



Facultad de Enfermería de Valladolid
Grado en Enfermería
Trabajo Fin de Grado
Curso 2018/2019

Biomarcadores de estrés en saliva y en pelo

Alumno: Javier Gutiérrez Redondo
Tutor: Eva Sobas Abad

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: los biomarcadores son una serie de características que sirven como indicadores de un proceso y que son medidas de manera objetiva. Centrándonos en el estrés y el dolor, existen una serie de biomarcadores localizados en la saliva y el pelo, que podrían servir como herramienta de gran interés para el tratamiento del paciente.

JUSTIFICACIÓN: la importancia del uso de estos biomarcadores como herramienta de trabajo en la práctica clínica radica principalmente en el beneficio del paciente; tanto por la posibilidad de realizar una evaluación no invasiva, objetiva y un tratamiento precoz, como por poder individualizar el tratamiento y los cuidados de Enfermería

OBJETIVOS: determinar si los biomarcadores de estrés en saliva y pelo son un instrumento adecuado para la cuantificación objetiva de los niveles de estrés; así como establecer qué biomarcadores en concreto son los más útiles para ese propósito.

MATERIAL Y MÉTODOS: se realizó una búsqueda bibliográfica entre diciembre del 2018 y febrero del 2019 en bases de datos y revistas científicas de impacto, encontrando un total de 26 artículos; de los cuales se excluyeron 10 por cumplir alguno de los criterios de exclusión establecidos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: los biomarcadores de estrés en saliva y pelo pueden ser una herramienta útil y fiable para el abordaje objetivo de los niveles de estrés, siendo el cortisol el biomarcador más empleado. Se determina que el análisis de biomarcadores en pelo es útil para el estudio retrospectivo del estrés crónico. Es necesaria más investigación para conocer el rol exacto del resto de biomarcadores.

PALABRAS CLAVE: biomarcadores, estrés, saliva, pelo.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. ESQUEMA P.I.C.O.T.	6
5. OBJETIVOS	7
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
7. DESARROLLO	10
7.1 DIAGRAMA DE FLUJO	10
7.2 TABLA RESUMEN DE ARTÍCULOS NO INCLUIDOS	11
8. DISCUSIÓN.....	18
8.1 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	23
8.2 APLICABILIDAD A LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	25
8.3 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	26
9. CONCLUSIONES.....	27
10. BIBLIOGRAFÍA	28

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AAs: Alfa Amilasa Salivar

DHEA: Dehidroepiandrosterona

HCC. concentración capilar de cortisol.

HPA: eje hipotalámico–pituitario–adrenocortical

IgAs: Inmunoglobulina A secretora

SAM: eje simpático-adrenal-medular

sRIITNF α : Fracción Soluble del Receptor II del Factor de Necrosis Tumoral α

TMD: desorden temporo-mandibular

TSST: Trier Social Stress Test

11B-HSD: 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

1. INTRODUCCIÓN

Los biomarcadores son una serie de características medidas de manera objetiva y evaluadas como indicadores de un proceso, ya sea un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta a una intervención terapéutica¹. Para que un biomarcador sea considerado una herramienta de utilidad debe de cumplir una serie de características², relacionadas con:

- Recogida de las muestras: la muestra para análisis debe ser fácil de recolectar, y debe pertenecer a fluidos periféricos del cuerpo, como por ejemplo sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva.
- Cuantificación: que sean fáciles de cuantificar y analizar.
- Estabilidad: estable en condiciones basales. Se debe tener en cuenta las posibles fluctuaciones debido a la hora del día o los niveles de estrés.
- Especificidad: producido principalmente a través de una única secuencia metabólica.
- Sensibilidad: que demuestre ser susceptible a los cambios que se produzcan en la condición biológica que queremos estudiar e identifique de manera correcta e inequívoca los casos positivos.

Por otro lado, es fundamental que el biomarcador proporcione una información clínica de relevancia para la población general y para los investigadores; y que tenga validez, es decir, que resulte efectivo o útil para el estudio³. Dentro de todas las posibles aplicaciones a la práctica clínica de los biomarcadores, como por ejemplo servir de herramienta para identificar pacientes afectados por una enfermedad, o para determinar el estadio y extensión de la misma; su utilidad para predecir y monitorizar la respuesta del individuo a una intervención terapéutica va a ser lo que nos resulte de mayor interés para nuestro estudio¹.

El objetivo último de un biomarcador es proporcionar una información útil y aplicable a la práctica clínica que nos permita mejorar los cuidados del paciente, y por lo tanto su calidad de vida en el transcurrir de la enfermedad.

El estrés se entiende como la respuesta de nuestro organismo a una situación de presión, situaciones inesperadas o amenazas, y trae consigo un conjunto de reacciones emocionales desagradables como la ansiedad o la tristeza⁴. Esto

tiene una relación directa con la salud y por lo tanto con el dolor. El dolor es de por sí una situación potencialmente estresante; y en relación con él se han detectado una serie de biomarcadores que resultan de interés, y en los que vamos a centrar esta revisión bibliográfica. Estos son: cortisol salival, alfa amilasa salivar (AAS), inmunoglobulina A secretora (IgAs), testosterona y la Fracción Soluble del Receptor II del Factor de Necrosis Tumoral α (sRIITNF α)⁵.

Un estudio clínico realizado en el año 2016 con individuos sanos⁵ muestra que solo la IgAs y la sRIITNF α presentan niveles aceptables de reproducibilidad en sujetos sanos para ser usados como potenciales biomarcadores para medir la existencia de dolor. Además, la variabilidad inter-sesión es relativamente uniforme para la IgAs y para la sRIITNF α . Este estudio proporciona los criterios para diferenciar cuáles son los cambios reales en los biomarcadores y las variaciones inter-sesión esperables en su medición. Sin embargo, serían necesarios más estudios clínicos para validar y ampliar estos resultados y poder establecer los patrones normales y su variabilidad inter e intra individual.

Por otro lado, en el mismo año se realizó un estudio basado en el análisis de la testosterona salivar⁶ como biomarcador de estrés en alumnos de medicina, relacionándolo con el estrés psicológico, el trastorno de pensamiento obsesivo y 5 rasgos diferentes de la personalidad. Como conclusión de este estudio se determinó que los niveles de testosterona salivar en situaciones de estrés varían según el género, aumentando en los varones y disminuyendo en las mujeres, por lo que puede ser utilizado como biomarcador. Además, se estableció que la respuesta biológica al estrés, centrándose en el caso de la testosterona salivar, se ve totalmente influenciada por las características de la personalidad del individuo.

Un estudio realizado en el año 2018 con niños enfermos críticos⁹ determinó que el análisis de ciertos biomarcadores salivares de estrés como el cortisol, la AAS y la IgAs podría resultar un método no invasivo, fácil de realizar, de bajo coste y muy apropiado para identificar niveles severos de estrés en niños enfermos, permitiendo guiar las intervenciones clínicas hacia una mejora de la calidad de vida de la población infantil. Sin embargo, este estudio concluye en la

necesidad de establecer unos niveles normativos de estos biomarcadores que permitan describir los cambios que produce el estrés agudo en el organismo.

Una de las limitaciones que se encuentran al medir biomarcadores de estrés en saliva es que solo son útiles para medir el estrés en un periodo de tiempo limitado y no pueden detectar el estrés retrospectivamente. Añadiendo que algunos de ellos, como el cortisol, se ven influenciados por el ritmo circadiano. Los investigadores han estado buscando alternativas que permitiesen superar estas limitaciones y analizar de manera no invasiva y de forma retrospectiva el cortisol, porque es uno de los glucocorticoides más estudiados que están implicados en la respuesta con el estrés. Recientemente, un nuevo modelo se ha desarrollado para medir el cortisol en pelo. Entre las múltiples ventajas que puede ofrecer, la principal es que es una ventana al pasado reciente del individuo. Considerando que el pelo crece 1 cm por mes, el centímetro más cercano al cuero cabelludo refleja la producción de cortisol del último mes, el segundo centímetro más proximal correspondería al siguiente mes y así sucesivamente. Por lo tanto, recogiendo 3 cm de pelo se puede obtener el cortisol acumulado como un indicador de la activación del HPA durante los tres meses previos¹⁰.

En el año 2017, un estudio realizado en China con personas afectadas por el VIH⁷ demostró, a través de muestras de pelo y de cuestionarios de evaluación psicológica (que incluían ítems para evaluar la ansiedad, el estrés percibido, la depresión...), que los niveles de hormonas esteroideas en pelo, en concreto cortisol y DHEA, están totalmente relacionados con el aumento de los niveles de estrés, y por lo tanto pueden ser utilizados como biomarcadores.

Otro estudio realizado también durante el año 2017 en Puerto Rico⁸ dirigido a determinar la viabilidad de la recogida de biomarcadores para el análisis de la relación entre el VIH y el estrés crónico en mujeres transexuales, determinó la potencial utilidad del cortisol salivar y capilar como herramienta para el abordaje del estrés, y por lo tanto la mejora de la calidad de vida en las mujeres transexuales.

El denominador común que comparten la mayoría de los estudios realizados hasta ahora es que el uso de biomarcadores en saliva y pelo podría resultar una manera de evaluación objetiva, de fácil ejecución, de bajo coste e indolora de los niveles de estrés. Sin embargo, en la mayoría de los casos su uso no se ha implantado todavía en la práctica clínica.

El propósito de este trabajo es fundamentar que el uso de biomarcadores de estrés en saliva y pelo es la mejor estrategia para la determinación más exacta y objetiva de los niveles de estrés de todas aquellas personas que sufran una patología que pueda estar influenciada o relacionada con él, de tal forma que, al realizar una cuantificación más ajustada, se permitiría un abordaje más adecuado, abarcando la totalidad de las necesidades de la persona. Por otro lado, esto ayudaría a que la intervención se realizase de una manera precoz, evitando la posible progresión de la enfermedad a un estadio más grave, y por lo tanto mejorando la calidad de vida del paciente.

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han publicado numerosos estudios que ponen de manifiesto la relación existente entre el estrés y diferentes patologías. Todas ellas se ven influenciadas negativamente, dificultando que el paciente se recupere o que, al menos, pueda mantener una calidad de vida aceptable. Además, en muchos de los casos ese estrés se puede ver acompañado por ansiedad⁷ u otros trastornos psiquiátricos⁶, que agravan potencialmente el estado de salud del paciente, haciendo que el abordaje sea mucho más complejo. La importancia de la implantación del uso de los biomarcadores de estrés como herramienta de trabajo en la práctica clínica radica principalmente en el beneficio al paciente:

- Su uso permitiría, en primer lugar, un ajuste personalizado del tratamiento y de los cuidados de enfermería, en función de los niveles de estrés que sean determinados por el análisis de los biomarcadores. Esto favorecería que el tratamiento sea más efectivo, e incluso podría reducir los costes para el paciente en medicamentos o pruebas innecesarias.
- Además, el hecho de realizar el estudio de los biomarcadores de estrés en saliva y pelo supondría de por sí una manera de intervenir en el paciente de forma no invasiva, fácil de llevar a cabo y que nos proporcionaría unos resultados que se ajustan de una manera muy aproximada a la situación de salud real.
- Por otro lado, la utilización de los biomarcadores permitiría determinar el nivel de progresión en el que se encuentra la patología de una manera rápida, por lo que se podría actuar sobre ella mucho antes, evitando un posible empeoramiento, y por lo tanto una pérdida de bienestar.

Es por ello que se pretende investigar si los biomarcadores de estrés en saliva y en pelo sirven de manera inequívoca como herramienta de evaluación, intervención e incluso diagnóstico del estrés, incorporándolos a la práctica clínica habitual; y por otro lado establecer que biomarcadores son los más apropiados para la identificación del estrés tanto en saliva como en pelo entre los estudiados hasta ahora, así como determinar la posible existencia de nuevos biomarcadores que deban ser analizados con más profundidad.

3. HIPÓTESIS

Los biomarcadores de estrés en saliva y en pelo resultan una herramienta de gran utilidad y fiabilidad para la evaluación objetiva de los niveles de estrés, permitiendo un abordaje precoz del mismo a través de cuidados específicos de Enfermería.

4. ESQUEMA P.I.C.O.T.

El esquema P.I.C.O.T. ha servido como herramienta para la formulación de la pregunta de investigación que ha dado lugar a este trabajo: ¿es el análisis de los biomarcadores de estrés en saliva y pelo la estrategia más adecuada para la evaluación y cuantificación del estrés?

Tabla 1. Esquema P.I.C.O.T.

P (pacientes)	Artículos sobre los biomarcadores en estrés en saliva y pelo.
I (intervención)	Búsqueda bibliográfica en bases de datos (Pubmed, Dialnet...).
C (comparador)	No procede.
O (resultado)	Biomarcadores, estrés, saliva, pelo, melatonina.
T (tiempo)	3 meses.

5. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si los biomarcadores de estrés en saliva y pelo son un instrumento adecuado para la cuantificación objetiva de los niveles de estrés reales de los pacientes, a través de una revisión bibliográfica de la evidencia científica publicada hasta el momento.

ESPECÍFICOS

Establecer qué biomarcadores son los más fiables para la medición del estrés, dentro del conjunto de biomarcadores que han sido estudiados previamente.

Demostrar la posible utilidad de biomarcadores de reciente aparición, que podría dar lugar a nuevas líneas de investigación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO

Se ha realizado una revisión bibliográfica integradora¹¹ y cualitativa de artículos y documentos sobre los biomarcadores de estrés en saliva y pelo, recurriendo a diversas bases de datos y revistas de investigación en ciencias de la salud.

6.2 ESTRATEGIA DE BÚSQÜEDA

Para la realización de esta revisión bibliográfica, se ha realizado una búsqueda en diversas bases de datos, así como revistas científicas de impacto, a lo largo de los meses de Diciembre del 2018, y Enero y Febrero del año 2019. Éstas son:

- Pubmed: se han utilizado los descriptores MESH biomarkers, stress, cortisol, saliva, hair, cortisol saliva; y como operador booleano se ha utilizado AND.
- Dialnet: se buscaron: “biomarcadores de estrés en saliva y pelo” y “retinitis pigmentosa”
- Cochrane Plus: se introdujeron las palabras claves biomarcadores, estrés y saliva, sin resultados satisfactorios.
- Google Academic: se buscó con los mismos parámetros que en la búsqueda en Dialnet.
- Wiley Online Library: accediendo a través del servicio de la biblioteca online de la Universidad de Valladolid, se introdujo en el buscador “stress biomarkers in saliva”.
- Plos One: se utilizó como parámetro de búsqueda “salivary biomarkers of stress”.
- CSIC: se buscaron artículos que contuviesen las siguientes palabras en el título: biomarcadores de estrés y biomarcadores salivales de estrés; sin obtener resultados satisfactorios. La búsqueda fue exitosa al introducir las mismas palabras clave en inglés: “salivary biomarkers of stress”.
- Scopus: se introdujo en el buscador las palabras clave “salivary biomarkers” y “stress”, utilizando como operador booleano AND.

Además, como filtros se establecieron el año (2012 como año máximo de antigüedad), el idioma (inglés y español) y que fueran artículos de acceso abierto.

6.3 ESTRATEGIA DE SELECCIÓN

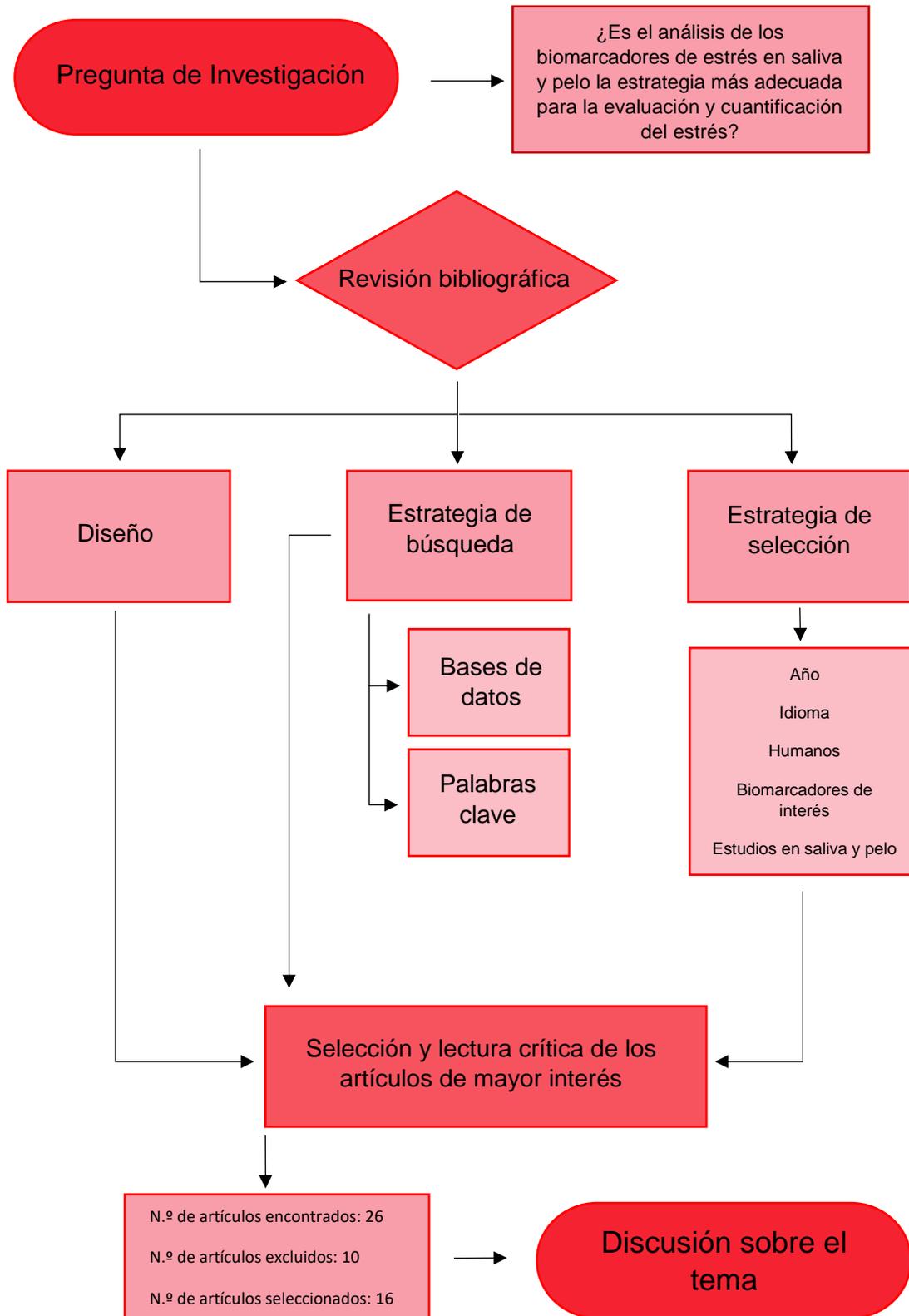
Una vez realizada una primera búsqueda bibliográfica y documental, aplicando los filtros de búsqueda indicados en el apartado anterior, se realizó una lectura crítica y se establecieron una serie de criterios, con el objetivo de cribar y determinar qué artículos son los que más se ajustan a los intereses del estudio:

- Año de publicación: se estableció como año de publicación válido desde el 2012 hasta la actualidad.
- Idioma: tanto en castellano como en inglés.
- Humanos: los artículos deben estar basados en estudios realizados única y exclusivamente con humanos.
- Universales: no habrá restricciones en cuanto a género, edad o raza en la selección de los artículos para la revisión.
- Biomarcadores: los artículos deben centrarse en ensayos clínicos que estudien solo unos biomarcadores en concreto: cortisol, AAS, IgAs, testosterona y sRIITNF α II.
- Saliva y pelo: el estudio de esos biomarcadores se debe realizar solo en saliva, pelo o ambos, no en otros fluidos o tejidos corporales.

7. DESARROLLO

7.1 DIAGRAMA DE FLUJO

Figura 1. Diagrama de flujo que representa el desarrollo de esta revisión bibliográfica.



7.2 TABLA RESUMEN DE ARTÍCULOS NO INCLUIDOS

Una vez definidos los criterios de exclusión, se realizó una búsqueda documental exhaustiva y se descartaron los siguientes artículos, del total seleccionado:

Tabla 2. Artículos excluidos para la realización del estudio

Artículo excluido	Motivo de exclusión
Torrente, P., Machancoses, F. H., Pallarés, J., Rosel, J. F., Canales, J. J., Puchol, S., & Jara, P. (2019). Intensive longitudinal modelling predicts diurnal activity of salivary alpha-amylase. <i>Plos One</i> , 14(1), e0209475.	No es un ensayo clínico
Silva, R. P. M., Valenti, V. E., Penha-Silva, N., Barros, C. L. M., Garner, D. M., Mendes, T. T., ... de Abreu, L. C. (2019). The influence of a hot environment on physiological stress responses in exercise until exhaustion. <i>Plos One</i> , 14(2), e0209510. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209510	Utiliza sangre en lugar de pelo como muestra para el análisis
Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. <i>Psychoneuroendocrinology</i> , 34(2), 163–171.	Año de publicación (2009)
Lennartsson, A. K., Theorell, T., Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., & Jonsdottir, I. H. (2013). Perceived Stress at Work Is Associated with Lower Levels of DHEA-S. <i>PLoS ONE</i> , 8(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072460	Utiliza sangre como muestra para el análisis
Silva, A. M. B., & Enumo, S. R. F. (2014). Estresse em um fio de cabelo: revisão sistemática sobre cortisol capilar. <i>Avaliação Psicológica</i> , 13(2), 203–211. Retrieved from file:///scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04712014000200008&lang=pt	Es una revisión sistemática en portugués

Artículo excluido	Motivo de exclusión
<p>Leicht, C. A., Goosey-Tolfrey, V. L., & Bishop, N. C. (2018). Exercise intensity and its impact on relationships between salivary immunoglobulin A, saliva flow rate and plasma cortisol concentration. <i>European Journal of Applied Physiology</i>, 118(6), 1179–1187. https://doi.org/10.1007/s00421-018-3847-6</p>	<p>Recoge muestras de saliva y plasma para el análisis de los biomarcadores</p>
<p>Noto, Y., Sato, T., Kudo, M., Kurata, K., & Hirota, K. (2005). The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: A pilot study. <i>Anesthesia and Analgesia</i>, 101(6), 1873–1876. https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000184196.60838.8D</p>	<p>Año de publicación (2005)</p>
<p>Llonch, L., Manteca, X., Ko, H.-L., Llonch, P., Chong, Q., & Escribano, D. (2019). Salivary biomarkers to monitor stress due to aggression after weaning in piglets. <i>Research in Veterinary Science</i>, 123 (October 2018), 178–183. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.014</p>	<p>La muestra del estudio no es humana</p>
<p>Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Uum, S. Van, & Koren, G. (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications, 196, 32–37. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.040</p>	<p>Año de publicación (2010)</p>
<p>Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Uum, S. Van. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. <i>Psychoneuroendocrinology</i>, 37(5), 589–601. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009</p>	<p>Año de publicación (2011)</p>

Tras establecer todos los criterios de exclusión y realizar la búsqueda en las fuentes documentales seleccionadas, se eligieron 16 artículos para la realización del estudio que aportaban información de gran interés y pertenecen a revistas de impacto científico, por lo que cuentan con un alto nivel de evidencia.

Tabla 3. Artículos seleccionados

Autor / Año	País	Muestra	Conclusiones
<i>Maruyama Y., Kawano A., Okamoto S. et al. / 2012</i>	Japón	149 participantes sanos, sin antecedentes psiquiátricos, pertenecientes al personal del Hospital Universitario de Oita	El eje hipotalámico – pituitario – adrenal (HPA) podría presentar diferentes patrones de respuesta a distintos agentes estresantes, a diferencia del eje simpático adrenal (SAM), que podría ser más sensible a estímulos dolorosos.
<i>Goodin B., Quinn N., King C.D. et al / 2012</i>	EEUU	46 estudiantes universitarios de ambos sexos, sanos y sin ninguna patología que cause dolor	La respuesta del sRIITNF α 11 a diferentes modalidades de estímulos dolorosos no queda clara, a diferencia del cortisol salivar.
<i>Faresjö Å., Theodorsson E., Chatziarzenis M. et al. / 2013</i>	Suecia y Grecia	Estudiantes universitarios (114 suecos y 125 griegos)	Los jóvenes griegos viven en un ambiente más estresante, sin embargo, presentan niveles más bajos de cortisol capilar que los jóvenes suecos. Se plantea la hipótesis de un posible mecanismo biológico por el cual el eje HPA produce menos cortisol.

<p><i>Shibata M., Kawai M., Matsukura T. et al / 2013</i></p>	<p>Japón</p>	<p>47 recién nacidos sanos</p>	<p>El estudio de biomarcadores de estrés en saliva en los recién nacidos no aporta resultados útiles para la práctica, a diferencia de las escalas subjetivas de valoración y la frecuencia cardíaca.</p>
<p><i>Wittwer A., Krummenacher P., La Marca R. et al / 2016</i></p>	<p>Suiza</p>	<p>27 sujetos sanos, sin ninguna patología dolorosa, alteraciones sensoriales o hipertensión arterial.</p>	<p>El análisis de la AAs tiene la ventaja de que es rápido, no invasivo, barato y fácil de realizar. Además, permite hacer una cuantificación objetiva del dolor, al estar relacionado con el dolor percibido por el paciente, permitiendo por tanto un abordaje integral del dolor y la individualización del tratamiento..</p>
<p><i>Bedini S., Braun F., Weibel L. et al / 2017</i></p>	<p>Francia y Australia</p>	<p>22 teleoperadores del Centro de Emergencias perteneciente al Centro Hospitalario CHR, en Metz-Thionville (Francia)</p>	<p>Los niveles más elevados de cortisol coinciden con los momentos de mayor estrés (las llamadas de emergencia), variando según la gravedad del suceso y el género (mayor en hombres que en mujeres).</p>

<p><i>Kobayashi Fernanda Y., Gaviao M^a Beatriz D., Marquezin M^a Carolina S. et al / 2017</i></p>	<p>Brasil</p>	<p>191 niños cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales se seleccionó una muestra de 76 sujetos, divididos en 2 grupos de 38 (niños con desorden temporomandibular y grupo control).</p>	<p>Aunque los niños con desorden temporomandibular obtuvieron puntuaciones más altas en la evaluación de los síntomas de ansiedad, no se observaron diferencias en el perfil secretor de los biomarcadores de estrés salival entre los dos grupos.</p>
<p><i>Kristensen S., Larsen S., Olsen N. J. et al / 2017</i></p>	<p>Dinamarca</p>	<p>266 madres danesas</p>	<p>No hay evidencias de una posible asociación entre el teñido/lavado del cabello y los niveles de cortisol, analizado con muestras de pelo obtenidas a 1-2 cm de la raíz.</p>
<p><i>García-León M^a A., Peralta-Ramírez M^a I., Arco-García L. et al / 2018</i></p>	<p>España</p>	<p>529 adultos sanos, de los cuales 270 eran hombres y 259 mujeres. Aparte, se incluyeron 62 mujeres embarazadas en el primer mes de gestación.</p>	<p>Los resultados sugieren una posible asociación entre los niveles de cortisol en pelo y la actividad física, el nivel de estudios y el embarazo. Se enfatiza en la necesidad de estudiar la relación del cortisol capilar con el estilo de vida.</p>

<p><i>Agarwal N., Agarwal S., Chaturvedy S. et al / 2018</i></p>	<p>India</p>	<p>20 niños de entre 5 y 12 años de edad, con algún diente de leche y elegidos al azar</p>	<p>Tanto la AAs como el cortisol salivar pueden ser biomarcadores de estrés no invasivos, fiables y fáciles de evaluar en intervenciones dentales.</p>
<p><i>Scharlau F., Pietzner D., Vogel M. et al / 2018</i></p>	<p>Alemania</p>	<p>Mujeres embarazadas que fueron reclutadas para el estudio "LIFE CHILD BIRTH" entre Diciembre del 2011 y Noviembre del 2014 en la ciudad de Leipzig, Alemania.</p>	<p>Se descubrió que no había relación entre el metabolismo del cortisol y la cortisona y el estrés producido por el embarazo. Además, se averiguó que el lavado frecuente del pelo está relacionado con niveles bajos de cortisol y cortisona capilar.</p>
<p><i>Östberg V., Plenty S., Låftman S. B. et al / 2018</i></p>	<p>Suecia</p>	<p>545 estudiantes de entre 14 y 16 años, de dos colegios de enseñanza obligatoria de Estocolmo.</p>	<p>Las demandas escolares constituyen una fuente importante de estrés para los estudiantes, que se ve reducido cuando la escuela aporta ayudas para el afrontamiento de dicho estrés.</p>

<p><i>Zhang Q., Chen Z., Chen S. et al / 2018</i></p>	<p>China</p>	<p>44 mujeres sanas, estudiantes universitarias, de entre 18 y 22 años</p>	<p>La cortisona podría ser un biomarcador útil para el estudio de la actividad del eje HPA alternativo al cortisol.</p>
<p><i>Yamanaka Y., Motoshima H., Uchida K. / 2018</i></p>	<p>Japón</p>	<p>27 jóvenes sanos, estudiantes de la universidad de Hokkaido, Japón.</p>	<p>La respuesta del eje HPA al estrés psicológico agudo es más pronunciada durante las primeras horas del día.</p>
<p><i>Pregled V., Mileti A., Lazi Z. et al / 2018</i></p>	<p>Serbia</p>	<p>65 participantes, de los cuales 23 son pacientes que sufren bruxismo nocturno, y 42 son adultos sanos.</p>	<p>Los pacientes con bruxismo nocturno tenían niveles más altos de cortisol salivar, apoyando la hipótesis de que el estrés puede estar relacionado con el bruxismo.</p>
<p><i>Abdul Kader U. H., Garssen J., Lim P. W. et al /2019</i></p>	<p>Singapur y Países Bajos</p>	<p>78 niños sanos de entre 15 y 39 meses de edad, nacidos en China, Malasia y la India.</p>	<p>Los patrones diurnos de AAs y IgAs fueron demostrados en niños asiáticos, siendo independientes de la ingesta de nutrientes, sexo, edad o etnia china.</p>

8. DISCUSIÓN

En el estudio de los biomarcadores de estrés, tanto en saliva como en pelo, debemos tener en cuenta los dos ejes neuroendocrinos que regulan la respuesta del cuerpo humano ante las situaciones de estrés: el HPA y el SAM. Un estudio realizado en el año 2012 en Japón¹², en el cual se midieron los niveles de cortisol salival y AAs tras la exposición a estimulación eléctrica y al Trier Social Stress Test (TSST), determinó que las respuestas de estos dos ejes van a estar influenciadas por el tipo de agente estresante. De esta forma, el eje SAM, que responde por reacción neuronal, va a ser más sensible al dolor, por lo que la producción de AAs fue instantánea en ambos casos; a diferencia del eje HPA, que respondió por vía hormonal y sólo ante el TSST. Esto podría sugerir que la AAs, (regulada por el SAM) y el cortisol salivar (regulado por el HPA) podrían tener roles distintos en la fisiología del estrés. En la misma línea, otro estudio del año 2018 examinó la respuesta de ambos ejes al exponerles al TSST en función de la hora del día²⁵, con el objetivo de evaluar el ritmo circadiano del cortisol y la respuesta del SAM en forma de aumento de la frecuencia cardíaca. Tras medir tanto la calidad como las horas de sueño de los participantes y recoger las muestras de saliva, se les expuso al TSST y se observó una respuesta distinta de los dos ejes; de tal forma que la frecuencia cardíaca no se vio alterada, pero sí los niveles de cortisol salivar, demostrando que la actividad del eje HPA ante el estrés agudo es mayor durante la mañana que por la tarde.

Por los resultados encontrados en esta revisión bibliográfica, el cortisol es el biomarcador que se ha estudiado clásicamente desde el siglo pasado²⁷, abordándose en la mayoría de los estudios, ya sea de manera exclusiva o comparándolo con otros biomarcadores. En un estudio realizado con teleoperadores de un servicio de emergencias sanitarias en Francia¹⁷ se recogieron muestras de saliva durante el turno de trabajo y en un día control, para evaluar el ciclo circadiano del cortisol. Se demostró que el cortisol es un biomarcador de estrés relevante, directamente relacionado con el estrés subjetivo percibido por los propios trabajadores durante su turno de trabajo. Además, se pudo observar que la experiencia laboral no tenía una influencia determinante, al contrario que el sexo, ya que se encontraron niveles más altos

de cortisol en hombres que en mujeres. Con respecto a este último aspecto, un estudio del año 2018 evaluó tanto el estrés percibido (a través de cuestionarios) como el estrés objetivo (mediante cortisol salivar) en los adolescentes de los institutos suecos²², obteniendo el resultado opuesto, ya que en las chicas se observó un mayor nivel de estrés subjetivo y mayores niveles de cortisol salivar. Esto podría deberse a las diferencias en el desarrollo puberal entre ambos sexos²⁸. Siguiendo con el análisis del cortisol salivar, en ese mismo año se realizó en Serbia un estudio en pacientes con bruxismo nocturno²⁵, que está directamente influenciado por el estrés, la ansiedad y otros trastornos psicológicos. Se pudo demostrar que los pacientes con bruxismo nocturno tenían niveles más elevados de cortisol en saliva, además de un mayor grado de estrés percibido en el análisis psicológico realizado, por lo que el estudio concluyó que el cortisol es un biomarcador de estrés muy apropiado en este tipo de pacientes.

El estudio de los biomarcadores de estrés se ha centrado hasta ahora en la obtención de muestras de saliva, por ser un método no invasivo, de bajo coste y fácil de realizar. Sin embargo, analizar los niveles de cortisol en este fluido corporal solo permite conocer la actividad del biomarcador en un periodo corto y reciente de tiempo, impidiendo por tanto realizar un estudio retrospectivo²⁹; además de otros inconvenientes, como la influencia de la hora del día. Por todas estas limitaciones, en los últimos años se ha desarrollado un método distinto para el estudio del principal biomarcador de estrés, el cortisol, mediante el análisis del pelo.

Esta alternativa prometedora para el análisis del estrés crónico permite a los investigadores conocer la actividad del eje HPA en el pasado, por la acumulación de cortisol en el pelo. La velocidad de crecimiento habitual del pelo es de 1 cm/mes, por lo que si se analiza una muestra de 1 cm de pelo, obtenida lo más cerca posible a la raíz del mismo, nos permite conocer la actividad del eje HPA en ese último mes, y así sucesivamente hasta 3 meses (3 cm de pelo). Además de esta ventaja, es un método de análisis no invasivo, indoloro y fácil de ejecutar. Un estudio realizado en el año 2018 con individuos sanos y mujeres embarazadas en nuestro país utilizó este método de análisis para conocer la concentración de cortisol capilar (HCC) y su relación con

variables psicológicas, sociodemográficas y de estilo de vida¹⁰. En este estudio se determinó que la HCC puede servir como una potencial herramienta para el diagnóstico y control de enfermedades que cursan con alteración del funcionamiento del eje HPA (enfermedad de Addison, por ejemplo). En cuanto a los factores influyentes sobre la HCC, se descubrió que influye la edad (disminuyendo los niveles), el embarazo (con niveles superiores que las mujeres no embarazadas) y otros aspectos como el nivel educativo, la situación laboral, el ejercicio físico, los anticonceptivos y el uso de tintes en el pelo. En relación a esta última variable, se realizó un estudio similar para conocer los posibles factores influyentes sobre los niveles de cortisol en el pelo, centrándose en los tintes de pelo y en la frecuencia de lavado en mujeres¹⁹. Los resultados demostraron que ninguno de los dos factores influía en el HCC. En la misma línea de los dos estudios anteriores, en el año 2013 se llevó a cabo un estudio para conocer la influencia de un ambiente socioeconómico estresante sobre el estrés y los niveles de cortisol capilar¹⁴, comparando dos grupos de población de dos países distintos (Grecia y Suecia). En este estudio se descubrió que la población de jóvenes griegos, que presentaba mayores niveles de estrés subjetivo y síntomas de ansiedad y depresión, tenía niveles más bajos de cortisol en pelo que los jóvenes suecos. Para poder explicar este fenómeno se planteó la hipótesis de un posible mecanismo biológico por el cual los jóvenes griegos se habrían mal adaptado a la situación de estrés crónico, por lo que su eje HPA habría perdido reactividad, reduciéndose por tanto la producción de cortisol. En todos los casos se llega a la conclusión de que es necesaria mucha más investigación en relación a los factores, tanto externos como internos, que puedan influir en la concentración de cortisol capilar, y por lo tanto en el estudio del estrés.

El cortisol se metaboliza en su forma inactiva, la cortisona, por acción de la 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (11B-HSD). Las concentraciones de estos van a ser susceptibles a variación inter e intra-individual, al ritmo circadiano, la alimentación, el sueño y la actividad física; pero en especial al estrés. Un estudio examinó la HCC y la concentración de cortisona en pelo (HCNC) en mujeres embarazadas, así como el estrés subjetivo durante el 2º y 3º trimestre del embarazo²¹, detectando un aumento de ambos esteroides, pero

sin tener relación con los síntomas de depresión y estrés analizados en los cuestionarios. Esto sugiere que el aumento de los niveles de cortisol y cortisona podría formar parte del desarrollo normal del embarazo, y que para el estudio del estrés a largo plazo en mujeres embarazadas se deben estudiar la HCC y HCNC en conjunto, no por separado. En el año 2017 se llevó a cabo otra investigación con el objetivo de analizar la relación entre los niveles en saliva y pelo tanto del cortisol como de la cortisona, teniendo en cuenta diferentes características temporales y niveles de actividad²³. Se descubrió una relación directa entre los niveles en pelo y en saliva a largo plazo de cortisol y cortisona, lo que implica que son los biomarcadores adecuados para estudiar el estrés retrospectivamente, a largo plazo. Por otro lado, se pudo demostrar que la cortisona en saliva tiene una fiabilidad equivalente a la del cortisol. Por todo ello, se podría decir que la cortisona puede ser un biomarcador alternativo al cortisol.

El estudio de los biomarcadores de estrés se ha centrado principalmente en el cortisol. Sin embargo, otras líneas de investigación han estudiado posibles nuevos biomarcadores que podrían ser de utilidad. En el año 2012 tuvo lugar un estudio en el que se evaluó la respuesta neuroendocrina e inmune a 3 estímulos dolorosos¹³, para lo que se escogió el cortisol y la sRIITNF α como biomarcadores en saliva. En este caso, la respuesta del cortisol a los estímulos quedó clara, a diferencia de la de la sRIITNF α .

En otros estudios se ha abordado el papel de la AAs, sola o junto al cortisol u otros biomarcadores, obteniendo resultados muy dispares: en estudios realizados con niños con trastornos temporomandibulares¹⁸ o con recién nacidos sanos¹⁵ no se ha podido demostrar la utilidad de estos biomarcadores para el abordaje del estrés, sugiriendo que es posible que en los niños la regulación funcione de manera distinta; mientras que en otro estudio, como el realizado durante las extracciones dentales en niños de la India²⁰ se determinó que tanto el cortisol como la AAs si son biomarcadores útiles para medir la ansiedad y el estrés. Por otro lado, en el año 2016 se realizó un estudio con adultos sanos¹⁶ utilizando la AAs como biomarcador para medir el dolor, en el cual se obtuvo como resultado que este biomarcador no es específico del dolor, pero puede contribuir a la realización de un abordaje completo e integrador del

mismo. Por último, un estudio publicado este año ha abordado la AAs con otro posible biomarcador de estrés, la IgAs, para conocer sus patrones de regulación diurnos y la influencia de la dieta sobre ellos. Se pudo mostrar gracias a este estudio que estos dos biomarcadores no se ven influenciados por la dieta, el sexo, edad o etnia; sin embargo, cada uno de ellos presenta un patrón diurno opuesto (con la AAs aumentando durante el día y la IgAs disminuyendo sus niveles), por lo que se tendrá que tener en cuenta a la hora de realizar futuros estudios con estos biomarcadores.

8.1 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

8.1.1 LIMITACIONES

La primera limitación que se ha encontrado durante la realización de esta revisión bibliográfica es que los biomarcadores de estrés en saliva y pelo son un tema poco estudiado en nuestro país, ya que tan solo 2 de los estudios seleccionados para la revisión han sido realizados en España. Esto podría sugerir que el estudio, o incluso la existencia de los biomarcadores como herramienta para valorar el estrés es algo desconocido entre los profesionales de la salud de nuestro entorno.

En segundo lugar, una limitación importante es que en la mayoría de los estudios no se tiene en cuenta el papel de la enfermería. Nuestra labor es fundamental en cuanto a la valoración y el manejo del estrés y el dolor en los pacientes; pero en prácticamente la totalidad de los estudios el profesional enfermero queda relegado a la recogida de muestras, siendo realizada la valoración por el médico.

Por último, al tratarse esta revisión bibliográfica de un Trabajo de Fin de Grado, la mayor limitación que he tenido para la elaboración del mismo es el tiempo.

8.1.2 FORTALEZAS

La principal fortaleza de esta revisión bibliográfica es la muestra de artículos elegida, según los criterios de exclusión, y que aporta informaciones de diversos ámbitos sanitarios, como por ejemplo Urgencias y Emergencias, Pediatría, Neuropsiquiatría, Odontología, Salud Pública... Además, los estudios se han realizado en distintos países del mundo y con pacientes que pueden cursar o no patologías muy dispares relacionadas con el estrés y el dolor.

Además, el hecho de realizar una revisión bibliográfica me ha permitido aprender a realizar búsquedas en bases de datos científicas, manejando los diferentes criterios de búsqueda. Por otro lado, he perfeccionado mis habilidades de análisis y juicio crítico para seleccionar los artículos de mayor interés para la revisión.

En último lugar, la realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido formar parte de un equipo de trabajo dirigido por mi tutora y en el que he trabajado junto a otros compañeros.

8.2 APLICABILIDAD A LA PRÁCTICA CLÍNICA

En cuanto a las posibles aplicaciones a la práctica asistencial de los biomarcadores analizados en esta revisión, se encuentran:

- El poder disponer de métodos objetivos para evaluar el estrés y el dolor, que podrían ayudar a diagnosticarlo y tratarlo, por ejemplo, en niños o personas con dificultades para la expresión del dolor (por ejemplo, personas con una discapacidad intelectual, pacientes intubados, con demencia avanzada o en estado de coma).
- Sirven para poder realizar una detección precoz del dolor, permitiéndonos realizar un abordaje, desde punto de vista de Enfermería, en forma de cuidados.
- Se podría plantear un modelo de medicina y tratamientos personalizados, adaptando lo máximo posible las posibilidades de tratamiento a cada paciente (individualización).
- El estrés acelera la progresión de enfermedades oculares como la retinitis pigmentosa. Es una enfermedad que produce una degeneración visual progresiva hasta llegar a la ceguera, y que afecta a las personas entre la segunda y la tercera década de la vida. Por ahora no tiene tratamiento, pero si se tuviese un método objetivo para detectar el estrés podría servir de ayuda en los ensayos clínicos que se realizasen buscando nuevos tratamientos.
- Podrían plantearse terapias de manejo de la ansiedad y el estrés, que mejorarían la calidad de vida del paciente, y en las cuales Enfermería podría tener un papel fundamental a la hora de su desarrollo (valoración del estrés, desarrollo de actividades para mejorarlo, evaluación de las intervenciones realizadas...).

8.3 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

A raíz de esta revisión bibliográfica, y especialmente de las limitaciones encontradas durante el estudio, propongo algunas futuras líneas de investigación en relación al conocimiento y uso de los biomarcadores de estrés en saliva y pelo:

- Estudio sobre la información que tiene el personal sanitario sobre los biomarcadores de estrés: que son, a partir de qué fluidos corporales se pueden obtener y, en especial, su valiosa utilidad. Dar a conocer los biomarcadores a los profesionales sanitarios con este posible estudio podría suponer que otras personas comenzasen a investigar sobre ellos, abriendo a su vez nuevas líneas de investigación.
- Estudio para la evaluación objetiva del estrés y el dolor a través de biomarcadores en saliva y pelo, combinado con algunos de los métodos subjetivos que se utilizan en la actualidad, como las escalas analógicas visuales (EVA), o los cuestionarios de ansiedad y estrés. Se podría llevar a cabo en plantas de hospitalización como las unidades quirúrgicas, Pediatría, Medicina Intensiva o Medicina Interna; así como en unidades más específicas: Unidad del Dolor o Cuidados Paliativos.
- Por último, el estudio de biomarcadores de estrés podría servir para elaborar un posible plan de cuidados que incorpore la evaluación objetiva del estrés y el dolor para pacientes con enfermedades crónicas degenerativas.

9. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de esta revisión bibliográfica son las siguientes:

1. Los biomarcadores de estrés en saliva y en pelo pueden ser una herramienta útil y fiable para la evaluación objetiva de los niveles de estrés, de tal forma que éste se pueda abordar de manera precoz a través de una serie de cuidados específicos de Enfermería.
2. El cortisol es el biomarcador de estrés más estudiado y que ofrece mejores resultados, tanto en saliva como en pelo.
3. El estudio de los biomarcadores en saliva y en pelo es uno de los mejores métodos, por ser no invasivo, barato y fácil de realizar. Además, al ser un procedimiento indoloro, evita que los niveles de los biomarcadores a estudiar suban por temor al procedimiento.
4. El estudio de los biomarcadores en saliva permite conocer la actividad de los ejes neuroendocrinos reguladores del estrés a corto plazo, mientras que el análisis del pelo es el método adecuado para el estudio retrospectivo del estrés.
5. Del resto de biomarcadores estudiados hasta ahora, la cortisona es la que ha mostrado los mejores resultados y mejor fiabilidad, por lo que puede ser considerada como alternativa al cortisol. Para los demás se concluye que es necesaria mucha más investigación, que permita conocer su papel definitivo y los factores que influyen sobre ellos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., ... Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <http://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- 2- Weng N, Jian W. Targeted biomarker quantitation by LC-MS. 1ª ed. Wiley; 2017
- 3- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-6.
- 4- History of stress – CESH / CSHS [Internet]. Humanstress.ca. 2017. Disponible en: <https://humanstress.ca/stress/what-is-stress/history-of-stress/>
- 5- Sobas EM, Reinoso R, Cuadrado-Asensio R, Fernández I, Maldonado MJ, Pastor JC. Reliability of Potential Pain Biomarkers in the Saliva of Healthy Subjects: Inter-Individual Differences and Intersession Variability. *PLoS ONE*. 2016: p. 1-12.
- 6- Afrisham, R., Sadegh-Nejadi, S., SoliemaniFar, O., Kooti, W., Ashtary-Larky, D., Alamiri, F., Aberomand, M., Najjar-Asl, S., ... Khaneh-Keshi, A. (2016). Salivary Testosterone Levels Under Psychological Stress and Its Relationship with Rumination and Five Personality Traits in Medical Students. *Psychiatry investigation*, 13(6), 637-643.
- 7- Qiao S, Li X, Zilioli S, Chen Z, Deng H, Pan J, et al. Hair measurements of cortisol, DHEA, and DHEA to cortisol ratio as biomarkers of chronic stress among people living with HIV in China: known-group validation. *PLoS One*. 2017
- 8- Rodríguez Madera, SL, Varas Díaz, N, Ramos Pibernus, A, Padilla, M, Vasques Guzzi, A, Rodríguez Rodríguez, G, Bockting, W. EXPLORING THE FEASIBILITY AND ACCEPTABILITY OF BIOMARKER COLLECTION FOR HIV INFECTION AND CHRONIC STRESS AMONG TRANSWOMEN IN PUERTO RICO. *Revista Puertorriqueña de Psicología* [Internet]. 2017;28(2):268-281.
- 9- Tzira, D., Prezerakou, A., Papadatos, I., Vintila, A., Bartzeliotou, A., Apostolakou, F., Papassotiriou, I., ... Papaevangelou, V. (2018). Salivary biomarkers may measure stress responses in critically ill children. *SAGE open medicine*, 6, 2050312118802452. doi:10.1177/2050312118802452
- 10- Garcia-Leon M, Peralta Ramirez M, Arco-Garcia L, Romero-Gonzalez B, Caparros-Gonzalez R, Saez-Sanz N et al. Hair cortisol concentrations in a Spanish sample of healthy adults. *PLOS ONE*. 2018;13(9).
- 11- Guirao Goris, S. J. A. (2015). Utilidad y tipos de revisión de literatura. *Ene*, 9(2), 0–0. <https://doi.org/10.4321/S1988-348X2015000200002>
- 12- Maruyama, Y., Kawano, A., Okamoto, S., Ando, T., Ishitobi, Y., Tanaka, Y., ... Akiyoshi, J. (2012). Differences in salivary alpha-amylase and cortisol responsiveness following exposure to electrical stimulation versus the trier socialstress tests. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039375>

- 13- Goodin, B. R., Quinn, N. B., King, C. D., Page, G. G., Haythornthwaite, J. A., Edwards, R. R., ... Mcguire, L. (2012). Salivary cortisol and soluble tumor necrosis factor- α receptor II responses to multiple experimental modalities of acute pain. *Psychophysiology*, *49*(1), 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2011.01280.x>
- 14- Faresjö, Å., Theodorsson, E., Chatziarzenis, M., Sapouna, V., Claesson, H. P., Koppner, J., & Faresjö, T. (2013). Higher Perceived Stress but Lower Cortisol Levels Found among Young Greek Adults Living in a Stressful Social Environment in Comparison with Swedish Young Adults. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073828>
- 15- Shibata, M., Kawai, M., Matsukura, T., Heike, T., Okanoya, K., & Myowa-Yamakoshi, M. (2013). Salivary biomarkers are not suitable for pain assessment in newborns. *Early Human Development*, *89*(7), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.03.006>
- 16- Wittwer, A., Krummenacher, P., La Marca, R., Ehlert, U., & Folkers, G. (2016). Salivary alpha-amylase correlates with subjective heat pain perception. *Pain Medicine (United States)*, *17*(6), 1131–1136. <https://doi.org/10.1093/pm/pnv085>
- 17- Bedini, S., Braun, F., Weibel, L., Aussedat, M., Pereira, B., & Duthheil, F. (2017). Stress and salivary cortisol in emergency medical dispatchers: A randomized shifts control trial. *PLoS ONE*, *12*(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177094>
- 18- Kobayashi, F. Y., Gaviao, M. B. D., Marquezin, M. C. S., Fonseca, F. L. A., Montes, A. B. M., Barbosa, T. de S., & Castelo, P. M. (2017). Salivary stress biomarkers and anxiety symptoms in children with and without temporomandibular disorders. *Brazilian Oral Research*, *31*, e78–e78. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0078>
- 19- Kristensen, S. K., Larsen, S. C., Olsen, N. J., Fahrenkrug, J., & Heitmann, B. L. (2017). Hair dyeing, hair washing and hair cortisol concentrations among women from the healthy start study. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.12.016>
- 20- Agarwal, N., Agarwal, S., Chaturvedi, S., Marwah, N., Chaturvedi, Y., & Chaturvedi, S. (2018). Salivary Cortisol and Alpha-amylase—Biomarkers of Stress in Children undergoing Extraction: An in vivo Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *11*(3), 214–218. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1514>
- 21- Scharlau, F., Pietzner, D., Vogel, M., Gaudl, A., Ceglarek, U., Thiery, J., ... Kiess, W. (2018). Evaluation of hair cortisol and cortisone change during pregnancy and the association with self-reported depression, somatization, and stress symptoms. *Stress*, *21*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1392507>
- 22- Östberg, V., Plenty, S., Låftman, S. B., Modin, B., & Lindfors, P. (2018). School demands and coping resources — Associations with multiple measures of stress in mid-adolescent girls and boys. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph15102143>

- 23- Zhang, Q., Chen, Z., Chen, S., Yu, T., Wang, J., Wang, W., & Deng, H. (2018). Correlations of hair level with salivary level in cortisol and cortisone. *Life Sciences*, 193(November 2017), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.037>
- 24- Yamanaka, Y., Motoshima, H., & Uchida, K. (2018). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially responses to morning and evening psychological stress in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology Reports*, (September). <https://doi.org/10.1002/npr2.12042>
- 25- Pregled, V., Mileti, A., Lazi, Z., Todorovi, A., Djordjevi, I., Popovi, D., & Lazi, V. (2018). Stress assessment in patients with clinically diagnosed sleep bruxism Procena stresa kod bolesnika sa klinički dijagnostikovanim bruksizmom. *Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia.*, 75(10), 1014–1019.
- 26- Abdul Kader, U. H., Garsen, J., Lim, P. W., Muhardi, L., Sandalova, E., & Nambiar, S. (2019). Young Children Display Diurnal Patterns of Salivary IgA and Alpha-Amylase Expression Which Are Independent of Food Intake and Demographic Factors. *BioMed Research International*, 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/3687416>
- 27- Doom JR, Gunnar MR (2013) Stress physiology and developmental psychopathology: past, present, and future. *Dev Psychopathol* 25: 1359–1373. <https://doi.org/10.1017/S0954579413000667> PMID: 24342845
- 28- Östberg, V.; Almquist, Y.B.; Folkesson, L.; Låftman, S.B.; Modin, B.; Lindfors, P. The complexity of stress in mid-adolescent girls and boys. Findings from the multiple methods School Stress and Support Study. *Child Indic. Res.* 2015, 8, 403–423.
- 29- Karlen J, Ludvigsson J, Frostell A, Theodorsson E, Faresjö T. Cortisol in hair measured in young adults-a biomarker of major life stressors?. *BMC Clin Pathol.* 2012; 11(1): 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-11-12> PMID: 22026917