



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Sáez Alcaide, Luis Miguel
Graduado en Odontología. Universidad Complutense de Madrid. Alumno del Título Propio en Especialista en Medicina Oral. Universidad Complutense de Madrid.

Paredes Rodríguez, Víctor Manuel
Doctor en Odontología. Máster en Cirugía Bucal e Implantología. Profesor Colaborador Honorífico. Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Ochoa García-Seisdedos, Paula
Licenciada en Odontología. Especialista en Medicina Oral. Universidad Complutense de Madrid.

González Serrano, José
Licenciado en Odontología. Universidad Rey Juan Carlos. Especialista Universitario en Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

López-Quiles Martínez, Juan
Profesor Contratado Doctor. Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Hernández Vallejo, Gonzalo
Profesor Titular. Departamento de Estomatología III. Director del Postgrado de Especialista en Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Indexada en / Indexed in:
- IME
- IBECs
- LATINDEX
- GOOGLE ACADÉMICO

Correspondencia:
Luis Miguel Sáez Alcaide
C/ Genista 2, 6°C
28011 Madrid
lsaez@ucm.es
Tel.: 665 101 278

Fecha de recepción: 22 de marzo de 2016.
Fecha de aceptación para su publicación:
25 de abril de 2016.

BIOMARCADORES SALIVALES EN PATOLOGÍA DE ESTRÉS

Sáez Alcaide, L. M., Paredes Rodríguez, V. M., Ochoa García-Seisdedos, P., González Serrano J., López-Quiles, J., Hernández Vallejo, G. Biomarcadores salivales en patología de estrés. *Cient. Dent.* 2016; 13; 2: 129-133

RESUMEN

La saliva es un fluido orgánico que contiene un 99% de agua y un 1% de componentes orgánicos e inorgánicos y que ha cobrado mucha importancia en los últimos años como método diagnóstico de ciertas patologías por la gran información que aporta siendo una herramienta fácilmente accesible, económica y no invasiva.

El estrés es causa de patologías muy prevalentes en la sociedad actual tales como la ansiedad o la depresión. Se ha observado que el aumento de estrés conlleva un incremento tanto en plasma como en saliva de ciertas sustancias químicas que pueden ser medidas cuantitativamente, las cuales se conocen como biomarcadores.

Así, esta revisión bibliográfica trata de resumir los biomarcadores salivales más utilizados en el diagnóstico y seguimiento de individuos con estrés.

A pesar de que son necesarios más estudios para clarificar la relación exacta entre los biomarcadores salivales y el estrés, se ha observado que sustancias como el cortisol, la α -amilasa, la cromogranina A o la inmunoglobulina A secretora son útiles, tanto solas como combinadas, en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con estrés, existiendo una relación directa entre exposición a estrés y cambios en los niveles de estos biomarcadores.

PALABRAS CLAVE

Biomarcadores salivales; Estrés.

SALIVARY BIOMARKERS IN STRESS: A REVIEW

ABSTRACT

Saliva is an organic fluid composed of 99% of water and 1% of organic and inorganic components and it has taken importance on diagnosis of some pathologies because of the information it provides, being an accessible, cheap and non-invasive tool.

Stress has been described as a cause of prevalent pathologies of our society such as anxiety or depression. It has been observed that high levels of stress involves an increase in blood and in saliva of substances that can be quantitative measured, commonly known as biomarkers.

Thus, the aim of this review is to summarize the most useful salivary biomarkers in diagnosis and follow-up of stressed patients.

In spite of being necessary more studies to clarify the true relation between salivary biomarkers and stress, it has been observed that substances such as cortisol, α -amylase, chromogranin A and secretory immunoglobulin A are useful not only alone but also mixed in diagnosis and follow-up of stressed patients, being a direct relation between stress exposure and changes in levels of this biomarkers.

KEY WORDS

Salivary biomarkers; Stress.

INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido orgánico formado por un 99% de agua y un 1% de componentes orgánicos e inorgánicos. Su excreción es llevada a cabo por las glándulas salivales mayores en un 93% y las menores en un 7%, estando regulada dicha secreción por el sistema nervioso vegetativo. Durante los últimos años, la saliva ha experimentado un gran avance en cuanto a método diagnóstico debido a la gran cantidad de información que puede ofrecer siendo un método no invasivo, económico y de fácil acceso¹.

Los biomarcadores son sustancias químicas que pueden medirse objetivamente y que permiten evaluar tanto la progresión de una enfermedad como la respuesta ante un tratamiento. Existe una gran cantidad de biomarcadores en la saliva que están siendo ampliamente estudiados para el diagnóstico y tratamiento de patologías orales, entre los que destacan hormonas como el cortisol, enzimas como la lisozima, inmunoglobulinas como la Inmunoglobulina A secretora (IgAs), proteínas como la Cromogranina A (CgA) o el propio ADN².

El estrés es una de las principales causas de la ansiedad y la depresión y se ha demostrado su relación con varios biomarcadores salivales como el cortisol, la IgAs, la α -amilasa salival y la CgA³.

Así, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión analizando cuáles son los biomarcadores salivales más significativos y relacionados con el estrés.

CORTISOL

El cortisol también llamado hidrocortisona es una hormona esteroidea o glucocorticoide producido por las glándulas suprarrenales que se libera como respuesta al estrés. Entre sus funciones destacan el aumento de glucemia a través de la gluconeogénesis, la supresión del sistema inmune, la lipólisis o la estimulación de la reabsorción ósea⁴.

En estudios anteriores, se ha observado que el cortisol salival está en equilibrio con el cortisol libre plasmático y es independiente del flujo salival, por lo que puede utilizarse para la detección y el seguimiento de patologías como el síndrome de Cushing. Así, el cortisol salival puede servir como biomarcador sustituto del cortisol libre en plasma^{5,6}.

Por otra parte, existen estudios que han observado que existe relación entre los niveles de estrés y los niveles de cortisol^{7,8} y entre los niveles de cortisol y enfermedades que cursan con dolor crónico, postulando que éstas puedan deberse a una acumulación de cortisol⁹.

Fiocco y cols., llegaron a una conclusión interesante tras realizar un estudio sobre el ciclo diurno del cortisol salival en pacientes mayores que se quejaban de pérdida de memoria o síntomas de depresión. Las quejas subjetivas de pérdida de memoria y de depresión son indicadores de baja autoestima. El aumento de la secreción de cortisol ha demostrado estar asociado con el deterioro de la memoria y la atrofia del hipocampo. Todo esto

sugiere que un patrón típico de la secreción de cortisol diurna en los adultos mayores puede ser más representativo de un proceso de envejecimiento exitoso que de un proceso de envejecimiento normal¹⁰.

Michels y cols., estudiaron la relación entre los niveles de cortisol salival y los hábitos dietéticos en adolescentes. Se sabe que el consumo de comida rápida, dulces y comida grasa está más asociado a individuos con estrés como fuente de satisfacción a ese estado emocional. En su estudio observaron niveles elevados de cortisol en aquellos adolescentes que llevaban este tipo de hábitos dietéticos, postulando que el cortisol puede ser una de las hormonas encargadas en producir este estrés¹¹.

α -AMILASA

La α -amilasa es una metaloenzima con capacidad para hidrolizar los enlaces glicosídicos α del almidón, glucógeno y glucosa, de ahí su papel en la digestión de los alimentos. Además de su función digestiva posee actividad antimicrobiana⁵.

Se ha descrito un ritmo diurno de la α -amilasa salival, con niveles más bajos en la mañana y más altos en la tarde, al contrario del cortisol salival y la IgAs².

Un estudio realizado Iizuka y cols., analizó los niveles de α -amilasa ante situaciones de estrés. Las conclusiones obtenidas fueron que la actividad de la enzima α -amilasa puede reflejar diferencias individuales ante respuestas al estrés psicológico y fisiológico. De este modo, controlar el nivel de la actividad de la α -amilasa puede ser útil para la evaluación del estrés¹².

Guglielminotti y cols., realizaron un estudio en mujeres embarazadas, midiendo los niveles de α -amilasa previos al parto y justo en el quirófano en el momento de dar a la luz. Se observó un incremento notable de los niveles de α -amilasa, existiendo diferencias estadísticamente significativas, entre los niveles registrados previos al parto y los niveles registrados en el quirófano. Todo ello postula que la α -amilasa puede ser un indicador de los niveles de estrés a tiempo real¹³ (Figura).

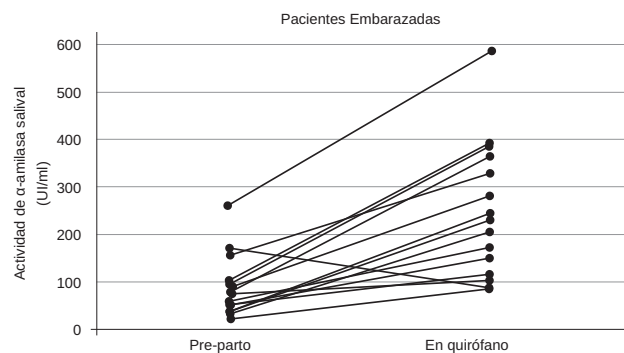


Figura. Niveles de registrados de α -amilasa en el estudio de Guglielminotti y cols.¹³.

Louis y cols., investigaron la relación entre las concentraciones de α -amilasa y cortisol, y las posibilidades de embarazo en mujeres en edad fértil. Los resultados mostraron que el efecto del cortisol se asoció positivamente con probabilidades de concep-

ción en días específicos, al contrario que los efectos α -amilasa, los cuales se asociaron negativamente con la probabilidad de concepción. Se sabe que altos niveles de estrés se asocian a menor probabilidad de embarazo en fase fértil. De este modo, se relacionaron altos niveles de α -amilasa en mujeres con estrés y con una menor probabilidad de embarazo¹⁴.

Un estudio reciente llevado a cabo por Yoon y Weierich evaluó los cambios producidos en la α -amilasa salival y cortisol salival en mujeres expuestas a una situación traumática de su pasado. Se observó un gran incremento de los niveles de α -amilasa ante la exposición al trauma, mientras que los niveles de cortisol apenas experimentaron diferencias. Este estudio sugiere que la α -amilasa puede que sea un biomarcador salival más fiable para medir el estrés en este tipo de situaciones¹⁵.

CROMOGRANINA A

Las cromograninas son una familia de proteínas secretoras que incluyen la cromogranina A (CgA), la cromogranina B (CgB), y la secretogranina II (SgII)¹⁶. La función de las graninas no es del todo conocida. Participan en muchas actividades como la inhibición enzimática de proteasas, el almacenaje de hormonas en vesículas secretoras y tienen un papel importante en la biogénesis de gránulos secretores, incluso en ausencia de hormonas⁵.

La CgA es un marcador útil en suero y tejido de tumores neuroendocrinos, incluyendo feocromocitomas, neuroblastomas, carcinoides, y carcinoma de tiroides. Se ha observado que la concentración de CgA está aumentada en pacientes con adenomas no secretores y en algunos adenomas hipofisarios secretores¹⁷.

Obayashi y cols., evaluaron bioquímica y cuantitativamente el estado afectivo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) midiendo los niveles de CgA en la saliva. Se observó que el grupo que tenía niveles más altos fue el compuesto por los pacientes terminales con esclerosis lateral amiotrófica. No se observó correlación entre los niveles de CgA y la movilidad física pero sí hubo relación entre los niveles del biomarcador y la función emocional de estos pacientes. Concluyeron que la saliva puede ser un biomarcador cuantitativo del estado emocional en pacientes afectados por la ELA en estado moderado y terminal. Además, sugirieron que el hecho de realizar exámenes periódicos de la saliva en este tipo de pacientes podría tener implicaciones terapéuticas para intentar mejorar su calidad de vida¹⁸.

Abekura y cols., examinaron la relación entre el bruxismo nocturno y el estrés psicológico midiendo los niveles de CgA en sujetos bruxistas y no bruxistas. Se observaron niveles medios salivales de CgA significativamente mayores en los sujetos bruxistas tras la situación de estrés que en los sujetos no bruxistas¹⁹.

Toda y cols., evaluaron la efectividad que tenían los baños de hidromasaje en la disminución del estrés mediante la medición de biomarcadores de estrés como el cortisol y la CgA. Los ni-

veles de cortisol salival disminuyeron tras el baño de hidromasaje en personas sin estrés, pero disminuyeron aún más en los individuos que presentaban niveles de estrés mayores. Sin embargo, el grupo de alto nivel de estrés mostró unos niveles bajos de CgA tras el baño, al contrario que el grupo que presentaba bajo nivel de estrés, cuyos niveles de CgA fueron altos en la misma situación. Los autores de este estudio concluyeron que el baño con hidromasaje podrá tener una utilidad terapéutica para combatir el estrés²⁰.

En otro estudio de Toda e Ichikawa se estudió el efecto de la risa sobre los niveles de CgA y tasa salival exponiendo a los pacientes a una película de humor. Se observó tanto una disminución de CgA como un aumento de la tasa salival en todos los pacientes tras ver la película. Estos dos hechos son indicadores de una reducción de los niveles de ansiedad y estrés, lo que reafirma la existencia de una relación directa entre los niveles de CgA y estrés²¹.

CORTISOL, CGA Y α -AMILASA

Wagner y cols., estudiaron los cambios producidos en los niveles de Cortisol, CgA y α -amilasa en individuos expuestos al ruido del tráfico. Para ello, se analizaron los niveles salivales de estos marcadores antes y después de la exposición al ruido. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de cortisol y α -amilasa pre y postexposición, existiendo un aumento importante tras la exposición al ruido. En cuanto a los niveles de CgA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas antes y después de la prueba, hecho que achacaron los autores a la mayor dificultad técnica para analizar este biomarcador²².

INMUNOGLOBULINA A SECRETORA

La Inmunoglobulina A secretora (IgAs) es una inmunoglobulina segregada por células plasmáticas localizadas en el tejido conectivo y conductos de glándulas salivales mayores y menores. Es la enzima que se encuentra en mayor proporción en las secreciones de tipo mucoso. Otras inmunoglobulinas presentes en menor cantidad son la IgM, IgG, IgD e IgE y en ocasiones el déficit de IgAs se compensa con un aumento de estas inmunoglobulinas.

Se cree que la presencia de caries activa puede elevar los niveles de IgAs para intentar neutralizar la actividad bacteriana. También se han encontrado niveles elevados de IgAs en parotiditis agudas, síndrome de Sjögren, fibrosis quística, en personas muy fumadoras o consumidoras de alcohol, espondilitis anquilosante, dermatitis herpetiforme, enfermedad celíaca, conectivopatías y diabetes mellitus tipo 1⁵.

Yu y cols., estudiaron la relación entre el estrés laboral y la concentración de IgAs y la lisozima salival, y la posibilidad de establecer la IgAs en saliva y la lisozima como posibles biomarcadores en estudios que analicen los efectos del estrés sobre la inmunidad. Se observó que la IgAs y la lisozima se asociaban inversamente con la percepción subjetiva de estrés ocupacional entre los trabajadores estudiados y que la de-

manda de trabajo causaba un marcado incremento en la concentración de IgAs y lisozima. Estos resultados explican el efecto del estrés laboral en la función inmunológica. Así, es posible sugerir que la IgAs y la lisozima pueden ser biomarcadores potenciales para la evaluación del estrés en estudios futuros²³ (Tabla).

Tabla. DATOS OBTENIDOS en DIFERENTES ESTUDIOS

Estudio	Biomarcador Salival	Resultados
Fiocco y cols., ¹⁰	Cortisol	Se relacionó el aumento de secreción de cortisol con pérdida de memoria y depresión, las cuales se relacionan con el estrés.
Michels y cols., ¹¹	Cortisol	El estrés se estableció como causa de malos hábitos dietéticos en adolescentes y todo ello se relacionó con altos niveles de cortisol.
Iizuka y cols., ¹²	α-amilasa	Los niveles de α-amilasa salival varían en respuesta a situaciones de estrés.
Yoon y Weierich ¹⁵	α-amilasa	Los niveles de α-amilasa aumentaron tras la exposición a situaciones traumáticas y estresantes pasadas.
Obayashi y cols., ¹⁸	CgA	Se encontró una relación directamente proporcional entre los pacientes con alteraciones emocionales y los niveles de CgA.
Toda y cols., ²⁰	CgA	Los niveles de CgA disminuyeron significativamente en pacientes con estrés tras un baño de hidromasaje.
Yu y cols., ²³	IgAs	Se observó una relación directamente proporcional entre el aumento de estrés laboral y los niveles de IgAs.

Se ha publicado recientemente un estudio llevado a cabo por Egeland y cols., que ha sido el primero en evaluar los diferentes tipos de IgAs salival en relación al estrés. Se ha demostrado que ciertos tipos de IgAs se ven disminuidos con el estrés mientras que otros están aumentados. Esto sugiere la importancia de especificar qué tipo de IgAs es más específica y más fiable como biomarcador a la hora de evaluar el estrés de cada paciente²⁴.

CORTISOL, IGAS Y CGA

Ng y cols., llevaron a cabo un estudio con el objetivo de evaluar la diferencia en la percepción subjetiva de estrés antes y después de una evaluación académica y su asociación con las notas obtenidas por los alumnos. Para ello estudiaron los niveles de cortisol, IgAs y CgA y su asociación en la saliva con niveles de estrés antes y después del examen. Los estudiantes presentaron niveles significativamente más altos de estrés antes que después de la prueba. Los valores más altos de cortisol se observan antes del examen. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de IgAs y CgA en saliva en las muestras previas al examen con respecto a las posteriores. En este caso los niveles de estrés se vieron relacionados con los niveles de cortisol en saliva pero no con los niveles de IgA y de CgAs²⁵.

Den y cols., estudiaron el ritmo circadiano de la CgA y del cortisol. Observaron que los niveles salivales de CgA alcanzaron su punto máximo al despertar, luego disminuyeron rápidamente después de 1 hora y se mantuvieron a un nivel bajo durante todo el día. Sin embargo, los niveles de CgA en plasma no mostraron ningún ritmo circadiano. Estos hallazgos sugieren que los niveles de CgA en saliva y en plasma tienen diferentes vías de la secreción²⁶.

Takatsuji y cols., evaluaron el estrés en relación a los niveles del cortisol salival, IgAs y CgA en estudiantes en el momento previo y posterior a realizar un examen. Se observó un incremento significativo de las concentraciones de IgAs y CgA después del examen y una disminución dos horas después del examen. No hubo diferencias significativas entre antes y después del examen en las concentraciones del cortisol salival. Estos hallazgos sugieren que el estrés agudo debido al examen está asociado con IgAs y CgA salival, pero no con cortisol²⁷.

CONCLUSIONES

Con esta revisión bibliográfica se concluye que el análisis salival puede proporcionar información importante para establecer un correcto diagnóstico y una buena actitud terapéutica frente a ciertas patologías.

El estrés, principal causante de la ansiedad, la depresión y el agotamiento está relacionado con ciertos biomarcadores salivales, entre los que destacan el cortisol, la α-amilasa, la CgA y la IgAs. Su estudio puede ayudarnos a disminuirlo o controlarlo favoreciendo así que las personas afectadas tengan una mejor calidad de vida.

A pesar de que no se conocen muy bien las rutas fisiológicas que relacionan las situaciones de estrés con la secreción de estos biomarcadores, los estudios muestran resultados muy prometedores en relación a la utilidad de la saliva como método diagnóstico y de seguimiento en pacientes con estrés. Sin embargo, son necesarios más estudios para esclarecer la verdadera aplicación clínica de estas investigaciones.



BIBLIOGRAFÍA

1. Paredes Rodríguez VM, Cecilia Murga R, González Serrano J, López-Quiles Martínez J, Hernández Vallejo G. Biomarcadores salivales como instrumento diagnóstico para la detección de lesiones potencialmente malignas y cáncer oral. *Cient Dent* 2015; 12(2): 111-115.
2. David SQ, Gerald CH. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med* 2007; 64: 202-210.
3. Arafah BM, Nishiyama FJ, Tlaygeh H, Hejal R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 2965-71.
4. Little JW, Falace's DA, Miller CS, Rhodus NL. *Dental Management of the Medically Compromised Patient*. 8th Edition. Ed Mosby. 2012; 14: 219-238.
5. Bagán Sebastián JV, Jiménez Soriano Y. *Fisiopatología De Las Glándulas Salivales*. 1ª ed. Valencia: Medicina oral; 2010: 47-65.
6. Pruessner JC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Burnout, perceived stress, and cortisol responses to awakening. *Psychosom Med* 1999; 61: 197-204.
7. Fogaça MC, Carvalho WB, Peres CA, Ivanoff ML, Hayashi LF, Verreschi IT. Salivary cortisol as an indicator of adrenocortical function in healthy infants, using massage therapy *Sao Paulo Med J* 2005; 123(5): 215-8.
8. Hasegawa M, Toda M and. Marimoto K. Changes in salivary physiological stress markers associated with winning and losing. *Biomed Res* 2008; 29(1): 43-46.
9. Melzack R. From the gate to the neuromatrix. *Rev Soc Esp Dolor* 2000; 7: 149-156.
10. Fiocco AJ, Wani N, Weekes N, Pim H, Lupien JS. Diurnal cycle of salivary cortisol in older adult men and women with subjective complaints of memory deficits and/or depressive symptoms: Relation to cognitive functioning. *Stress* 2006; 9(3): 143-52.
11. Michels N, Sioen I, Braet C, Huybrechts I, Vanaelst B, Wolters M et al. Relation between salivary cortisol as stress biomarker and dietary pattern in children. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(9): 1512-1521.
12. Iizuka N, Awano S, Ansai T. Salivary alpha-amylase activity and stress in Japan air self-defense force cargo pilots involved in Iraq reconstruction. *Am J Hum Biol* 2012; 24(4): 468-475.
13. Guglieminotti J, Dehoux M, Mentré F, Bedairia E, Montravers P, Desmonts JM et al. Assessment of salivary amylase as a stress biomarker in pregnant patients: Salivary alpha-amylase: a stress biomarker in pregnant patients. *Int J Obstet Anesth* 2012, 21(1): 35-9.
14. Louis GM, Lum KJ, Sundaram R, Chen Z, Kim S, Lynch CD et al. Stress reduces conception probabilities across the fertile window: evidence in support of relaxation. *Fertil Steril* 2011; 95(7): 2184-9.
15. Yoon SA, Weierich MR. Salivary biomarkers of neural hypervigilance in trauma-exposed women. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 63: 17-25.
16. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49(3): 497-528.
17. Vidal N, Paules MJ, Villabona C, Gómez JM, Ferrer I. Cromogranina A en adenomas hipofisarios humanos. *Rev Esp Patol* 2003; 36(2): 189-194.
18. Obayashi K, Sato K, Shimazaki R, Ishikawa T, Goto K, Ueyama H et al. Salivary Chromogranin A: Useful and Quantitative Biochemical Marker of Affective State in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Internal medicine. Intern Med* 2008; 47(21): 1875-1879.
19. Abekura H, Tsuboi M, Okura T, Kasawa K, Sadamori S, Akagawa Y. Association between sleep bruxism and stress sensitivity in an experimental psychological stress task. *Biomed Res* 2011; 32(6): 395-399.
20. Toda M, Morimoto K, Nagasawa S, Kitamura K. Change in salivary physiological stress markers by spa bathing. *Biomed Res* 2006; 27(1): 11-14.
21. Toda M, Ichikawa H. Effect of laughter on salivary flow rates and levels of chromogranin A in young adults and elderly people. *Environ Health Prev Med* 2012; 17: 494-499.
22. Wagner J, Cik M, Marth E, Santner BI, Gallasch E, Lackner A et al. Feasibility of testing three salivary stress biomarkers in relation to naturalistic traffic noise exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213(2): 153-155.
23. Yu SF, Jiang KY, Zhou WH, Wang S. Relationship between occupational stress and salivary sIgA and lysozyme in assembly line workers. *Chin Med J* 2008; 121(17): 1741-3.
24. Egeland CG, Hugo FN, Hilgert JB, Nascimento GG, Junges R, Lim HJ et al. Psychological distress and salivary secretory immunity. *Brain Behavior Immunity* 2016; 52: 11-17.
25. Ng V, Koh D, Mok BY, Chia SE, Lim LP. Salivary biomarkers associated with academic assessment stress among dental undergraduates. *J Dent Educ* 2003; 67(10): 1091-1094.
26. Den R, Toda M, Nagasawa S, Kitamura K, Morimoto K. Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomed Res* 2007; 28(1): 57-60.
27. Takatsuji K, Sugimoto Y, Ishizaki S, Ozaki Y, Matsuyama E, Yamaguchi Y. The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. *Biomed Res* 2008; 29(4): 221-4.