Stroud et al. (2009)	82 children and adolescents, ages between 7 and 17 years.	To examine the neuroendocrine (salivary cortisol and SAA) and cardiovascular responses to stressor agents.	Adolescents showed levels of cortisol, SAA and BP that were significantly higher in response to stress when compared to children.
Gordis et al. (2008)	84 children and adolescents, ages between 9 and 14 years: -47 maltreated -37 controls	To examine the symmetry between the levels of SAA and cortisol in response to a social stressor between maltreated youths and controls.	In the control group, there was a significant association between the levels of SAA and cortisol, while in the maltreated group the responses of the two biomarkers did not show an association.
Fortunato et al. (2008)	87 children, 2 years of age: -46 females	To examine the association of SAA activity and cortisol levels with affective behavior in children.	SAA activity was positively associated with attachment behavior and positive affect. Cortisol levels were associated with negative affect and

	-41 males		withdrawal behavior.
Schäffer et al. (2008)	54 newborns: -27 full-term babies -27 prematures	To evaluate response to pain in premature versus full-term babies by means of SAA levels.	There was no statistically significant difference between the two groups in the increase in SAA levels in response to pain.

Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis (HPA axis); Autonomic nervous system (ANS); Salivary alpha-amylase (SAA); Blood pressure (BP).

DISCUSSION

SANS has been studied due to its important role in the establishment of responses to stressful events. Research in psychoneuroimmunology demonstrates clinically relevant interrelations between psychological stressors and the establishment and progression of chronic diseases. Along this line, the activity of salivary alpha-amylase has become a marker of stress and anxiety (Nater & Rohleder, 2009), as well as a tool for painless and non-invasive, rapid diagnosis (Granger et al., 2007; van Veen et al., 2008; Nater & Rohleder, 2009; Kang, 2010; Haririan et al., 2012) in the evaluation of pathological dysregulation of ANS under specific clinical and subclinical conditions.

In this review, it was found that adult individuals submitted to situations of stress show a substantial increase in SAA activity (Noto et al., 2005; Nierop et al., 2006; Grillon et al., 2007; Payne et al., 2007; Holt-Lunstad et al., 2008; Kawada et al., 2009; Rai & Kaur et al., 2011). Two of the studies examined, however, failed to find a positive association between this enzyme activity and stress (Sugimoto et al., 2009; McGirr et al., 2010). Sugimoto et al. (2009) investigated a new psychological stressor test, but did not observe any elevation in SAA levels, suggesting the inefficacy of the test. McGirr et al. (2010) examined the enzyme levels of relatives of persons that committed suicide and observed that salivary alpha-amylase activity was lower compared to control individuals. The authors suggested that this group exhibits in response to psychosocial stress a dysregulation of the activation of ANS and HPA axis.

Studies of SAA for the evaluation of oral diseases are still scarce and recent in the international literature. Sánchez et al. (2011) determined the activity of this

enzyme in patients with periodontal disease in different stages and suggested that metabolic stress caused by periodontal inflammation can lead to the release of some salivary proteins, such as alpha-amylase. Haririan et al. (2012) also evaluated SAA activity in patients with periodontal disease, demonstrating a correlation of SAA activity with disease severity. Kim et al. (2012) conducted an investigation in patients with burning mouth syndrome and found that the activity of SAA did not differ between patients with the disease and controls.

This review showed that in children and adolescents SAA activity was also elevated when the patients were submitted to situations of stress. In babies, however, no positive association was found between SAA and stress (Schäffer et al., 2008; Davis & Granger et al., 2009). These results corroborated the findings of O'Donnell and Miller (1980), who demonstrated insignificant enzyme levels in newborns, where normal SSA levels were reached at six years of age.

CONCLUSION

According to the literature presented, salivary alpha-amylase has been shown to be an effective biomarker that can be used in an alternative and non-invasive manner for assessing psychological and metabolic stress, including diseases whose etiology appears to be associated with stress.

CONTRIBUTIONS

Study Design: JAC, MAZF, KC, FGS

Data Collection and Analysis: JAC

Manuscript Writing: JAC

REFERENCES

Davis EP, Granger DA. Developmental differences in infant salivary alpha-amylase and cortisol responses to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; **34**: 795-804.

Denniss AR, Young JA. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. *Pflugers Arch*. 1978; **376**: 73-80.

Enberg N, Alho H, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; **92**: 292-8.

Forsmark CE, Toskes PP. Evaluation of the patient with pancreatic disease. In: Coelho JCU. *Digestive tract: clinic medicine and surgery*. São Paulo: Atheneu, 2006; 1781-94.

Fortunato CK, Dribin AE, Granger DA, Buss KA. Salivary alpha-amylase and cortisol in toddlers: differential relations to affective behavior. *Dev Psychobiol*. 2008; **50**: 807-18.

Goi N, Hirai Y, Harada H, et al. Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. *J Toxicol Sci*. 2007; **32**: 121-7.

Gordis EB, Granger DA, Susman EJ, Trickett PK. Salivary alpha amylase-cortisol asymmetry in maltreated youth. *Horm Behav.* 2008; **53**: 96-103.

Granger DA, Kivlighan KT, Blair C, et al. Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships. *J Pers Soc Relat.* 2006; **23**: 267-90.

Granger DA, Kivlighan KT, el-Sheikh M, Gordis EB, Stroud LR. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; **1098**: 122-44.

Grillon C, Duncko R, Covington MF, Kopperman L, Kling MA. Acute stress potentiates anxiety in humans. *Biol Psychiatry.* 2007; **62**: 1183-6.

Haririan H, Bertl K, Laky M, et al. Salivary and serum chromogranin A and α -amylase in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2012; **83**: 1314-21.

Holt-Lunstad J, Birmingham WA, Light KC. Influence of a "warm touch" support enhancement intervention among married couples on ambulatory blood pressure, oxytocin, alpha amylase, and cortisol. *Psychosom Med.* 2008; **70**: 976-85.

Kang Y (2010) Psychological stress-induced changes in salivary alpha-amylase and adrenergic activity. *Nurs Health Sci.* 2010; **12**: 477-84.

Kawada S, Fukusaki C, Ohtani M, Kobayashi K. Effects of hyperoxic inhalation on psychological stress-induced salivary biomarkers. *Biomed Res.* 2009; **30**: 245-9.

Kim HI, Kim YY, Chang JY, Ko JY, Kho, HS. Salivary cortisol, 17 β -estradiol, progesterone, dehydroepiandrosterone, and α -amylase in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis.* 2012; **18**: 613-20.

McGirr A, Diaconu G, Berlim MT, et al. Dysregulation of the sympathetic nervous system, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and executive function in individuals at risk for suicide. *J Psychiatry Neurosci.* 2010; **35**: 399-408.

Meisler MH, Ting CN. The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; **4**: 503-9.

Nater UM, Rohleder N, Gaab J, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol.* 2005; **55**: 333-42.

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.

Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology.* 2007; **32**: 392-401.

Nierop A, Bratsikas A, Klinkenberg AA, Nater UM, Zimmermann R, Ehlert U. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and attenuated salivary α -amylase responses to psychosocial stress in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**: 1329-35.

Nierop A, Wirtz PH, Bratsikas A, Zimmermann R, Ehlert U. Stress-buffering effects of psychosocial resources on physiological and psychological stress response in pregnant women. *Biol Psychol.* 2008; **78**: 261-8.

Noto Y, Sato T, Kudo M, Kurata K, Hirota K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. *Anesth Analg.* 2005; **101**: 1873-6.

O'Donnell MD, Miller NJ. Plasma pancreatic and salivary-type amylase and immunoreactive trypsin concentrations: variations with age and reference ranges for children. *Clin Chim Acta.* 1980; **104**: 265–73.

Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; **1098**: 22-50.

Payne JD, Jackson ED, Hoscheidt S, Ryan L, Jacobs WJ, Nadel L. Stress administered prior to encoding impairs neutral but enhances emotional long-term episodic memories. *Learn Mem.* 2007; **14**: 861-8.

Rai B, Kaur J. Salivary stress markers and psychological stress in simulated microgravity: 21 days in 6° head-down tilt. *J Oral Sci.* 2011; **53**: 103-7.

Räikkönen K, Matthews KA, Pesonen AK, et al. Poor sleep and altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenal-medullary system activity in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; **95**: 2254-61.

Rudolph KD, Troop-Gordon W, Granger DA. Peer victimization and aggression: moderation by individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase. *J Abnorm Child Psychol.* 2010; **38**: 843-56.

Sánchez GA, Miozza V, Delgado A, Busch L. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; **46**: 221-7.

Sampaio N, Mello S, Alves C. Dental caries-associated risk factors and type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2011; **17**: 152-7.

Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; **74**: 1360-6.

Schäffer L, Burkhardt T, Müller-Vizentini D, et al. Cardiac autonomic balance in small-for-gestational-age neonates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; **294**: H884-90.

Schneyer LH. Amylase content of separate salivary gland secretions of man. *J Appl Physiol.* 1956; **9**: 453-5.

Spinrad TL, Eisenberg N, Granger DA, et al. Individual differences in preschoolers' salivary cortisol and alpha-amylase reactivity: relations to temperament and maladjustment. *Horm Behav.* 2009; **56**: 133-9.

Stroud LR, Foster E, Papandonatos GD, et al. Stress response and the adolescent transition: performance versus peer rejection stressors. *Dev Psychopathol.* 2009; **21**: 47-68.

Sugimoto K, Kanai A, Shoji N. The effectiveness of the Uchida-Kraepelin test for psychological stress: an analysis of plasma and salivary stress substances. *Biopsychosoc.* 2009; **3**: 5.

van Veen JF, van Vliet IM, Derijk RH, van Pelt J, Mertens B, Zitman FG. Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2008; **33**: 1313-21.

Wong EC, Butch AW, Rosenblum JL. The clinical chemistry laboratory and acute pancreatitis. *Clin Chem.* 1993; **39**: 234-43.

Zakowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1985; **21**: 283-322.



ARTIGO DE PESQUISA

4 ARTIGO DE PESQUISA

SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Artigo submetido para publicação (Anexo B)

Periódico: *Archives of Oral Biology*

Qualis CAPES 2012: A2 (Odontologia)

Fator de impacto: 1.772

**SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND
LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS**

Aphthae: α -amylase, stress and anxiety

Juliana Andrade Cardoso

André Avelino Santos Junior

Maria Lucia Tiellet Nunes

Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo

Karen Cherubini

Fernanda Gonçalves Salum

**Oral Medicine Division, São Lucas Hospital - Pontifical Catholic University of
Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.**

Address for correspondence:

Fernanda Gonçalves Salum

Hospital São Lucas PUCRS

Av. Ipiranga, 6690 – Sala 231 – 2º andar

CEP: 90610-000

Porto Alegre – RS – Brazil

Tel/Fax: +55 51 3320-3254

E-mail: fernanda.salum@pucrs.br

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate stress, anxiety and salivary alpha-amylase (SAA) activity in patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS). The impact of this disease on the life quality of individuals was also evaluated. **Design:** Twenty two patients with RAS and control subjects, matched by sex and age, were selected. Stress was assessed using the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults and the anxiety through the Beck Anxiety Inventory. To assess the life quality the World Health Organization Quality of Life-bref (WHOQOL-BREF) and the Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14) were used. Saliva samples were collected in the morning and afternoon and the SAA activity was analyzed by enzymatic kinetic method. **Results:** No significant difference was observed between the groups regarding the SAA activity ($P=0.306$). Patients with RAS had higher scores of anxiety ($P=0.016$) and, although the prevalence of stress has been higher in this group, there was no significant difference compared to the control group ($P=0.498$). The scores of physical ($P=0.026$), psychological ($P=0.005$), social ($P=0.001$) and environmental domains ($P=0.040$) of WHOQOL-BREF were significantly lower in patients with RAS. The values obtained through OHIP-14 were significantly higher in these patients ($P=0.002$). **Conclusion:** RAS negatively affects the life quality. Patients with the disease have higher levels of anxiety, suggesting its association with the etiopathogenesis of RAS. Despite being a biomarker of stress, the release of SAA oscillates rapidly and may be influenced by several factors, not being related to stress and anxiety in patients with RAS.

Keywords: aphthous stomatitis; alpha-amylases; saliva; anxiety; psychological stress; physiological stress; quality of life.

INTRODUCTION

The recurrent aphthous stomatitis (RAS) is one of the most frequent disorders of the oral mucosa and is characterized by single or multiple and relapsing ulcerations.¹ The lesions are painful, may impair feeding, speech and oral hygiene, leading to more severe impact on life quality.² Its development involves deregulation in mechanisms of oral mucosal response against exogenous or endogenous antigens. There is an imbalance of TCD4+ cells with proliferation of TCD8+ lymphocytes, mediators of cytotoxic reaction.^{3,4} Studies suggest increased Th1 activity relative to Th2 in patients with aphthous stomatitis.⁵⁻⁹ Several factors have been investigated in the etiology of RAS,¹⁰ but the mechanism that triggers the development of lesions remains unknown.¹¹ Nutritional deficiencies,¹¹⁻¹⁴ hypersensitivity to certain foods,^{15,16} local trauma in patients genetically prone,¹⁰ psychological disorders¹⁷⁻²¹, among others have been studied. Stress and anxiety seem to be factors associated with the RAS, since higher levels of these psychological disorders have been observed in patients with the disease.¹⁷⁻²¹ Gallo et al.²⁰ suggest that the psychological stress can act as a trigger, increasing the susceptibility of patients predisposed to develop aphthous stomatitis.

The salivary alpha-amylase enzyme (SAA) is produced by the salivary glands and its main function is to initiate the digestion of macromolecules such as carbohydrates.²²⁻²⁴ Its release is regulated by the sympathetic autonomic nervous system (SANS), whose action is of paramount importance in the psychobiology of stress.²⁵⁻²⁸ Studies show that the SAA levels in humans increase under physical and psychological stress.²⁸⁻³⁰ For this reason, the SAA has become a marker of stress

and anxiety,²⁷ being a fast, painless and non-invasive tool^{25-28,31} for assessment of the ANS pathological dysregulation in specific clinical and subclinical conditions.²⁷

The present study aimed at analyzing the salivary alpha-amylase activity, as well as psychological disorders in patients with RAS in attempt to establish possible factors associated with this disease and its relationship to a salivary biomarker. The RAS impact on the life quality was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

This clinical, transversal, observational and controlled study was approved by the Ethics Committee in Research of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS Protocol-11/05581). The sample consisted of 52 individuals of both sexes, aged between 19 and 69 years, who were divided into RAS group (22 patients with RAS, who should have had at least three outbreaks of lesions in the last year) and control group (30 patients with no known history of RAS), matched by sex and age. Patients signed an informed consent form.

The study excluded individuals with systemic diseases that could be associated with the development of lesions in the oral mucosa (systemic erythematosus lupus, Behçet's syndrome, Crohn's disease, cyclic neutropenia or AIDS), who presented a history of malignant neoplasia, chemotherapy or radiotherapy, smokers, users of antidepressants, anxiolytics, corticosteroids, beta-blockers, analgesics containing caffeine or tetracycline. Patients with infectious, erosive or ulcerative lesions in the oral mucosa, as well as those with abnormal blood counts, levels of glucose, iron, folic acid and vitamin B12 were also excluded from the sample.

The RAS diagnosis was based on the clinical appearance of the lesions and the patients' history according to the criteria established by Chattopadhyay and Shetty¹ and Preeti et al.³² Patients with RAS were recruited consecutively in the outpatient clinic of the Oral Medicine Department, Hospital São Lucas-PUCRS and the control group was selected at the Faculty of Dentistry-PUCRS. During the interview were recorded the medical history and medications used by patients. Individuals with RAS were asked about the disease progression, the frequency of outbreaks and its association with trigger factors. On the intraoral examination were recorded the number of lesions, their location and clinical form.

Evaluation of Symptoms of Anxiety and Stress

For the investigation of anxiety and stress were used the Beck Anxiety Inventory (BAI) and the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for adults (LISS), respectively. Both psychometric instruments were validated for the Brazilian population.

Life Quality Assessment

The World Health Organization Quality of Life-bref (WHOQOL-BREF) was used to assess the overall life quality and the Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14), was employed to assess the life quality regarding the oral health of patients. The Portuguese versions of both questionnaires were also validated in Brazil.

Collection of Saliva Samples

The patients' saliva was collected twice in the same day, between 8:00 am and 9:00 am (before breakfast and at least 1 hour after awakening) and between 2:00 pm and 5:00 pm. Disposable flasks with a capacity of 80 ml were used, they were properly identified for each collection period.

Samples were collected during the week, between Monday and Thursday. Patients were advised not to drink alcohol for 24 hours before, do not eat or drink, nor put any substance in the mouth (including not brushing teeth), not doing physical exercises, not consuming caffeine or to apply drugs or cosmetics in lips for at least one hour before collecting saliva. Patients should remain seated with their eyes open, and deposit the saliva on the flask according to the accumulation in the mouth for long enough so that it would be reached the mark of 1.5 ml. The containers were stored in the freezer until the next day, when they were collected by the researcher. The flasks were stored at -20 °C.

Analysis of Salivary Alpha-Amylase

The SAA activity was determined by enzymatic kinetic reaction with the Salivary α -Amylase Assay Kit (Salimetrics™- 101 Innovation Blvd., Canada-USA), on serial batteries, following the manufacturer's guidelines. The chromogenic substrate 2-chloro-p-nitrophenol linked with maltotriose was used. The enzyme action on this substrate was measured spectrophotometrically at 405 nm.

Statistical Analysis

Variables were initially analyzed using descriptive statistics. The Mann-Whitney test was applied for comparison of SAA activity, scores of inventories BAI and OHIP-14 between groups. The Student's *t*-test for independent samples was used to evaluate the WHOQOL-BREF inventory data. The chi-square (χ^2) was used for comparison of presence of stress and anxiety levels between groups. Pearson's correlation coefficient was used to determine the correlation between the SAA activity, anxiety scores and life quality within the groups. The significance level was $p \leq 0.05$. The SPSS version 17 was used.

RESULTS

Sample Characterization

In the RAS group, 18 (81.8%) patients were female and four (18.2%) were male. In the control group, 23 (76.7%) patients were female and seven (23.3%) were male. The age of the patients ranged from 18 to 69 years. The mean age of RAS group was 33.82 (± 15.72) years and control group was 30.20 (± 12.87) years. All patients in the RAS group had minor aphthous, and there were 29 lesions. The affected sites were tongue (31%), labial mucosa (31%), alveolar mucosa (24.2%), buccal mucosa (6.9%) and mouth floor (6.9%). With respect to trigger factors, 31.8% of patients associated the onset of aphthous stomatitis with stress, 22.7% with acidic foods, 4.5% had this association with anxiety and 41% did not correlate the appearance of lesions with triggering agents. Lesions were perceived from childhood

by 50% of patients, from the fourth decade of life by 27.3% and, 22.7% could not specify the time of disease progression. In 72.7% of patients the outbreaks of RAS occurred less than once per month and the frequency was more than once per month in 27.3% of cases.

Activity of Salivary Alpha-Amylase

There was no significant difference in the SAA activity between RAS and control groups in the samples of morning or afternoon ($P=0.326$) (Table 1).

Table 1. Activity of the salivary alpha-amylase enzyme (U/ml) in the RAS and control groups.

Salivary alpha-amylase (U/ml)	RAS group	Control group	P
	n=22	n=30	
	Median (P25 – P75)	Median (P25 – P75)	
Morning Samples	42.72 (25,18 – 75.55)	45.50 (35.68 – 97.47)	0.326
Afternoon Samples	83.47 (54.89 – 136.26)	74.85 (50.42 – 124.23)	0.326

Mann-Whitney's test significant at $p \leq 0.05$

Anxiety, Stress and Life Quality

The anxiety scores were significantly higher in the RAS group compared to the control group ($P=0.016$) (Table 2). When anxiety was categorized as minimum/mild or moderate/severe it was observed that a significantly higher percentage of patients with RAS showed higher levels of this disorder ($P=0.046$) (Table 3). In the RAS group, 50.0% of subjects had stress while this number was 36.7% in the control group; however, there was no significant difference between them on this variable ($P=0.498$) (Table 4).

The scores of physical ($P=0.026$), psychological ($P=0.005$), social ($P=0.001$) and environmental ($P=0.040$) domains of the WHOQOL-BREF inventory were significantly lower in the RAS group (Table 5). Values obtained through the OHIP-14 were significantly higher in patients of this group ($P=0.002$) (Table 2), i.e. the disease exerted negative influence on life quality.

Table 2. Scores of the Beck Anxiety Inventory (BAI) and the Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14) in the RAS and control groups.

	RAS group	Control group	P
	n=22	n=30	
	Median (P25 – P75)	Median (P25 – P75)	
BAI	10.50 (5.00 – 28.25)	5.50 (1.00 – 10.00)	0.016
OHIP-14	8.35 (1.17 – 13.93)	2.75 (0.00 – 4.53)	0.002

Mann-Whitney's test significant at $p \leq 0.05$

Table 3. Anxiety levels obtained through the Beck Anxiety Inventory (BAI) in the RAS and control groups.

	RAS group	Control group	Total
	n=22	n=30	
	n (%)	n (%)	
Minimum /mild	15 (68.2)	28 (93.3)	43 (82.7)
Moderate/Severe	7 (31.8)	2 (6.7)	9 (17.3)
Total	22 (100)	30 (100)	52 (100)

Chi-square test, **$P=0.046$**

Table 4. Prevalence of stress obtained through the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (LISS) in the RAS and control groups.

	RAS group	Control group	P
	n=22	n=30	
	Yes	Yes	
Stress	11 (50.0%)	11 (36.7%)	0.498

Chi-square test, significant at $p \leq 0.05$

Table 5. Scores of physical, psychological, social and environmental domains of the World Health Organization Quality of Life-bref (WHOQOL-BREF) inventory in the RAS and control groups.

WHOQOL-BREF Domains	RAS group n=22	Control group n=30	P
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Physical	70.1 \pm 13.5	78.5 \pm 12.5	0.026
Psychological	66.9 \pm 13.8	76.9 \pm 8.8	0.005
Social	65.7 \pm 19.2	82.5 \pm 12.6	0.001
Environmental	61.1 \pm 13.9	68.7 \pm 11.9	0.040

Student's *t*-test for independent samples, significant at $p \leq 0.05$

The anxiety and quality of life scores did not correlate with the activity of SAA (data not shown).

DISCUSSION

Studies that analyze the SAA activity in oral diseases whose etiopathogenesis may be related to stress and anxiety are still scarce and recent in the international literature. Since some authors have suggested the association of psychological disorders to RAS and, considering that the SAA is a marker of SANS activation, this study analyzed the enzyme activity in subjects with aphthous stomatitis. We observed considerable variability in the SAA activity, both among patients with RAS and among the controls, with no significant difference between the groups. Similar results were observed by Kim et al.³³ when investigating, among other markers, the activity of SAA in patients with burning mouth syndrome. The authors found no difference in enzyme levels between patients with the syndrome and controls, nor significant correlation of SAA with psychological symptoms such as anxiety and depression. On the other hand, Sánchez et al.³⁴ observed elevation of this enzyme activity in patients with periodontal disease; however, they suggest that the metabolic stress caused by the inflammatory process is responsible for this finding.

The literature reports increased levels of SAA under various conditions of physical and psychological stress.²⁸⁻³⁰ Overall, the studies evaluate the activity of this enzyme in response to acute stress, i.e. immediately after stressful situations or tasks. In these cases, there is a significant increase in the SAA activity as an immediate response to the stressor agent.³⁵⁻³⁹ This reaction occurs due to the SANS activation, which through the release of catecholamines, causes changes in the physiological state.³⁹ In the salivary glands, the sympathetic innervation causes vasoconstriction, decreased salivary flow and increased protein and inorganic compounds, mainly alpha-amylase.⁴⁰ This is a short-lived response, owing to reflex parasympathetic activation.³⁹ In this study, patients were evaluated and their saliva collected within 72 h after presentation of clinical signs of aphthous stomatitis, which may explain the absence of differences in enzymatic levels. Therefore, the SAA has not shown to be a salivary marker associated with RAS.

The combination of stress and anxiety in the RAS etiology has been suggested in the literature,^{17,19} since these disorders modify and promote deregulation of immune functions, with an imbalance of Th1/Th2 cytokines.⁴¹ In this study, scores and anxiety levels were significantly higher in subjects with RAS when compared to controls. The percentage of patients with stress was also higher in the RAS group but with no significant difference compared to the control. The lack of difference between groups can be explained by the sample size and because the stress has been assessed as a dichotomous variable. Similar results were found by McCartan et al.⁴², Soto-Araya et al.¹⁷, Albanidou-Farmaki et al.¹⁹ and Gallo et al.²⁰ when assessing anxiety in patients with RAS. However, it remains controversial whether these psychological alterations are associated with etiology or develop as a consequence of pain caused by the RAS. For Picsek et al.⁴³, psychological disorders

do not precede the development of lesions and patients are more anxious due to the discomfort caused by them.

Regarding the life quality, the scores of the four domains of the WHOQOL-BREF Inventory, which evaluates the overall life quality, were significantly lower in RAS group. The values obtained from the OHIP-14 instrument, which assesses the impact of oral conditions on life quality, were significantly higher in patients of this group. The lower the WHOQOL-BREF scores, the worse the life quality of patients. In contrast, higher scores of OHIP-14 indicate greater impact of oral health on life quality. Therefore, the results of this study demonstrate that the RAS has a negative impact both on overall life quality as related to oral health. Similar results were observed by Mumcu et al.¹⁸ and Krisdapong et al.², once this disease causes pain, discomfort, difficulty in feeding and speech, harming the emotional stability of patients.

In this study, the RAS was more prevalent in female patients, the lesions were minor aphthous and in 50% of cases the disease started in childhood. These results corroborate the literature, since the RAS affects mainly women^{21,44} and minor aphthous are the most prevalent, with its initial development in childhood.^{1,10,15} The lesions were observed mainly in the ventral, edges of the tongue and labial mucosa, confirming their preference for non-keratinized mucosa.^{1,10,11,17,20}

The RAS is a complex, multifactorial disease, and although not a morbid entity, it negatively affects the life quality of individuals. We can conclude that patients with the disease have higher levels of anxiety, suggesting its association with the etiopathogenesis of RAS. Moreover, despite being a biomarker of stress, the SAA release oscillates rapidly and may be influenced by several factors, not being

related to stress and anxiety in patients with RAS. Further studies are needed to elucidate the role of these psychological disorders in the RAS etiopathogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Professors **Hélio Radke Bittencourt** and **Sérgio Kato** for having performed the statistical analysis of the study, Professor **Priscila Murolo** for the English revision and Professor **Maria Martha Campos** from the Institute of Toxicology and Pharmacology (INTOX), for assisting in conducting the experiment.

REFERENCES

- 1 Chattopadhyay A, Shetty KV. Recurrent aphthous stomatitis. *Otolaryngol Clin North Am* 2011;44(1):79-88.
- 2 Krisdapong S, Sheiham A, Tsakos G. Impacts of recurrent aphthous stomatitis on quality of life of 12 and 15-year-old Thai children. *Qual Life Res* 2012;21(1):71-6.
- 3 Buño IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor α , interleukins 2, 4 and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1998;134(7):827-31.
- 4 Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2006;12(1):1-21.

- 5 Redwine L, Snow S, Mills P, Irwin M. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosom Med* 2003;65(4):598-603.
- 6 Borra RC, Andrade PM, Silva IDCG, Morgun A, Weckx LLM, Smirnova AS, et al. The Th1/Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med* 2004;33(3):140-6.
- 7 Miyamoto Jr NT, Borra RC, Abreu M, Weckx LL, Franco M. Immune-expression of HSP27 and IL-10 in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2008;37(8):462-7.
- 8 Borra RC, Andrade PM, Silva IDCG, Morgun A, Weckx LLM, Smirnova AS, et al. Toll-like receptor activity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2009;38(3):289-98.
- 9 Ozdemir IY, Calka O, Karadag AS, Akdeniz N, Ozturk M. Thyroid autoimmunity associated with recurrent aphthous stomatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26(2):226-30.
- 10 Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am* 2005;49(1):31-47.
- 11 Volkov I, Rudoy I, Abu-Rabia U, Masalha T, Masalha R. Case Report: Recurrent aphthous stomatitis responds to vitamin B12 treatment. *Can Fam Physician* 2005;51(6):844-5.
- 12 Ogura M, Yamamoto T, Morita M, Watanabe T. A case-control study on food intake of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(1):45-9.

- 13 Piskin S, Sayan C, Durukan N, Senol M. Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16(1):66-7.
- 14 Lalla RV, Choquette LE, Feinn RS, Zawistowski H, Latortue MC, Kelly ET, et al. Multivitamin therapy for recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-masked, placebo-controlled trial. *J Am Dent Assoc* 2012;143(4):370-6.
- 15 Calderón PE, Valenzuela FA, Carreño LE, Madrid AM. A posible link between cow milk and recurrent aphthous stomatitis. *Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(7):898-9.
- 16 Altenburg A, Zouboulis CC. Current concepts in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Skin Therapy Lett* 2008;13(7):1-4.
- 17 Soto-Araya M, Rojas Alcayaga G, Esguep A. Association between psychological disorders and the presence of oral lichen planus, burning mouth syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *Med Oral* 2004;9(1):1-7.
- 18 Mumcu G, Hayran O, Ozalp DO, Inanc N, Yavuz S, Ergun T, et al. The assessment of oral health-related quality of life by factor analysis in patients with Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2007;36(3):147-52.
- 19 Albanidou-Farmaki E, Pouloupoulos AK, Epivatianos A, Farmakis K, Karamouzis M, Antoniadis D. Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tohoku J Exp Med* 2008;214(4):291-6.
- 20 Gallo CB, Mimura MAM, Sugaya NN. Psychological stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clinics* 2009;64(7):645-8.

- 21 Huling LB, Baccaglini L, Choquette L, Feinn RS, Lalla RV. Effect of stressful life events on the onset and duration of recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2012;41(2):149-52.
- 22 Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res* 1995;74(7):1360-6.
- 23 Vorrasi J, Chaudhuri BW, Haase EM, Scannapieco FA. Identification and characterization of amylase binding protein C (AbpC) from *Streptococcus mitis* NS51. *Mol Oral Microbiol* 2010;25(2):150-6.
- 24 Sampaio N, Mello S, Alves C. Dental caries-associated risk factors and type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2011;17(3):152-7.
- 25 Granger DA, Kivlighan KT, el-Sheikh M, Gordis EB, Stroud LR. Salivary α -amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann NY Acad Sci* 2007;1098:122-44.
- 26 van Veen JF, van Vliet IM, DeRijk RH, van Pelt J, Mertens B, Zitman FG. Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33(10):1313-21.
- 27 Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(4):486-96.
- 28 Kang Y. Psychological stress-induced changes in salivary alpha-amylase and adrenergic activity. *Nurs Health Sci* 2010;12(4):477-84.
- 29 Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol* 2005;55(3):333-42.

- 30 Nierop A, Wirtz PH, Bratsikas A, Zimmermann R, Ehlert U. Stress-buffering effects of psychosocial resources on physiological and psychological stress response in pregnant women. *Biol Psychol* 2008;78(3):261-8.
- 31 Haririan H, Bertl K, Laky M, Rausch WD, Böttcher M, Matejka M, et al. Salivary and serum chromogranin A and α -amylase in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2012;83(10):1314-21.
- 32 Preeti L, Magesh K, Rajkumar K, Karthik R. Recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011;15(3):252-6.
- 33 Kim HI, Kim YY, Chang JY, Ko JY, Kho, HS. Salivary cortisol, 17 β -estradiol, progesterone, dehydroepiandrosterone, and α -amylase in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis* 2012;18(6):613-20.
- 34 Sánchez GA, Miozza V, Delgado A, Busch L. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2011;46(2):221-7.
- 35 Noto Y, Sato T, Kudo M, Kurata K, Hirota K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. *Anesth Analg* 2005;101(6):1873-6.
- 36 Grillon C, Duncko R, Covington MF, Kopperman L, Kling MA. Acute stress potentiates anxiety in humans. *Biol Psychiatry* 2007;62(10):1183-6.
- 37 Payne JD, Jackson ED, Hoscheidt S, Ryan L, Jacobs WJ, Nadel L. Stress administered prior to encoding impairs neutral but enhances emotional long-term episodic memories. *Learn Mem* 2007;14(12):861-8.
- 38 Holt-Lunstad J, Birmingham WA, Light KC. Influence of a “warm touch” support enhancement intervention among married couples on ambulatory blood pressure, oxytocin, alpha amylase, and cortisol. *Psychosom Med* 2008;70(9):976-85.

- 39 Ulrich-Lai YM, Herman J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(6):307-409.
- 40 Denniss AR, Young JA. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. *Pflugers Arch* 1978;376(1):73-80.
- 41 Liu W, Dan H, Wang Z, Jiang L, Zhou Y, Zhao M, et al. IFN-Gamma and IL-4 in saliva of patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Inflammation* 2009;32(3):176-81.
- 42 McCartan BE, Lamey PJ, Wallace AM. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996;25(7):357-9.
- 43 Picek P, Buljan D, Rogulj AA, Stipetić-Ovcariček J, Catić A, Plestina S, et al. Psychological status and recurrent aphthous ulceration. *Coll Antropol* 2012;36(1):157-9.
- 44 Porter SR, Scully C, Pedersen A. Recurrent aphthous stomatitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(3):306-21.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A ulceração aftosa recorrente é uma doença imunológica complexa cuja etiologia, embora pobremente compreendida, parece multifatorial. Alterações psicológicas como estresse e ansiedade têm sido estudadas em pacientes com aftas, uma vez que são frequentemente referidas pelos mesmos como fatores desencadeantes das lesões. Essas alterações modificam e promovem desregulação de funções imunes, causando desequilíbrio das citocinas Th1/Th2, com aumento da atividade Th1 (BORRA et al., 2004). O estresse e a ansiedade são responsáveis pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático, o qual regula a secreção da enzima alfa-amilase salivar. Esta enzima tem-se mostrado um biomarcador de ativação do SNA, podendo ser empregada de forma alternativa e não invasiva para avaliação dos níveis de estresse (GRANGER et al., 2007; NATER; ROHLEDER, 2009; KANG, 2010). Visando estabelecer possíveis fatores associados à UAR e sua relação com este biomarcador salivar, no presente estudo foram estudados a atividade da enzima AAS e variáveis psicológicas em pacientes com UAR, bem como o impacto que a doença provoca na qualidade de vida dos indivíduos.

A literatura aponta que diversos fatores podem promover elevação na liberação da AAS tais como prática de atividades físicas, estimulação gustativa ou mecânica durante a alimentação, estresse crônico e reacional, medicamentos anti-hipertensivos, antidepressivos, ansiolíticos, corticosteróides, betabloqueadores, tetraciclina ou analgésicos contendo cafeína (NATER; ROHLEDER, 2009). Por outro lado, hábitos como tabagismo e etilismo podem inibir sua atividade ou ocasionar uma produção deficiente da mesma (GOI et al., 2007; NATER; ROHLEDER, 2009). Enberg et al. (2001) evidenciaram que o consumo agudo do álcool causa diminuição

no fluxo salivar, resultando na produção deficiente de amilase. Para evitar vieses na análise da atividade da AAS, indivíduos fumantes e os que utilizassem os fármacos previamente mencionados foram excluídos do estudo. Além disso, dentre outras recomendações, os pacientes foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas por 24 horas antes de coletar a saliva.

Apesar dos critérios de exclusão e recomendações adotados, a atividade da enzima AAS apresentou ampla variabilidade entre os pacientes, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos UAR e controle. Resultados semelhantes foram observados por Kim et al. (2012) ao investigarem, dentre outros marcadores, a atividade da AAS em pacientes com a síndrome da ardência bucal. Os autores não encontraram diferenças nos níveis da enzima entre pacientes com a síndrome e controles, nem correlação significativa da AAS com sintomas psicológicos tais como ansiedade e depressão. Por outro lado, ao analisarem a AAS em pacientes com doença periodontal, Sánchez et al. (2011) observaram aumento da atividade enzimática. No entanto, foi sugerido que essa elevação pode estar relacionada ao estresse metabólico causado pela inflamação periodontal.

Visto que o estresse diário, em geral, é menor aos finais de semana, os pacientes do presente estudo foram instruídos a realizar as coletas de saliva entre segunda e quinta-feira. A literatura demonstra que os níveis de alfa-amilase diminuem nos primeiros 60 minutos após o despertar e aumentam durante o dia (NATER et al., 2007). Por esse motivo, as coletas foram realizadas duas vezes no mesmo dia e a fim de padronizá-las, determinaram-se os seguintes horários: entre 8 h e 9 h e entre 14 h e 17 h. Portanto, uma das coletas foi realizada próximo ao horário do despertar, no turno matutino e, a outra, à tarde, um período em que as pessoas em geral encontram-se sem se alimentar.

A literatura reporta que os níveis da AAS encontram-se aumentados sob situações de estresse antes que qualquer outro sinal clínico possa ser percebido (NATER et al., 2005; NIEROP et al., 2006; KANG, 2010). Isso ocorre, pois o estresse ativa o SNA simpático, que por meio da liberação de catecolaminas, provoca alterações rápidas no estado fisiológico (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A inervação simpática das glândulas salivares provoca vasoconstrição, com diminuição do fluxo salivar e aumento de compostos orgânicos e proteicos, principalmente de alfa-amilase. Essa resposta é de curta duração, em razão do reflexo da inervação parassimpática, levando à homeostasia (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Uma vez que no presente estudo as amostras de saliva foram coletadas até três dias após o surgimento das lesões, é possível que os níveis enzimáticos já não estivessem tão elevados. Desta forma, a AAS não parece ser um marcador salivar adequado de alterações psicológicas em pacientes com UAR.

Para investigação dos sintomas de ansiedade, foi utilizado o Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) e para investigação da presença de estresse, o Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp (ISSL). Ambos os questionários apresentam alta confiabilidade e podem ser aplicados tanto em pacientes psiquiátricos, quanto na população em geral (LIPP, 2000; CUNHA et al., 2001). Os testes psicométricos foram aplicados compreendendo o período máximo de três dias de evolução das lesões, permitindo assim resultados fidedignos em relação às alterações psicológicas apresentadas pelos pacientes. Os escores de ansiedade foram significativamente superiores nos pacientes do grupo UAR quando comparados aos indivíduos-controle. Quando a ansiedade foi categorizada observou-se que um percentual significativamente superior de pacientes com UAR apresentou níveis mais elevados desta alteração psicológica. Resultados

semelhantes foram obtidos por McCartan, Lamey e Wallace (1996), Soto-Araya, Rojas Alcayaga e Esguep (2004), Albanidou-Farmaki et al. (2008) e Gallo, Mimura e Sugaya (2009), ao avaliarem a ansiedade em pacientes com UAR. O percentual de pacientes com estresse também foi superior nos pacientes com afta, porém sem diferença significativa entre os grupos. Este fato pode ser explicado, uma vez que o estresse foi avaliado como variável dicotômica pelo ISSL. Além disso, devido aos inúmeros critérios de inclusão e exclusão adotados no presente estudo, a amostra foi constituída por 22 pacientes com afta, o que pode justificar a ausência de diferença significativa entre os grupos. Fatores psicológicos parecem desempenhar importante papel na manutenção da saúde dos tecidos orais (SOTO-ARAYA; ROJAS ALCAYAGA; ESGUEP, 2004). Por outro lado, é discutido na literatura se essas alterações psicológicas estão associadas à etiologia da UAR (REDWINE et al., 2003) ou desenvolvem-se como consequência da dor provocada pelas lesões. Segundo Picek et al. (2012), os distúrbios psicológicos não precedem o desenvolvimento das lesões e os pacientes são mais ansiosos devido ao desconforto causado pelas mesmas.

Em se tratando de qualidade de vida, os escores dos instrumentos WHOQOL-BREF e OHIP-14 demonstraram que as lesões aftosas causam impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. O WHOQOL-BREF é um instrumento de avaliação de qualidade de vida geral, composto por quatro domínios: físico, psicológico, relações sociais e meio-ambiente, totalizando 26 questões (FLECK et al., 2000). Quanto mais elevados os valores obtidos, melhor a qualidade de vida do paciente. Os escores dos domínios físico, psicológico, social e meio ambiente do inventário WHOQOL-BREF foram significativamente inferiores nos pacientes do grupo UAR. Os valores obtidos por meio do instrumento OHIP-14 foram significativamente

superiores nos pacientes deste grupo. No OHIP-14, instrumento de avaliação do impacto de condições bucais na qualidade de vida, os escores são obtidos por meio de pesos estabelecidos para cada pergunta. Quanto maior a pontuação alcançada, maior é o impacto negativo de uma determinada doença bucal na qualidade de vida (SILVA et al., 2010). Estes resultados corroboram os de Mumcu et al. (2007) que observaram pior qualidade de vida relacionada à saúde bucal em pacientes com UAR. Krisdapong, Sheiham, Tsakos (2012) também verificaram que as lesões prejudicaram alimentação, higiene e estabilidade emocional de crianças tailandesas, exercendo maior impacto na qualidade de vida desses pacientes.

Neste estudo a UAR foi mais prevalente em pacientes do gênero feminino com média de idade de 33,82 anos. Em 50% dos pacientes a doença teve início na infância. Esses resultados corroboram a literatura, uma vez que as lesões acometem preferencialmente o sexo feminino (PORTER; SCULLY; PEDERSEN, 1998; HULING et al., 2012) e as aftas menores, que representaram a totalidade dos casos, geralmente iniciam a desenvolver-se na infância (AKINTOYE; GREENBERG, 2005; CALDERÓN et al., 2008; CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011), podendo acometer pacientes em todas as faixas etárias (FRAIHA; BITTENCOURT; CELESTINO, 2002). As localizações mais prevalentes foram mucosa labial, ventre e bordas da língua, confirmando sua predileção por mucosa não ceratinizada (SOTO-ARAYA; ROJAS ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; AKINTOYE; GREENBERG, 2005; VOLKOV et al., 2005; GALLO; MIMURA; SUGAYA, 2009; CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011). Com relação aos fatores precipitantes, 41% dos pacientes não conseguiram relacionar o aparecimento das lesões com fatores desencadeantes. Em concordância com a literatura (AKINTOYE; GREENBERG, 2005), 36.3% associaram

o aparecimento das lesões ao estresse ou à ansiedade e 22.7% com hipersensibilidade alimentar (CALDERÓN et al; 2008).

Apesar de a UAR ser uma doença que não envolve maiores complicações à saúde, a mesma afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que as úlceras são bastante dolorosas e recidivantes. Neste estudo, observou-se que os pacientes acometidos pela doença em geral apresentam maiores níveis de ansiedade, evidenciando o possível envolvimento das alterações psicológicas na etiopatogenia da doença. Por outro lado, uma vez que não foi encontrada diferença significativa na atividade da AAS entre os grupos sugere-se que esta enzima não seja um marcador salivar eficaz em pacientes com UAR, pois sua liberação oscila rapidamente e pode ser influenciada por diversos fatores. Outros estudos são necessários para elucidar o papel das alterações psicológicas na etiopatogênese da afta.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Pacientes com aftas exibem escores superiores de ansiedade, evidenciando o possível envolvimento de alterações psicológicas na etiopatogenia da doença.
- A alfa-amilase salivar não demonstrou ser um marcador salivar associado à UAR, pois sua liberação oscila rapidamente e pode ser influenciada por diversos fatores .
- A UAR afeta negativamente a qualidade de vida dos indivíduos.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AKINTOYE, S.O.; GREENBERG, M.S. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.* v.49, n.1, p.31-47, Jan. 2005.

ALBANIDOU-FARMAKI, E. et al. Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tohoku J Exp Med.* v.214, n.4, p.291-6, Apr. 2008.

BORRA, R.C. et al. The Th1/Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med.* v.33, n.3, p.140-6, Mar. 2004.

BUÑO, I.J. et al. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor α , interleukins 2, 4 and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol.* v.134, n.7, p.827-31, July 1998.

CALDERÓN, P.E. et al. A possible link between cow milk and recurrent aphthous stomatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* v.22, n.7, p.898-9, July 2008.

CHATTOPADHYAY, A.; SHETTY, K.V. Recurrent aphthous stomatitis. *Otolaryngol Clin North Am.* v.44, n.1, p.79-88, Feb. 2011.

CHAVAN, M. et al. Recurrent aphthous stomatitis: a review. *J Oral Pathol Med.* v.41, n.8, p.577-83, Sep. 2012.

CUNHA, J.A. Manual das versões em português das escalas de Beck. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2001.

ENBERG, N. et al. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.92, n.3, p.292-8, Sep. 2001.

FLECK, M.P.A. et al. Application of the Portuguese version of the abbreviated instrument of quality life WHOQOL-bref. *Rev Saúde Pública* v.34, n.2, p.178-83, abr. 2000.

FRAIHA, P.M.; BITTENCOURT, P.G.; CELESTINO, L.R. Estomatite aftosa recorrente revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* v.68, n.4, p.571-8, jul/ago. 2002.

GALLO, C.B.; MIMURA, M.A.M.; SUGAYA, N.N. Psychological stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clinics.* v.64, n.7, p.645-8, 2009.

GIACOMINI, A. et al. Perfil hematológico e níveis de vitamina B12, ferro e ácido fólico de pacientes com ulceração aftosa recorrente. *RFO.* v.15, n.1, p.7-10, jan/abr. 2010.

GOI, N. et al. Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. *J Toxicol Sci.* v.32, n.2, p.121-7, May 2007.

GRANGER, D.A. et al. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci.* v.1098, p.122-44, Mar. 2007.

HULING, L.B. et al. Effect of stressful life events on the onset and duration of recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* v.41, n.2, p.149-52, Feb. 2012.

JURGE, S. et al. Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* v.12, n.1, p.1-21, Jan. 2006.

KANG, Y. Psychological stress-induced changes in salivary alpha-amylase and adrenergic activity. *Nurs Health Sci.* v.12, n.4, p.477-84, Dec. 2010.

KIM, H.I. et al. Salivary cortisol, 17 β -estradiol, progesterone, dehydroepiandrosterone, and α -amylase in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis.* v.18, n.6, p.613-20, Sep. 2012.

KRISDAPONG, S.; SHEIHAM, A.; TSAKOS, G. Impacts of recurrent aphthous stomatitis on quality of life of 12 and 15-year-old Thai children. *Qual Life Res.* v.21, n.1, p.71-6, Feb. 2012.

LALLA, R.V. et al. Multivitamin therapy for recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-masked, placebo-controlled trial. *J Am Dent Assoc.* v.143, n.4, p.370-6, Apr. 2012.

LEWKOWICZ, N. et al. Dysfunction of CD4+ CD25+ high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* v.37, n.8, p.454-61, Sep. 2008.

LIPP, M.E.N. Manual do inventário de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp (ISSL). São Paulo: Casa do Psicólogo; 2000.

MCCARTAN, B.E.; LAMEY, P.J.; WALLACE, A.M. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* v.25, n.7, p.357-9, Aug. 1996.

MUMCU, G. et al. The assessment of oral health-related quality of life by factor analysis in patients with Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* v.36, n.3, p.147-52, Mar. 2007.

NATER, U.M. et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol.* v.55, n.3, p.333-42, Mar. 2005.

NATER, U.M.; ROHLEDER, N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* v.34, n.4, p.486-96, May 2009.

NATER, U.M. et al. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology.* v.32, n.4, p.392-491, May 2007.

NIEROP, A. et al. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and attenuated salivary α -amylase responses to psychosocial stress in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* v.91, n.4, p.1329-35, Apr. 2006.

OGURA, M. et al. A case-control study on food intake of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.91, n.1, p.45-9, Jan. 2001.

OPPENHEIM, F.G. et al. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann NY Acad Sci.* v.1098, p.22-50, Mar. 2007.

PEREIRA, K.M.A. et al. Recurrent aphthous ulceration: a review of the present aspects. *Rev Odontol UNESP.* v.35, n.1, p.61-7, 2006.

PICEK, P. et al. Psychological status and recurrent aphthous ulceration. *Coll Antropol.* v.36, n.1, p.157-9, Mar. 2012.

PISKIN, S. et al. Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* v.16, n.1, p.66-7, Jan. 2002.

PINTO FILHO, J.M. et al. Etiology and treatment of recurrent aphthous ulceration: a systematic review. *Rev Fac Odontol Univ Fed Bahia.* v.34, p.39-66, 2007.

PORTER, S.R.; SCULLY, C.; PEDERSEN, A. Recurrent aphthous stomatitis. *Crit Rev Oral Biol Med.* v.9, n.3, p.306-21, 1998.

PREETI, L. et al. Recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Maxillofac Pathol.* v.15, n.3, p.252-6, Sep. 2011.

REDWINE, L. et al. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosom Med.* v.65, n.4, p.598-603, July/Aug. 2003.

SAMPAIO, N.; MELLO, S.; ALVES, C. Dental caries-associated risk factors and type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* v.27, n.1, p.152-7, 2011.

SÁNCHEZ, G.A. et al. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* v.46, n.2, p.221-7, Apr. 2011.

SAVAGE, N.W.; SEYMOUR, G.J.; KRUGER, B.J. T-lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* v.60, n.2, p.175-81, Aug. 1985.

SCANNAPIECO, F.A.; TORRES, G.I.; LEVINE, M.J. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res.* v.74, n.1, p.1360-6, July 1995.

SCULLY, C.; GORSKY, M.; LOZADA-NUR, F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: A consensus approach. *J Am Dent Assoc.* v.134, n.2, p.200-7, Feb. 2003.

SILVA, M.E. et al. Impact of tooth loss in quality of life. *Cien Saude Colet.* v.15, n.3, p.841-50, May 2010.

SOTO-ARAYA, M.; ROJAS ALCAYAGA, G.; ESGUEP, A. Association between psychological disorders and the presence of oral lichen planus, burning mouth syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *Med Oral.* v.9, n.1, p.1-7, Jan/Feb. 2004.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat Rev Neurosci.* v. 10, n.6, p.307-409, June 2009.

VOLKOV, I. et al. Case Report: Recurrent aphthous stomatitis responds to vitamin B12 treatment. *Can Fam Physician.* v.51, n.6, p.844-5, June 2005.

VORRASI, J. et al. Identification and characterization of amylase-binding protein C from *Streptococcus mitis* NS51. *Mol Oral Microbiol.* v.25, n.1, p.150-6, Apr. 2010.

WARDHANA; DATAU EA. Recurrent aphthous stomatitis caused by food allergy. *Acta Med Indones.* v.42, n.4, p.236-40, Oct. 2010.

WRAY, D.; GRAYKOWSKI, E.A.; NOTKINS, A.L. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *Br Med J,* v.283, n.6306, p.1569-70, Dec. 1981.

ZAKOWSKI, J.J.; BRUNS, D.E. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* v.21, n.4, p.283-322, 1985.



ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONCENTRAÇÕES SALIVARES DA ENZIMA ALFA-AMILASE E VARIÁVEIS EMOCIONAIS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em um estudo cujo objetivo é avaliar as concentrações de uma enzima (alfa-amilase) na saliva e características emocionais de pacientes com aftas e de pacientes que não apresentem esta doença. É importante que leia essas informações e o seu papel na pesquisa. Deixamos claro que a sua participação não é obrigatória, a qualquer momento o senhor(a) pode desistir de participar e retirar seu consentimento, sem qualquer restrição.

I – Com este estudo serão avaliadas as concentrações salivares da enzima alfa-amilase, bem como os níveis de estresse, ansiedade e qualidade de vida de pacientes com aftas e de pacientes que não apresentem essa doença.

II – Os participantes deste estudo deverão responder a questionários com perguntas sobre estresse, ansiedade e qualidade de vida. Além dos questionários, os pacientes serão submetidos a exame da boca e coleta de saliva para análise dos níveis de alfa-amilase. Serão fornecidos frascos para os pacientes e a coleta de saliva deverá ser realizada duas vezes no mesmo dia, entre 8h e 9h (antes do café da manhã) e entre 14h e 17h (antes do jantar), entre segunda e quinta-feira. Os frascos devem ser identificados para cada período de coleta e armazenados no congelador e serão recolhidos pela pesquisadora. Não haverá qualquer tipo de custo aos pacientes da pesquisa.

III – Antes de iniciar as coletas algumas orientações devem ser seguidas:

- não fazer ingestão de bebida alcoólica 24 horas antes;
- não ingerir alimentos ou bebidas, nem colocar qualquer substância na boca, inclusive não escovar os dentes, por no mínimo uma hora antes;
- não realizar exercícios físicos, nem consumir cafeína por no mínimo uma hora antes;
- não aplicar fármacos ou produtos cosméticos nos lábios (tais como batom, cremes ou manteiga de cacau);
- manter-se sentado e com os olhos abertos depositando a saliva no frasco pelo tempo necessário para que seja atingida a marca de 1,5ml.

IV – Os pacientes com afta deverão coletar a saliva quando estiverem com lesões, respeitando o limite de até 72 horas após o surgimento das mesmas.

Paciente

Pesquisador

V – Os riscos para os participantes da pesquisa são inexistentes, pois se trata de preenchimento de questionários, coleta de saliva e exame da boca.

VI – O objetivo deste estudo é relacionar aftas com os níveis salivares da enzima alfa-amilase e com os escores obtidos nos questionários de estresse, ansiedade e qualidade de vida para analisar alterações relacionadas ao aparecimento e remissão das aftas.

Pelo presente termo de consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação:

- dos procedimentos a que serei submetido;
- dos eventuais desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, todos acima citados;
- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu acompanhamento e tratamento;
- da segurança que não serei identificado, e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- do compromisso de fornecer informação atualizada durante o estudo;

As pesquisadoras responsáveis por esse projeto são a professora Dr^a Fernanda Gonçalves Salum e a cirurgiã-dentista Juliana Andrade Cardoso, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em / / .

Para qualquer esclarecimento ou dúvidas, antes e durante a pesquisa, posso entrar em contato com as pesquisadoras Prof^a. Dra. Fernanda Salum pelo fone (51)81829945 (responsável) ou com a Mestranda Juliana Andrade Cardoso, pelo fone (51) 81018300. Para qualquer pergunta sobre meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, através do fone (51)33203345.

Eu, _____, declaro que, após ler as informações acima e estar suficientemente esclarecido (a) estou plenamente de acordo com a realização do estudo. Assim, garanto minha colaboração e autorizo a minha participação, sendo responsável por ela.

DATA: _____ R.G: _____

ASSINATURA: _____

ANEXO B

INVENTÁRIO DE ANSIEDADE DE BECK (BECK ANXIETY INVENTORY – BAI)



Data: _____

Nome: _____ Estado Civil: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

Abaixo está uma lista de sintomas comuns de ansiedade. Por favor, leia cuidadosamente cada item da lista. Identifique o quanto você tem sido incomodado por cada sintoma durante a **última semana, incluindo hoje**, colocando um "x" no espaço correspondente, na mesma linha de cada sintoma.

	Absolutamente não 0	Levemente Não me incomodou muito 1	Moderadamente Foi muito desagradável mas pude suportar 2	Gravemente Difícilmente pude suportar 3
1. Dormência ou formigamento.				
2. Sensação de calor.				
3. Tremores nas pernas.				
4. Incapaz de relaxar.				
5. Medo que aconteça o pior.				
6. Atordoado ou tonto.				
7. Palpitação ou aceleração do coração.				
8. Sem equilíbrio.				
9. Aterrorizado.				
10. Nervoso.				
11. Sensação de sufocação.				
12. Tremores nas mãos.				
13. Trêmulo.				
14. Medo de perder o controle.				
15. Dificuldade de respirar.				
16. Medo de morrer.				
17. Assustado.				
18. Indigestão ou desconforto no abdômen.				
19. Sensação de desmaio.				
20. Rosto afofueado.				
21. Suor (não devido ao calor).				

"Traduzido e adaptado por permissão de The Psychological Corporation, U.S.A. Direitos reservados ©1991, a Aaron T. Beck. Tradução para a língua portuguesa. Direitos reservados ©1993 a Aaron T. Beck. Todos os direitos reservados."

Tradução e adaptação brasileira, 2001, Casa do Psicólogo® Livraria e Editora Ltda. BAI é um logotipo da Psychological Corporation.

QUADRO 1a

a) Marque com um F1 os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas.

- () 1. MÃOS E PÉS FRIOS
- () 2. BOCA SECA
- () 3. NÓ NO ESTÔMAGO
- () 4. AUMENTO DE SUDORESE
(Muito suor, suadeira)
- () 5. TENSÃO MUSCULAR
- () 6. APERTO DA MANDÍBULA/
RANGER OS DENTES
- () 7. DIARRÉIA PASSAGEIRA
- () 8. INSÔNIA
(Dificuldade para dormir)
- () 9. TAQUICARDIA
(Batedeira no peito)
- () 10. HIPERVENTILAÇÃO
(Respirar ofegante, rápido)
- () 11. HIPERTENSÃO ARTERIAL
SÚBITA E PASSAGEIRA
(Pressão alta)
- () 12. MUDANÇA DE APETITE

QUADRO 1b

b) Marque com um P1 os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas.

-
- () 13. AUMENTO SÚBITO DE
MOTIVAÇÃO
 - () 14. ENTUSIASMO SÚBITO
 - () 15. VONTADE SÚBITA DE
INICIAR NOVOS
PROJETOS

QUADRO 2a

a) Marque com um F2 os sintomas que tem experimentado na última semana.

- () 1. PROBLEMAS COM A MEMÓRIA
- () 2. MAL-ESTAR GENERALIZADO, SEM CAUSA ESPECÍFICA
- () 3. FORMIGAMENTO DAS EXTREMIDADES
- () 4. SENSAÇÃO DE DESGASTE FÍSICO CONSTANTE
- () 5. MUDANÇA DE APETITE
- () 6. APARECIMENTO DE PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS (Problemas de pele)
- () 7. HIPERTENSÃO ARTERIAL (Pressão alta)
- () 8. CANSAÇO CONSTANTE
- () 9. APARECIMENTO DE ÚLCERA
- () 10. TONTURA/SENSAÇÃO DE ESTAR FLUTUANDO

QUADRO 2b

b) Marque com um P2 os sintomas que tem experimentado na última semana.

- () 11. SENSIBILIDADE EMOTIVA EXCESSIVA (Estar muito nervoso)
- () 12. DÚVIDA QUANTO A SI PRÓPRIO
- () 13. PENSAR CONSTANTEMENTE EM UM SÓ ASSUNTO
- () 14. IRRITABILIDADE EXCESSIVA
- () 15. DIMINUIÇÃO DA LIBIDO (Sem vontade de sexo)

QUADRO 3a

a) Marque com um F3 os sintomas que tem experimentado no último mês.

- () 1. DIARRÉIA FREQUENTE
 () 2. DIFICULDADES SEXUAIS
 () 3. INSÔNIA
 (Dificuldade para dormir)
 () 4. NÁUSEA
 () 5. TIQUES
 () 6. HIPERTENSÃO ARTERIAL CONTINUADA
 (Pressão alta)
 () 7. PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS PROLONGADOS
 (Problemas de pele)
 () 8. MUDANÇA EXTREMA DE APETITE
 () 9. EXCESSO DE GASES
 () 10. TONTURA FREQUENTE
 () 11. ÚLCERA
 () 12. ENFARTE

QUADRO 3b

b) Marque com um P3 os sintomas que tem experimentado no último mês.

- () 13. IMPOSSIBILIDADE DE TRABALHAR
 () 14. PESADELOS
 () 15. SENSAÇÃO DE INCOMPETÊNCIA EM TODAS AS ÁREAS
 () 16. VONTADE DE FUGIR DE TUDO
 () 17. APATIA, DEPRESSÃO OU RAIVA PROLONGADA
 () 18. CANSAÇO EXCESSIVO
 () 19. PENSAR/FALAR CONSTANTEMENTE EM UM SÓ ASSUNTO
 () 20. IRRITABILIDADE SEM CAUSA APARENTE
 () 21. ANGÚSTIA/ANSIEDADE DIÁRIA
 () 22. HIPERSENSIBILIDADE EMOTIVA
 () 23. PERDA DO SENTIDO DE HUMOR

ANEXO D

**INVENTÁRIO WORLD HEALTH ORGANIZATION QUALITY OF LIFE –
ABREVIADO**

WHOQOL - ABREVIADO

Versão em Português

PROGRAMA DE SAÚDE MENTAL
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
GENEBRA

Coordenação do GRUPO WHOQOL no Brasil

Dr. Marcelo Pio de Almeida Fleck
Professor Adjunto
Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre – RS - Brasil

Instruções

Este questionário é sobre como você se sente a respeito de sua qualidade de vida, saúde e outras áreas de sua vida. **Por favor, responda a todas as questões** . Se você não tem certeza sobre que resposta dar em uma questão, por favor, escolha entre as alternativas a que lhe parece mais apropriada. Esta, muitas vezes, poderá ser sua primeira escolha.

Por favor, tenha em mente seus valores, aspirações, prazeres e preocupações. Nós estamos perguntando o que você acha de sua vida, tomando como referência as **duas últimas semanas** . Por exemplo, pensando nas últimas duas semanas, uma questão poderia ser:

	nada	muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	4	5

Você deve circular o número que melhor corresponde ao quanto você recebe dos outros o apoio de que necessita nestas últimas duas semanas. Portanto, você deve circular o número 4 se você recebeu "muito" apoio como abaixo.

	nada	muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	4	5

Você deve circular o número 1 se você não recebeu "nada" de apoio.

Por favor, leia cada questão, veja o que você acha e circule no número e lhe parece a melhor resposta.

		muito ruim	ruim	nem ruim nem boa	boa	muito boa
1	Como você avaliaria sua qualidade de vida?	1	2	3	4	5

		muito insatisfeito	insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	muito satisfeit o
2	Quão satisfeito(a) você está com a sua saúde?	1	2	3	4	5

As questões seguintes são sobre o quanto você tem sentido algumas coisas nas últimas duas semanas.

		nada	muito pouco	mais ou menos	bastant e	extremamente
3	Em que medida você acha que sua dor (física) impede você de fazer o que você precisa?	1	2	3	4	5
4	O quanto você precisa de algum tratamento médico para levar sua vida diária?	1	2	3	4	5
5	O quanto você aproveita a vida?	1	2	3	4	5
6	Em que medida você acha que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7	O quanto você consegue se concentrar?	1	2	3	4	5
8	Quão seguro(a) você se sente em sua vida diária?	1	2	3	4	5
9	Quão saudável é o seu ambiente físico (clima, barulho, poluição, atrativos)?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre **quão completamente** você tem sentido ou é capaz de fazer certas coisas nestas últimas duas semanas.

		nada	muito pouco	médio	muito	completamente
10	Você tem energia suficiente para seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
11	Você é capaz de aceitar sua aparência física?	1	2	3	4	5
12	Você tem dinheiro suficiente para satisfazer suas necessidades?	1	2	3	4	5
13	Quão disponíveis para você estão as informações que precisa no seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
14	Em que medida você tem oportunidades de atividade de lazer?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre **quão bem ou satisfeito** você se sentiu a respeito de vários aspectos de sua vida nas últimas duas semanas.

		muito ruim	ruim	nem ruim nem bom	bom	muito bom
15	Quão bem você é capaz de se locomover?	1	2	3	4	5

		muito insatisfeito	insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	muito satisfeito
16	Quão satisfeito(a) você está com o seu sono?	1	2	3	4	5
17	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade de desempenhar as atividades do seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
18	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade para o trabalho?	1	2	3	4	5
19	Quão satisfeito(a) você está consigo mesmo?	1	2	3	4	5
20	Quão satisfeito(a) você está com suas relações pessoais (amigos, parentes, conhecidos, colegas)?	1	2	3	4	5
21	Quão satisfeito(a) você está com sua vida sexual?	1	2	3	4	5
22	Quão satisfeito(a) você está com o apoio que você recebe de seus amigos?	1	2	3	4	5
23	Quão satisfeito(a) você está com as condições do local onde mora?	1	2	3	4	5

24	Quão satisfeito(a) você está com o seu acesso aos serviços de saúde?	1	2	3	4	5
25	Quão satisfeito(a) você está com o seu meio de transporte?	1	2	3	4	5

As questões seguintes referem-se a **com que frequência** você sentiu ou experimentou certas coisas nas últimas duas semanas.

		nunca	algumas vezes	frequentemente	muito frequentemente	sempre
26	Com que frequência você tem sentimentos negativos tais como mau humor, desespero, ansiedade, depressão?	1	2	3	4	5

Alguém lhe ajudou a preencher este questionário?.....

Quanto tempo você levou para preencher este questionário?.....

Você tem algum comentário sobre o questionário?

OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO

ANEXO E

INVENTÁRIO ORAL HEALTH IMPACT PROFILE-14 (OHIP-14)

Nome: _____

Idade: _____ Data: ____ / ____ / ____

REPRODUÇÃO DO "PERFIL DE IMPACTO NA SAÚDE ORAL" (OHIP14)²⁶

Nos últimos seis meses, por causa de problemas com seus dentes ou sua boca:	Nunca	Raramente	Às vezes	Repetidamente	Sempre
1. Você teve problemas para falar alguma palavra?					
2. Você sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?					
3. Você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?					
4. Você se sentiu incomodado(a) ao comer algum alimento?					
5. Você ficou preocupado(a)?					
6. Você se sentiu estressado(a)?					
7. Sua alimentação ficou prejudicada?					
8. Você teve que parar suas refeições?					
9. Você encontrou dificuldade para relaxar?					
10. Você se sentiu envergonhado(a)?					
11. Você ficou irritado(a) com outras pessoas?					
12. Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?					
13. Você sentiu que a vida, em geral, ficou pior?					
14. Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?					

ANEXO F

SALIVARY ALPHA-AMYLASE ASSAY KIT

SALIVARY α -AMYLASE ASSAY KIT

Catalog No. 1-1902, (Single) 96-Well Kit;
 1-1902-5, (5-Pack) 480 Wells

For Research Use Only

Intended Use

The Salimetrics™ salivary α -amylase assay kit is specifically designed and validated for the kinetic measurement of salivary α -amylase activity. It is not intended for diagnostic use. It is intended only for research use in humans and some animals. Please read the complete kit insert before performing this assay. For further information about this kit, its application, or the procedures in this insert, please contact the technical service team at Salimetrics or your local sales representative.

Introduction

Technical advances that make the assessment of biomarkers in saliva possible have enabled researchers to non-invasively study biosocial processes related to stress in naturalistic contexts. Much of the attention has focused on the activity of the limbic hypothalamic-pituitary-adrenal (LHPA) axis as indexed by individual differences and intra-individual change in salivary cortisol. Recently, it was suggested that the nearly exclusive focus of this endeavor on salivary cortisol may not enable researchers to adequately operationalize the psychobiology of the stress response (1). Physiologists have known for decades that the stress response has at least two principal components. One involves corticotropin-release hormone, activation of the LHPA axis, and the secretion of glucocorticoids (e.g., cortisol) into circulation. The second involves activation of the locus coeruleus/autonomic (sympathetic) nervous system and the release of catecholamines (e.g., norepinephrine) into the blood stream (2). Theorists argue that, to advance our understanding of how biological, social, and behavior processes interact to determine risk versus resilience, the next generation of studies will need to employ analytical models that operationalize both the behavioral and biological sides of the equations using multi-method and trait measurement approaches (1). Unfortunately, our ability to do so has been restricted because, in contrast to the highly sensitive, accurate, and valid measurement of LHPA products in saliva (i.e., cortisol, dehydroepiandrosterone), the non-invasive measurement of autonomic (sympathetic) nervous system activity in saliva (i.e., catecholamines) has been problematic (3).

In an attempt to overcome this problem, we conducted an extensive computerized literature search for potential surrogate markers of autonomic (sympathetic) nervous system activation that could be measured accurately in saliva. A substantial literature reveals that salivary α -amylase is a correlate of sympathetic activity under conditions of stress. Studies show that levels of salivary α -amylase increase under a variety of physically (i.e., exercise, heat and cold) and psychologically (i.e., written examinations) stressful conditions (4) in human subjects. Early studies showed that salivary α -amylase concentrations are predictive of plasma catecholamine levels, particularly norepinephrine (NE), and are highly correlated with NE changes in response to stress (4). However, more recent studies call this relationship into question (5,6). The literature does show that stress-related increases in salivary α -amylase can be inhibited by the adrenergic blocker propranolol (7,8) and also that beta-adrenergic agonists are capable of stimulating α -amylase release without increasing salivary flow (9, 10). This link suggests that the same stimuli that increase autonomic (sympathetic) arousal may activate sympathetic input to the salivary glands. Interestingly, several studies showed that cortisol levels did not in any way correlate with α -amylase during stress (1,4, 5), suggesting that individual differences in α -amylase represent a response to a stress signal independent of the LHPA axis. Studies show salivary α -amylase measurements may be employed as a non-invasive measure of autonomic (sympathetic) nervous system activation and are related to a variety of behavioral, social, health, and cognitive phenomena in human subjects (11-15).

Test Principle

This method utilizes a chromagenic substrate, 2-chloro-p-nitrophenol linked with maltotriose (16). The enzymatic action of α -amylase on this substrate yields 2-chloro-p-nitrophenol, which can be spectrophotometrically measured at 405 nm. The amount of α -amylase activity present in the sample is directly proportional to the increase in absorbance at 405 nm. For ease of use, the reaction is read in a 96-well microtiter plate with controls provided.

Precautions

1. Failure to follow kit procedure and recommendations for saliva collection and sample handling may result in false values.
2. Do not mix components from different lots of kits.
3. When using a multichannel pipette, α -amylase substrate solution should be added to duplicate wells at the same time, using the dispensing mode to avoid introducing bubbles into the wells.
4. See 'Material Safety Data' at the end of procedure.
5. Routine calibration of pipettes is critical for the best possible assay performance, and accurate timing is critical for correct assay results.
6. Cigarette use can be associated with lower alpha-amylase scores returned by this assay because acid aldehydes in cigarette smoke are capable of changing the function and/or structure of the alpha-amylase enzyme.
7. Caffeine and other exogenous substances with sympathomimetic properties may be associated with higher alpha-amylase levels.
8. Time since eating, and the use of alpha-amylase inhibitors are also likely to be associated with alpha-amylase levels.
9. Controls should be assayed once on each day of testing. Volume supplied in the kit is sufficient for testing on four different days.
10. Avoid microbial contamination of opened reagents. Salimetrics recommends using opened reagents within one month.
11. Protect the α -amylase substrate reagent from exposure to direct sunlight.

Storage

All components of this kit are stable at 2 - 8°C until the kit's expiration date.

Reagents

1. **α -Amylase Substrate:** 45 mL of a ready-to-use liquid preparation of 2-chloro-p-nitrophenol linked with maltotriose. Sodium azide, at 0.01%, is added as a preservative. Reagent warming trough is also provided.
2. **α -Amylase Controls:** One vial containing 100 μ L of a high level of salivary α -amylase activity and one vial containing 100 μ L of a low level of salivary α -amylase activity in a saliva-like matrix. Controls come pre-diluted. **Do not dilute.**
3. **α -Amylase Diluent:** 30 mL of a phosphate buffered solution containing a non-mercury preservative.

Materials Supplied

1. 96-well microtiter plate
2. Reagent warming trough

Materials Needed But Not Supplied

- Precision pipette to deliver* 8 μ L
 - Precision multichannel pipette to deliver* 320 μ L
 - Vortex
 - Plate reader with a 405 nm filter
 - Computer software for data reduction
 - Microcentrifuge tubes for sample dilutions
 - Pipette tips
 - Timer
 - Microtiter plate 37°C incubator/rotator (Needed for heating of substrate. We do not recommend heating the substrate in a 37°C incubator not specifically designed for microtitre plates.)
- *without employing "blow-out" mechanism

Specimen Collection

Collecting whole saliva samples from adults and children over 6 may be done by using the Salimetrics Oral Swab (SOS), P/N 5001.02, or by unstimulated passive drool. Infant samples may be collected with the Sorbette, P/N 5029, or cotton ropes, P/N 5016.00. Collection protocols are available on request. For accurate results Sorbettes and cotton collection materials should be completely saturated before removal. Do not add sodium azide to saliva samples as a preservative. Samples visibly contaminated with blood should be recollected.

Avoid sample collection within 60 minutes after eating a major meal or within 12 hours after consuming alcohol. Acidic or high sugar foods can compromise assay performance by acting as a substrate, lowering sample pH and influencing bacterial growth. To minimize these factors, rinse mouth thoroughly with water 10 minutes before sample is collected. Record the time and date of specimen collection. After collection it is important to keep samples cold, in order to avoid bacterial growth in the specimen. Refrigerate samples within 30 minutes, and freeze at or below -20°C within 4 hours after collection. (Samples may be stored at -20°C or lower for long term storage.)

Freezing saliva samples will precipitate the mucins. On day of assay, thaw completely, vortex, and centrifuge at 1500 x g (@3000 rpm) for 15 minutes. Avoid multiple freeze-thaw cycles. However, if samples have been refrozen, centrifuge again prior to assaying. Samples should be at room temperature before adding to assay plate. Pipette clear sample into appropriate wells. Particulate matter may interfere with the reaction, leading to inaccurate results.

Note: α -amylase concentrations in saliva from the parotid glands in the cheeks are higher than those found in pooled whole saliva from the floor of the mouth. We find that placing an SOS underneath the tongue on the floor of the mouth yields results similar to those from whole saliva collected by passive drool. We recommend this location for studies measuring α -amylase along with other analytes. Alternatively, if measuring α -amylase alone, the SOS may be used to collect samples of parotid saliva by placing it next to the cheek opposite the 2nd upper molar, where the duct from the parotid gland opens into the mouth. Unstimulated flow from the parotid glands is lower than from the submandibular glands in the floor of the mouth; if collecting parotid saliva, we recommend extending the collection time period in order to insure the collection of sufficient amounts of saliva.

Procedure

Bring all reagents to room temperature. It is recommended that samples be processed one strip at a time.

Step 1: Determine your plate layout. Here is a suggested layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl H	S - 7										
B	Ctrl L	S - 8										
C	S - 1	S - 9										
D	S - 2	S - 10										
E	S - 3	S - 11										
F	S - 4	S - 12										
G	S - 5	S - 13										
H	S - 6	S - 14										

Step 2: Keep the desired number of strips in the strip holder and return the remaining strips back to the bag.

Step 3: Set your plate reader to incubate at 37°C, and to read in center measurement kinetic mode initially at one minute, then again two minutes later. Choose the 405 nm filter with no reference filter. For plate readers without these options, incubation can take place in a plate incubator/rotator with manual movement of the plate into and out of the plate reader for the 1 minute and 3 minute readings. Kit validation was performed under these conditions.

Step 4: Saliva samples are to be diluted with the α -amylase diluent provided. Prepare a 1:10 dilution of the saliva by pipetting 10 μ L of saliva into 90 μ L α -amylase diluent. Mix well. Further dilute by pipetting 10 μ L of the 1:10 dilution into 90 μ L α -amylase diluent (1:20). Final dilution is 1:200. The remainder of the 1:10 dilution may be set aside in case a different final dilution is necessary.

Step 5: Heat the α -amylase substrate solution to 37°C in the trough provided, using a preheated microtiter plate incubator. Be sure reagent is thoroughly warmed and mixed before use. (A minimum warm-up time of 20 minutes, from room temperature, is recommended.) NOTE: *We do not recommend heating the substrate in a 37°C incubator not specifically designed for microtitre plates.*

Step 6: For accurate timing, test only one strip at a time. Add 8 μ L of controls (prediluted) and/or diluted saliva samples to individual wells. We strongly recommend reverse pipetting to avoid introducing any bubbles into the well.

Step 7: Add 320 μ L of preheated (37°C) α -amylase substrate solution to each well simultaneously using a multichannel pipette. Discard pipet tips to avoid reagent contamination. Do not return any of the α -amylase substrate solution left in the tips to the bulk tray once you have dispensed it into the wells. This could contaminate the bulk tray contents and affect any subsequent testing. Any well containing bubbles at the time of reading must be repeated.

Step 8: If reading kinetically in 37°C plate reader, immediately place plate in reader and start reader. Otherwise, follow these steps:

Start timer **immediately** and mix (500-600 RPM) at 37°C.

Read OD at **exactly** 1 minute and return to mixing at 37°C. **Save** 1 minute OD readings.

Read OD again at **exactly** 3 minutes. **Save** 3 minute OD readings.

Step 9 (all methods): Subtract the one minute readings from the three minute reading and multiply by the conversion factor (see below). The conversion factor takes the 1:200 sample dilution into account for the prediluted controls and samples.

It is convenient to set up an Excel spread sheet to subtract the ODs and multiply by the conversion factor. Results are expressed in U/mL.

Limitations

Samples that exceed 400 U/mL (linearity limit) should be rerun at a dilution of 1:400. Results should be multiplied by 2. Values too low to read at a 1:200 dilution can be rerun at a dilution of 1:100. Results should be divided by 2.

Calibration

This procedure is standardized using the millimolar absorptivity of 2-chloro-p-nitrophenol under the test conditions described.

Calculations

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{TV} \times \text{DF}}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/mL of } \alpha\text{-amylase activity in sample}$$

Where: $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ = Absorbance difference per minute
 TV = Total assay volume (0.328 mL)
 DF = Dilution factor
 MMA = Millimolar absorptivity of 2-chloro-p-nitrophenol (12.9)
 SV = Sample volume (0.008 mL)
 LP = Light path = 0.97 (specific to plate received with kit)

$$\frac{\Delta\text{Abs}/2 \times 0.328 \times 200}{12.9 \times 0.008 \times 0.97} = \Delta\text{Abs.} \times 328^* = \text{U/mL } \alpha\text{-amylase activity}$$

Example: If change in absorbance (OD change over 2 minutes) was 0.3, then $0.3 \times 328 = 98.4$ U/mL

*If using a Tecan plate reader and data capture by Assayzap software, multiply by 0.0328.

NOTE: Multiply value by 0.01667 to convert to SI Units (nKat/L)

Quality Control

The Salimetrics' high and low salivary α -amylase controls should be run with each assay. The control ranges established at Salimetrics are to be used as a guide. Each laboratory should establish its own range. Variations between laboratories may be caused by differences in techniques and instrumentation.

Expected Values*

Adult range, (n=75) mean = 92.4 U/mL
 Absolute range = 3.1 - 423.1 U/mL

*To be used as a guide only. Each laboratory should establish its own range.

α -Amylase Assay Performance Characteristics

A. Recovery:

Known quantities of amylase were added to five saliva samples containing different levels of endogenous amylase.

Sample	Endogenous (U/mL)	Added (U/mL)	Expected (U/mL)	Observed (U/mL)	Recovery (%)
1	72.18	65.19	137.37	134.73	98.1
2	123.97	77.09	201.06	224.43	111.6
3	103.28	10.01	113.29	109.37	96.5
4	29.99	6.72	36.71	40.96	111.6
5	42.01	3.14	45.15	39.44	87.4

B. Precision:

The intra-assay precision was determined from the mean of 10 replicates each.

Sample	N	Mean (U/mL)	Standard Deviation (U/mL)	Coefficient of Variation (%)
H	10	474.6	11.8	2.5
M	10	108.8	7.2	6.7
L	10	17.7	1.3	7.2

The inter-assay precision was determined from high and low α -amylase samples run in eight individual runs.

Sample	N	Mean (U/mL)	Standard Deviation (U/mL)	Coefficient of Variation (%)
H	8	166.0	6.0	3.6
L	8	10.6	0.6	5.8

C. Linearity of Dilution:

Two saliva samples were diluted with α -amylase diluent and assayed.

Sample	Dilution Factor	Expected (U/mL)	Observed (U/mL)	Recovery (%)
1			40.96	
	1:2	20.48	19.35	94.5
	1:4	10.24	9.76	95.3
	1:8	5.12	4.57	89.3
	1:16	2.56	2.13	83.2
2			1943.16	
	1:3	647.72	649.21	100.2
	1:9	215.91	224.64	104.0
	1:27	71.97	78.08	108.5

D. Sensitivity:

The lower limit of sensitivity is governed by the change in absorbance. A change in absorbance less than 0.01 will not result in a reliable value. Samples should be rerun at a higher concentration.

Material Safety Data***Hazardous Ingredients**

The substrate reagent contains potassium thiocyanate. *Poisonous*. Do not ingest. The substrate reagent contains 0.01% sodium azide as a preservative. Do not ingest. Explosive metal azides may form in copper or lead plumbing. Disposal requires large volumes of water to prevent the build up of azide.

We recommend the procedures listed below for all kit reagents. Specific kit component MSDS sheets are available from Salimetrics upon request.

Handling

Follow good laboratory procedures when handling kit reagents. Laboratory coats, gloves, and safety goggles are recommended. Wipe up spills using standard absorbent materials while wearing protective clothing. Follow local regulations for disposal.

Emergency Exposure Measures

In case of contact, immediately wash skin or flush eyes with water for 15 minutes. Remove contaminated clothing. If inhaled, remove individual to fresh air. If individual experiences difficulty breathing, give oxygen and call a physician.

*The above information is believed to be accurate but is not all-inclusive. This information should only be used as a guide. Salimetrics shall not be liable for accidents or damage resulting from contact with reagents.

References

- Granger, D.A., Kivlighan, K.T., El-Sheikh, M., Gordis, E., & Stroud, L.R. (in press). Assessment of salivary alpha-amylase in biobehavioral health. In L.J. Luecken and L. Gallo (eds.), *Physiological research methods in health psychology*, Sage.
- Chrousos, G.P., & Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. *Journal of the American Medical Association*, 267, 1244-1252.
- Kirschbaum, C., Read, G.F., & Hellhammer, D.H. (1994). *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*. Göttingen: Hogrefe & Huber.

- Chatterton, R.T., Vogelsong, K.M., Lu, Y., Ellman, A.B., & Hudgens, G.A. (1996). Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology*, 16, 433-448.
- Rohleder, N., Nater, U.M., Wolf, J.M., Ehlert, U., & Kirschbaum, C. (2004). Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase. An indicator of sympathetic activity? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032, 258-263.
- Nater, U.M., Rohleder, N., Scholatz, W., Nakkas, C., Kirschbaum, C., & Ehlert, U. (2006). Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 49-58.
- Speirs, R.L., Herring, J., Cooper, D., Hardy, C.C., & Hind, C.R.K. (1974). The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Archives of Oral Biology*, 19, 747-752.
- Van Stegeren, A., Rohleder, N., Everaerd, W., & Wolf, O.T. (2006). Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: Effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 137-141.
- Gallacher, D.V., & Petersen, O.H. (1983). Stimulus-secretion coupling in mammalian salivary glands. *International Review of Physiology*, 28, 1-52.
- Rohleder, N., Wolf, J.M., Maldonado Montero, E.F., & Kirschbaum, C. (2006). The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology*, 43, 645-52.
- Granger, D. A., Kivlighan, K. T., Blair, C., El-Sheikh, M., Mize, J., Lisonbee, J.A., Buckhalt, J. A., Stroud, L. R., Handwerger, K., & Schwartz, E. B. (2006). Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships. *Journal of Personal and Social Relationships*, 23, 267-290.
- El-Sheikh, M., Buckhalt, J., Granger, D.A., & Mize, J. (2006). *Salivary alpha amylase and cortisol: Their association with children's adjustment, health, sleep, and cognitive functioning*. (Paper presented at the biennial meeting of the Society for Research on Adolescence). San Francisco, CA.
- Susman, E.J., Granger, D.A., Dockray, S., Heaton, J., & Dorn, L.D. (2006). *Alpha amylase, timing of puberty and disruptive behavior in young adolescents: A test of the attenuation hypothesis*. (Paper presented at the biennial meeting of the Society for Research on Adolescence). San Francisco, CA.
- Stroud, L.R., Handwerger, K., Granger, D.A., Solomon, C., Kivlighan, K.T., & Niaura, R. (2006). *Alpha amylase responses to achievement and interpersonal stressors over adolescence: Developmental differences and associations with cortisol and cardiovascular responses*. (Paper presented at the biennial meeting of the Society for Research on Adolescence). San Francisco, CA.
- Gordis, E.B., Granger, D.A., Susman, E. J., & Trickett, P.K. (2008). Salivary alpha amylase and cortisol responses to social stress among maltreated and comparison youth. *Hormones and Behavior*, 53, 96-103.
- Wallenfels, K., Foldi, P., Niermann, H., Bender, H., Linder, D. (1978). The enzymic synthesis, by transglucosylation of a homologous series of glycosidically substituted malto-oligosaccharides, and their use as amylase substrates. *Carbohydrate Research*, 61, 359-368.

Seller's Limited Warranty

"Seller warrants that all goods sold hereunder will be free from defects in material and workmanship. Upon prompt notice by Buyer of any claimed defect, which notice must be sent within thirty (30) days from date such defect is first discovered and within three months from the date of shipment, Seller shall, at its option, either repair or replace the product that is proved to Seller's satisfaction to be defective. All claims should be submitted in written form. This warranty does not cover any damage due to accident, misuse, negligence, or abnormal use. Liability, in all cases, will be limited to the purchased cost of the kit.

It is expressly agreed that this limited warranty shall be in lieu of all warranties of fitness and in lieu of the warranty of merchantability. Seller shall not be liable for any incidental or consequential damages that arise out of the installation, use or operation of Seller's product or out of the breach of any express or implied warranties."

ANEXO G

PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 25 de Agosto de 2011

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0049/11
Intitulado: Concentrações salivares da enzima α -amilase e variáveis emocionais em pacientes com ulceração aftosa recorrente.
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum
Pesquisadores Associados: Juliana Andrade Cardoso
Nível: Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 25 de Agosto de 2011.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS.

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO H

PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
PUCRS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP-1467/11

Porto Alegre, 15 de setembro de 2011.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05581 intitulado **"Concentrações salivares da enzima α -amilase e variáveis emocionais em pacientes com ulceração aftosa recorrente"**

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Virginia Minghelli Schmitt
Coordenadora Substituta do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Fernanda Gonçalves Salum
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep



APÉNDICES

APÊNDICE A

FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA nº _____ DATA ____/____/____

Paciente: () Grupo caso () Grupo controle

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....
 Endereço:.....
 Bairro:..... Cidade:..... CEP:.....
 Telefone residencial:..... Celular:.....
 Raça:..... Sexo: () Masculino () Feminino
 Data de nascimento:..... Idade:..... anos
 Nº do registro no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital São Lucas da PUCRS.....

ANAMNESE

1. História médica

2. Consumo de Álcool () Não () Sim

3. Usa medicações? () Não () Sim Quais?

4. Com que frequência você tem aftas?

- (1) Sem histórico conhecido de aftas
- (2) Menos de uma vez por mês
- (3) Mais de 1 vez por mês

PARA O GRUPO-CASO

5. Há quanto tempo (meses ou anos) apresenta aftas?

6. Você associa o aparecimento de suas aftas com alguma causa (alimentos, medicamentos, etc)?

() Não () Sim. Quais?

7. Você utiliza algum medicamento (pomada, bochecho, etc) para alívio dos sintomas?

() Não () Sim. Quais?

EXAME FÍSICO

- Localização, tamanho (cm), duração, classificação:

INSTRUMENTOS:

Ansiedade (BAI)
Estresse (ISSL)
Qualidade de vida (Whoqol-BREF).....
Qualidade de vida (OHIP-14)

CONCENTRAÇÕES SALIVARES**Manhã**

α -amilase (medidas em U/mL)

Tarde

α -amilase (medidas em U/mL)

APÊNDICE B**CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO****SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS NON-INVASIVE ALTERNATIVE FOR
EVALUATION OF STRESS LEVELS – A REVIEW**

De: nhs@yamaguchi-u.ac.jp por manuscriptcentral.com

Para: juliandradec@gmail.com

Data: 16 de janeiro de 2013 15:07

Assunto: Nursing and Health Sciences - Manuscript ID NHS-0017-2013

Enviado por: manuscriptcentral.com

16-Jan-2013

Dear Miss Cardoso:

Your manuscript entitled "SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS NON-INVASIVE ALTERNATIVE FOR EVALUATION OF STRESS LEVELS – A REVIEW" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Nursing and Health Sciences.

Your manuscript ID is NHS-0017-2013.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the Editorial Office for questions. If there are any changes in your contact details or address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/nhs> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/nhs> .

Thank you for submitting your manuscript to Nursing and Health Sciences.

Yours sincerely,
Editorial Office, Nursing and Health Sciences
nhs@yamaguchi-u.ac.jp

APÊNDICE C**CARTA DE SUBMISSÃO ARTIGO DE PESQUISA****SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS**

De: Archives of Oral Biology AOB@elsevier.com

Para: juliandradec@gmail.com

Data: 24 de janeiro de 2013

Assunto: Submission Confirmation for SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Enviado por: AOB@elsevier.com

Archives of Oral Biology

Title: SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Authors: Juliana Andrade Cardoso; André A Santos Junior; Maria Lucia T Nunes; Maria Antonia Z Figueiredo; Karen Cherubini; Fernanda G Salum

Article Type: Original Paper

Dear Mrs. Juliana Andrade Cardoso,

Your submission entitled "SALIVARY ALPHA-AMYLASE ENZYME, PSYCHOLOGICAL DISORDERS AND LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS" has been received by Archives of Oral Biology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/aob/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

(On behalf of the Editors)

Archives of Oral Biology

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com