

Artículo Original

Cortisol y amilasa salival en niñas: variación según la curva diurna, la ingesta de alimentos y la actividad física

Sofía Araya M.¹, Rodrigo Cataldo B.^{1,a}, Constanza Calderón N.^{2,b}, Gerardo Weisstaub N.³, Javier Parada S.^{2,c}, M. Isabel Hodgson B.^{1,4} y José L. Santos M.^{1,d}

Diurnal variation of salivary cortisol and α amylase levels in normal girls. Effects of meals and physical exercise

¹Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

^{2,b,c}Escuela de Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile.

³Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. INTA.

^{a,d}Bioquímico. Pontificia Universidad Católica de Chile.

⁴Departamento de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Correspondencia a:
José Luis Santos

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. Edificio de Gastroenterología, 4 Piso.

Pontificia Universidad Católica de Chile. Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340. Santiago, Chile.

Teléfonos: (56 2) 3543862, (56 2) 3543865, (56 2) 3543868

Fax: (56 2) 633 82 98

Recibido: 19-12-2014
Aceptado: 06-01-2015

Background: Salivary cortisol levels and saliva α -amylase enzymatic activity are non-invasive markers of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system related to stress, which could be associated with excessive energy intake in response to stressors. **Aim:** To describe the diurnal variation of salivary cortisol levels and α -amylase activity in pre-pubertal girls and to assess their change after meals and physical activity episodes. **Subjects and Methods:** Nine normal-weight girls aged 8 to 10 years were monitored for 14 hours, from 6:00 AM to 20:00 h. Three standardized meals were administered across the day with a controlled sport competition performed at the end of the day. Saliva samples were drawn upon awakening, 30 min after awakening, before and after lunch, before and after dinner, and before-after the controlled episode of physical activity. **Results:** A decreasing salivary cortisol diurnal pattern was confirmed, with an initial increase occurring 30 minutes after waking up. An ascending diurnal pattern was observed for salivary amylase activity. Meals significantly increased cortisol levels, with a non-significant trend to increase amylase activity. The magnitude of physical activity during acute exercise was associated with increased salivary amylase activity ($\rho = 0.84$; $P < 0.01$). Cortisol levels were positively correlated with body mass index z scores ($\rho = 0.87$; $P < 0.01$). **Conclusions:** We confirmed the existence of a diurnal pattern of salivary cortisol levels and α -amylase activity in saliva that is modulated by diet and exercise. Our preliminary results also show that salivary cortisol might be related with body weight.

Key words: Cortisol, amylase, saliva.

Introducción

El estrés se define como una respuesta neuroendocrino-fisiológica que permite la adaptación del organismo para responder correctamente a estímulos externos e internos y mantener su homeostasis^{1,2}. Existen dos sistemas involucrados en la respuesta al estrés: el Sistema Nervioso Simpático (SNS) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA). El efecto de la activación del SNS se traduce en una mayor acción de la noradrenalina y adrenalina, mientras que la respuesta más notoria en relación al eje HHA consiste en la elevación de los niveles de cortisol³. Aunque ambos sistemas son activados bajo condiciones de estrés, se ha descrito que el SNS actuaría principalmente bajo condiciones de estrés agudo mientras que el eje HHA actuaría frente al estrés crónico². En este sentido, el SNS se activaría en el espacio de tiempo de segundos frente a un estresor, con rasgos relacionados con la respuesta de “vuelo o pelea” (aumento de la frecuencia cardíaca/respiratoria y de la presión arterial). Por el contrario, el eje HHA comenzaría a actuar de una forma más tardía, aproximadamente 10 min posterior al estímulo estresor, y se mantendría activo por horas, relacionándose con la respuesta de mo-

ción de los niveles de cortisol³. Aunque ambos sistemas son activados bajo condiciones de estrés, se ha descrito que el SNS actuaría principalmente bajo condiciones de estrés agudo mientras que el eje HHA actuaría frente al estrés crónico². En este sentido, el SNS se activaría en el espacio de tiempo de segundos frente a un estresor, con rasgos relacionados con la respuesta de “vuelo o pelea” (aumento de la frecuencia cardíaca/respiratoria y de la presión arterial). Por el contrario, el eje HHA comenzaría a actuar de una forma más tardía, aproximadamente 10 min posterior al estímulo estresor, y se mantendría activo por horas, relacionándose con la respuesta de mo-

vilización de sustratos energéticos (lipólisis y gluconeogénesis).

El cortisol es una hormona esteroidea de tipo glucocorticoide producida por la corteza de la glándula adrenal, cuya secreción es estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH es producida en las células corticotropas de la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), producida por las neuronas del núcleo paraventricular en el hipotálamo. El cortisol circulante en plasma se encuentra ligado a proteínas (mayoritariamente unido a transcortina, pero también a SHBG y albúmina), con menos de un 10% disponible como fracción libre que puede transportarse a la saliva³. Se ha descrito que los niveles de cortisol plasmático muestran un patrón circadiano y pulsátil, con mayores concentraciones en la mañana, tras un incremento rápido tras el despertar, y una disminución progresiva durante el día⁴.

La amilasa salival es una metaloenzima cuya función es hidrolizar enlaces α -1,4 del almidón para obtener dextrinas, maltosa, isomaltosa y glucosa. Esta enzima actúa en el inicio de la digestión de almidón en la cavidad oral, siendo la proteína más abundante en la saliva humana. Diversos estudios han propuesto a la α -amilasa salival como un marcador de activación de SNS, aunque se ha comprobado que la producción de saliva es controlada tanto por el sistema nervioso simpático como por el sistema nervioso parasimpático. Se han descrito diversos factores que modifican la cantidad de la amilasa salival como el tabaco, el grado de hidratación, el alcohol, la ingesta de hidratos de carbono, la cafeína y el ejercicio físico⁵⁻⁹. Adicionalmente, diferentes estudios han demostrado que la cantidad absoluta y la actividad de la amilasa salival están relacionada con el número variable de copias de gen AMY1^{10,11}.

Sujetos y Métodos

Diseño y Sujetos

Estudio observacional que se llevó a cabo en condiciones controladas en $n = 9$ niñas pre-púberes sanas entre 8 y 10 años de edad a lo largo de un ciclo diurno. Todas las niñas eran alumnas de un mismo colegio de la ciudad de Santiago de Chile y eran de un nivel socioeconómico similar. Las niñas fueron invitadas a una actividad recreacional por una jornada completa en una dependencia equipada para alojamiento, recolección de datos antropométricos, registros de ingesta y toma de muestras de saliva. El promedio de edad de las niñas fue $9,1 \pm 0,5$ años. Entre ellas, 6 presentaron un peso normal y 3 sobrepeso según criterios NCHS-CDC2000. Todas las niñas tuvieron circunferencia de cintura en rango adecuado (Tabla 1). En el

momento del despertar en la mañana, se obtuvieron muestras de saliva no-estimulada en 5 niñas. Para la totalidad del grupo ($n = 9$), se obtuvieron adicionalmente muestras de saliva en los tiempos aproximados de 30 min post-despertar (aún en ayunas), 20 min previo al almuerzo (13 h), 20 min post-almuerzo, 20 min antes de la cena (19 h) y 20 min después de la cena. Finalmente, también se obtuvieron muestras de saliva antes y después de un episodio de actividad física aguda realizado alrededor de las 20 h. El episodio de ejercicio físico consistió en una competencia deportiva para recorrer 500 metros en una bicicleta ergométrica en el menor tiempo posible. Previo a cada toma de muestra de saliva se realizó un enjuague de boca con agua, evitando el cepillado de dientes durante el día.

Los criterios de exclusión del estudio fueron: medicación con corticoides y presencia de patologías agudas o crónicas, con o sin tratamientos. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se obtuvo un consentimiento firmado por parte de la madre de cada niña participante.

Evaluación antropométrica

Se midió el peso y la estatura a primera hora de la mañana, sin zapatos y con ropa ligera en una balanza Seca equipada con estadiómetro. A partir de los dos datos anteriores se obtuvo el Índice de Masa Corporal (IMC) y el puntaje zIMC. La circunferencia abdominal se midió con cinta métrica no distensible de fijación automática medida por sobre el reborde de la cresta iliaca, pasando por el ombligo. La presión arterial se evaluó en posición sentada, con esfigmomanómetro de mercurio. Estos datos se muestran en Tabla 1.

La evaluación de desarrollo puberal se realizó por observación y palpación directa según criterios de Tanner, clasificando 5 niñas en Tanner 1 y otras 4 niñas en Tanner 2.

Registro de alimentación

A todas las niñas se les entregó una alimentación estandarizada al desayuno (8:00 h), almuerzo (13 h) y cena (19 h), determinando la ingesta por pesada directa de la comida antes y después de las 3 ingestas. Para calcular la ingesta calórica y de macronutrientes se utilizó un programa de composición de alimentos chilenos del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Chile (INTA) "Evaluación Ingesta Alimentos" (<http://www.inta.cl/>; INTA y Nestlé Nutrition; Vivián Gattás; número de registro 142.632). La ingesta del día fue en todos los casos adecuada a los requerimientos diarios de cada niña (60% carbohidratos, 30% lípidos y 10% proteínas).

Artículo Original

Tabla 1. Características antropométricas y presión arterial de las niñas incluidas en el estudio

	Promedio ± DE	Rango
Edad (años)	9,1 ± 0,5	8,3-9,9
Peso (kg)	33,9 ± 5,8	26,5-37
Talla (cm)	135,4 ± 5,0	128,0-141,5
IMC (kg/m ²)	18,3 ± 1,7	15,3-21,1
Puntaje z-IMC	0,8 ± 0,5	-0,3-1,45
Circunferencia de Cintura (cm)	59,8 ± 4,8	54-67
Presión Arterial Sistólica (mm Hg)	97,5 ± 5,6	90-108
Presión Arterial Diastólica (mm Hg)	59,6 ± 7,4	56-64

Conducta de alimentación

Se evaluó la conducta de alimentación aplicando la herramienta psicométrica llamada Child Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ) a las madres de las niñas participantes^{12,13}. CEBQ es un cuestionario de 35 ítems, que mide 4 dimensiones que analizan conducta pro-ingesta (disfrute de los alimentos, deseo de beber, sobrealimentación emocional, respuesta frente a los alimentos) y otras 4 dimensiones que reflejan conductas anti-ingesta (lentitud en comer, respuesta de saciedad, subalimentación emocional y selectividad de alimentos). Los puntajes CEBQ pro-ingesta han mostrado una asociación directa y gradual con el IMC, mientras que los anti-ingesta han mostrado una asociación inversa con el peso corporal¹⁴.

Mediciones actigráficas de actividad física

Se utilizó un actígrafo Actiwatch AW64 con el objeto de estimar el nivel de actividad física (movimientos vectoriales durante todo el día), las horas de sueño, y determinar el momento del despertar en la mañana. Este instrumento es un sensor que integra el grado y la velocidad de movimiento, el que es registrado como cuentas de actividad por unidad de tiempo (Cuentas Por Minuto, CPM). El actígrafo fue ubicado en la cadera derecha para mediciones diurnas y la muñeca derecha en la medición de sueño y despertar. Según la curva de CPM de medición continua, se observó que todas las niñas estudiadas mantuvieron una actividad física liviana durante el día, con un promedio de 418 CPM. Sin embargo, su actividad aumentó a moderada en las actividades recreativas con CPM entre 900 y 2.000^{15,16}.

Mediciones bioquímicas

Se cuantificó el cortisol salival mediante un kit ELISA (www.salimetrics.com) (1-3002 5PK 1-3002-5) según las indicaciones del fabricante. La actividad de amilasa salival se determinó por ensayo enzimático colorimétrico (1-

1902 5PK 1-1902-5). Con el propósito de descartar una posible contaminación con sangre en la saliva, se realizó adicionalmente un test ELISA para la detección de transferrina en saliva (1-1302 5PK 1-1302-5). Este ensayo arrojó una media de $0,77 \pm 0,8$ $\mu\text{g/dl}$, indicando que no existe contaminación relevante por sangre en las muestras de saliva, por lo que las concentraciones salivares de cortisol y actividad de amilasa salivales no estarían afectadas por este factor.

Análisis estadístico

Se describieron las curvas diarias de los niveles de cortisol salival y la actividad de la amilasa salival a lo largo del día mediante gráficos que incluyen promedios y desviaciones estándar. La existencia de una curva diurna no-uniforme para estas mediciones se evaluó mediante ANOVA de medidas repetidas. Los cambios de “antes-después” en los episodios de comida y actividad física se evaluaron mediante t de Student para muestras pareadas. Los análisis de correlación se evaluaron mediante el coeficiente rho de Spearman. Se calculó que un ejercicio agudo (estudio quasi-experimental; sin grupo control) en un grupo de $n = 9$ niñas sería suficiente para producir un aumento en la actividad de la amilasa salival en comparación con la situación basal (incremento del 60%), lo que permitiría detectar diferencias estadísticamente significativas, con un 95% de confianza y un poder estadístico de 80%.

Resultados

Las mediciones de las concentraciones de cortisol en saliva de las niñas mostraron una alta variabilidad, manteniendo un patrón diurno decreciente durante el día ($p < 0,001$) (Figura 1). En 5 niñas, el despertar coincidió con el horario de toma de muestra de saliva. En estas niñas, se observó siempre una elevación entre la primera y la segunda muestra de la mañana. En las otras 4 niñas, la primera muestra fue tomada aproximadamente 20 min posteriormente a su despertar medido actigráficamente. Al analizar los datos de actividad de amilasa salival, se observó una caída al momento de despertar con posterior aumento de la actividad durante el día, mostrando un claro patrón ascendente ($p < 0,001$) (Figura 2).

Los episodios de ingesta incrementaron significativamente los niveles de cortisol ($p = 0,014$), con una tendencia no-significativa al aumento de la actividad de la amilasa. La magnitud de la actividad física en un episodio de ejercicio agudo se asoció a un incremento de la actividad de amilasa salival ($\rho = 0,84$; $p = 0,006$), sin producir cambios en los niveles de cortisol salival. Se determinó una correlación de $\rho = 0,83$ ($p = 0,03$) entre la magni-

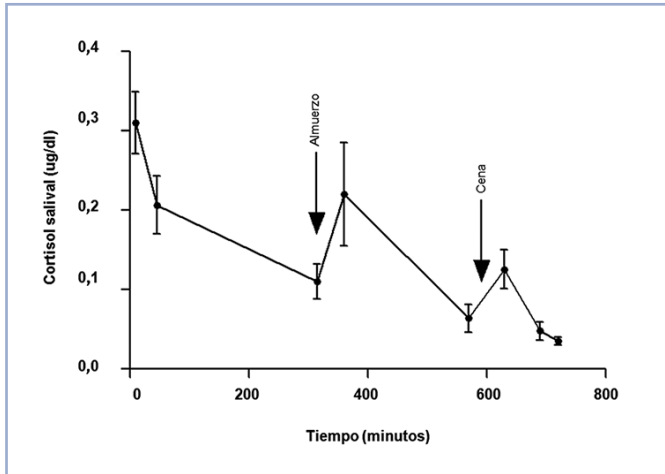


Figura 1. Curva diurna de cortisol salival en un grupo de niñas chilenas entre 8 y 10 años.

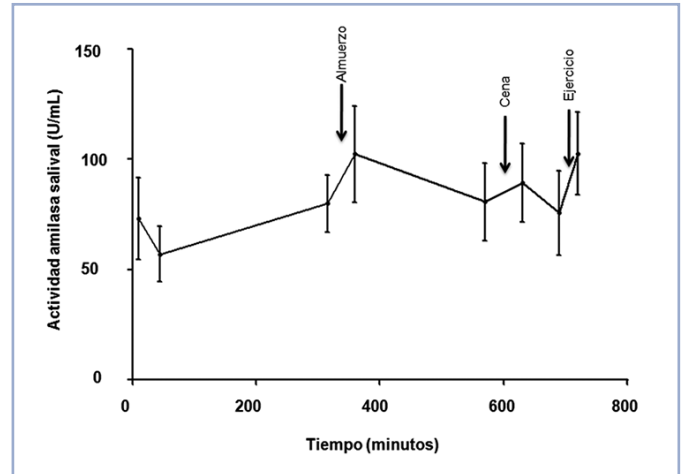


Figura 2. Curva diurna de la actividad de amilasa salival en un grupo de niñas chilenas entre 8 y 10 años.

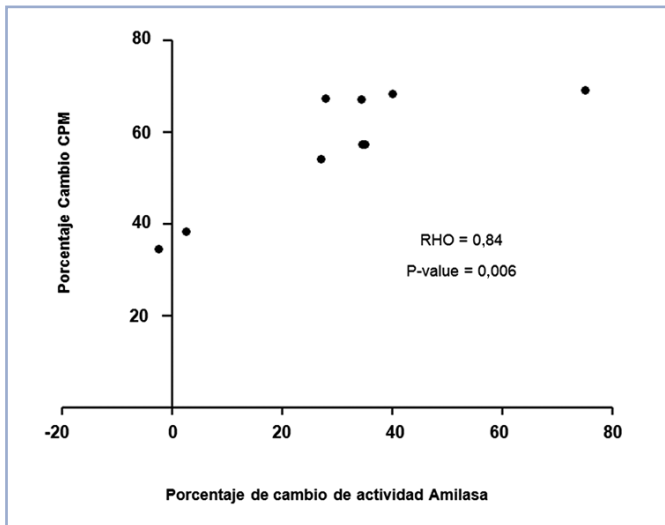


Figura 3. Correlación entre porcentajes de cambio de cuentas por minuto durante episodio de actividad física y la actividad de la amilasa salival.

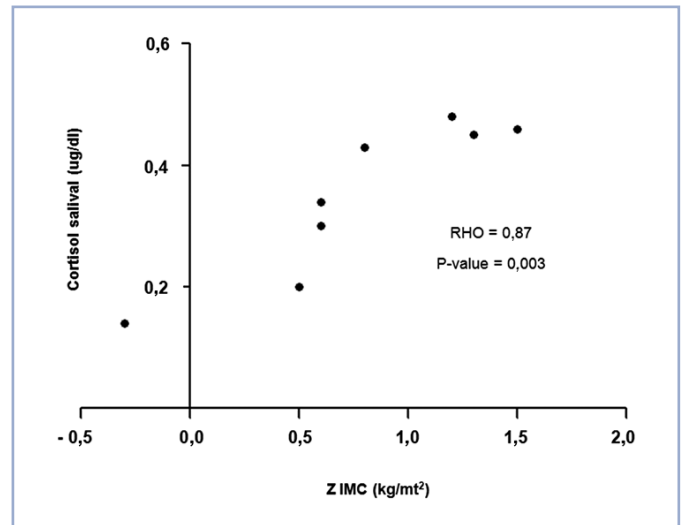


Figura 4. Asociación entre los niveles de cortisol salival y puntaje z de índice de masa corporal.

tud de elevación de amilasa salival y el aumento de actividad física expresada en CPM (expresados ambos en porcentaje de cambio) (Figura 3).

Los niveles de cortisol al despertar se correlacionaron significativamente con el zIMC ($\rho = 0,87$; $p = 0,003$) mostrando una tendencia no-significativa hacia mayores puntajes CEBQ de sobreingesta emocional ($\rho = 0,47$; $p = 0,21$) (Figura 4). No se observaron asociaciones significativas entre la actividad de la amilasa salival con el zIMC o con puntajes de conducta de alimentación.

Discusión

Los niveles de cortisol y la actividad enzimática de α -amilasa en saliva son marcadores no-invasivos de estrés relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y el sistema nervioso autónomo, que podrían estar asociados con el exceso de ingesta energética en respuesta a diferentes estresores. En nuestro estudio, hemos evidenciado una gran variabilidad en las mediciones entre las niñas, pero también hemos confirmado la existencia de un patrón diurno decreciente de cortisol en saliva

Artículo Original

con aumento media hora después del despertar, junto con un patrón ascendente de actividad de amilasa a lo largo del día.

Los episodios de ingesta incrementaron significativamente los niveles de cortisol ($p = 0,014$), con una tendencia no-significativa al aumento de la actividad de la amilasa. Se ha descrito que la ingesta energética tiene una influencia en los niveles de cortisol y amilasa salival. En este sentido, algunos estudios muestran mayor elevación de cortisol con dieta alta en carbohidratos vs alta en proteínas^{17,18}, mientras que otros muestran una mayor elevación con una dieta rica en proteínas¹⁹, existiendo estudios que no muestran diferencias con el tipo de macronutriente consumido^{20,21}. En relación al ejercicio físico, hemos observado que un episodio de actividad física generó un aumento de frecuencia cardíaca promedio de 22% y la amilasa salival medida en forma inmediata posterior a actividad física se elevó significativamente y se correlacionó con la intensidad del ejercicio físico. Esta observación es concordante con la idea de una activación rápida del eje simpático, no así del eje HHA, dado que los valores de cortisol salival no se modificaron significativamente tras el episodio de actividad física²¹.

Si analizamos el estado nutricional de las niñas y su relación con los niveles de cortisol en la mañana, encontramos que las niñas con mayor zIMC presentan valores mayores de cortisol en ayuno vs las de menor peso corporal, con una tendencia no significativa mayores puntajes de sobreingesta emocional. Esta observación apoya la hipótesis que indica que los niveles de cortisol pudieran tener influencia en la adiposidad y la conducta alimentaria^{19,22}. Una clara limitación de este estudio es que el número de sujetos es reducido y no permite que sus datos sean extrapolados a la población pediátrica. Sin embargo, la particularidad del seguimiento de las niñas de este estudio permite el análisis de múltiples mediciones seriadas a lo largo del día.

En conclusión, podemos afirmar que existe un patrón diurno decreciente de cortisol en saliva con aumento media hora después del despertar, junto con un patrón ascendente de actividad de amilasa a lo largo del día. La ingesta de alimentos incrementó los niveles de cortisol en saliva, mientras que el ejercicio físico incrementó la actividad/cantidad de la amilasa salival. Los niveles de cortisol salival en la mañana se correlacionaron significativamente con el IMC en el grupo de niñas estudiadas. Por otro lado, existe una tendencia que indica una posible relación entre los niveles de cortisol y las conductas de sobreingesta emocional. Dado el pequeño tamaño de la muestra, estos resultados deben ser replicados en posteriores estudios.

Agradecimientos

Estudio financiado por la Dirección de Investigación de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y por el proyecto FONDECYT N° 11121602.

Referencias

1. Sapolsky RM, Romero LM, Munk AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.
2. Chrousos MD. 2007. Organization and integration of the endocrine system. *Sleep Med Clin* 2: 125-145.
3. Vining RF, McGinley RA, Maksvytus JJ, Ho KY. 1983. Salivary cortisol: A better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20: 329-335.
4. Dorn LD, Lucke JF, Loucks TL, Berga SL. 2007. Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem* 44: 281-284.
5. Nater UM, Rohleder N. 2009. Salivary alpha amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology* 34: 486-496.
6. Ljungberg G, Ericson T, Ekblom B, Birkhed D. 1997. Saliva and marathon running. *Scand J Med Sci Sports* 7: 214-219.
7. Rohleder N, Wolfe JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. 2006. The psychosocial stress induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology* 43: 645-652.
8. Kivlighan KT, Granger DA. 2006. Salivary alpha amylase response to competition: relation to gender, previous experience, and attitudes. *Psychoneuroendocrinology* 31: 703-714.
9. Kelly SJ, Young R, Sweeting H, Fischer JE, West P. 2008. Levels and confounders of morning cortisol collected from adolescents in a naturalistic (school) setting. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1257-1268.
10. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, et al 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 39: 1256-1260.
11. Santos JL, Saus E, Smalley SV, Cataldo LR, Alberti G, Parada J, et al. 2012. Copy Number Polymorphism of the Salivary Amylase Gene: Implications in Human Nutrition Research. *J Nutrigenet Nutrigenom* 5: 117-131.
12. Wardle J, Guthrie CA, Sonderson S, Rapoport L. 2001. Development of the children's eating behaviour questionnaire. *J Child Psychol Psychiatr* 42: 963-970.
13. Carnell S, Wardle J. 2007. Measuring behavioural susceptibility to obesity: Validation of the child eating behaviour questionnaire. *Appetite* 48: 104-113.
14. Santos JL, Ho-Urriola J, González A, Smalley SV, Domínguez-

- Vásquez P, Cataldo LR, et al. 2011. Association between eating behavior scores and obesity in Chilean children. *Nutr J* 10: 108.
15. Puyau MR, Adolph AL, Vohra FA, Butte NF. 2002. Validation and Calibration of Physical Activity Monitors in Children. *Obesity Res* 10: 150-157.
16. Vásquez F, Salazar G, Andrade M, Vásquez L, Díaz E. 2006. Energy balance and physical activity in obese children attending day-care centres. *Eur J Clin Nutr* 60: 1115-1121.
17. Vicennati V, Pasqui F, Cavazza C, Garelli S, Casadio E, di Dalmazi G. 2011. Cortisol, energy intake, and food frequency in overweight/obese women. *Nutrition* 27: 677-680.
18. Martens MJ, Rutters F, Lemmens SG, Born JM, Westerterp-Plantenga MS. 2010. Effect of single macronutrients on serum cortisol concentrations in normal weight men. *Physiol Behav* 101: 563-567.
19. Weigensberg MJ, Toledo-Corral CM, Goran MI. 2008. Association between the metabolic syndrome and serum cortisol in overweight latino youth. *Journal Clin Endocrinol Metab* 93: 1372-1378.
20. Lemmens SG, Borns JM, Martens EA, Martens MJ, Westerterp-Plantenga MS. 2011. Influence of consumption of a high protein vs high carbohydrate meal of the physiological cortisol and physiological mood response in men and women. *Plos One* 6: 101-371.
21. Ulrich YM, Herman JP. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409.
22. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. 2001. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26: 37-49.