

Sommario

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1 PROTOSSIDO DI AZOTO	6
1.1 Cenni storici	6
1.2 Impieghi	7
1.2.1 Gas esilarante.....	7
1.2.2 Settore alimentare	8
1.2.3 Motori a scoppio	8
1.2.4 Propellente in motori chimici per razzi	9
1.2.5 Presenza in natura	9
1.3 Applicazione odontoiatrica	9
1.3.1 Diffusione	10
1.3.2 Possibili complicanze	10
1.3.3 Controindicazioni	11
CAPITOLO 2 SEDAZIONE COSCIENTE CON PROTOSSIDO	12
2.1 Approcci pratici e psicologici.....	12
2.1.1 Ambiente e appuntamenti.....	12
2.1.2 Ansia dei genitori	12
2.1.3 Distrazioni e visualizzazione di immagini positive	12
2.1.4 Comportamento del team odontoiatrico	13
2.2 Funzionamento, componenti dell'apparecchio ed erogazione	14
2.3 Farmacologia.....	18
2.3.1 Proprietà farmacocinetiche	18
2.3.2 Controindicazioni	22
2.3.3 Tossicità cronica	23
2.3.4 Farmacodinamica.....	23
CAPITOLO 3 STRESS.....	24
3.1 Descrizione.....	24
3.2 Parametri di valutazione dello stress dentale.....	25
3.3 Metodi per diminuire lo stress dentale	26
3.3.1 Questionari sull'ansia pretrattamento.....	26
3.3.2 Desensibilizzazione sistematica individuale e terapia di gruppo	26
3.3.3 Inondazioni / implosione	27
3.3.4 Terapia comportamentale cognitiva.....	27

3.3.5	Terapia di rilassamento.....	28
3.3.6	Apprendimento al rilassamento computer assistito (CARL)	28
3.3.7	Ipnoterapia (HT).....	28
3.3.8	Terapia farmacologica.....	29
3.3.9	Rappresentazioni grafiche	29
3.4	Odontofobia.....	29
3.4.1	Vulnerabilità genetica	31
3.4.2	Affettività negativa.....	31
3.4.3	Esperienza	31
3.4.4	Condizionamento cognitivo (pavloviano)	31
3.4.5	Condizionamento operante	32
3.4.6	Condizionamento vicario	32
3.4.7	Trasmissione verbale	32
3.4.8	Contenuto cognitivo.....	33
3.4.9	Distorsioni cognitive.....	33
CAPITOLO 4 CORTISOLO.....		34
4.1	Descrizione e cenni di fisiologia	34
4.1.1	Ipercortisolismo	40
4.1.2	Relazione tra cortisolo e attività motoria	41
4.1.3	Relazione tra cortisolo, alpha amilasi e stress	41
4.2	Metodi di analisi.....	41
4.2.1	Saggi del cortisolo urinario.....	42
4.2.2	Test immunologici IA.....	43
4.2.3	Test immunologici EIA.....	45
4.2.4	Test di luminescenza e di fluorescenza.....	45
4.2.5	Cromatografia liquida ad alta pressione/ alte prestazioni (HPLC)	46
4.2.6	Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)	48
4.2.7	Vantaggi di LC-MS/MS	49
4.2.8	Applicazioni cliniche di LC-MS/MS.....	50
4.3	Tamponi salivari	53
4.3.1	Saggi di cortisolo salivare.....	54
CAPITOLO 5 SPERIMENTAZIONE		57
5.1	Background	57
5.2	Scopo della ricerca	57

5.3	Materiali e metodi	57
5.3.1	Protocollo.....	58
5.4	Risultati	68
5.4.1	Risultati attesi	68
5.4.2	Rilevanza dei risultati	68
CAPITOLO 6 CONCLUSIONI		72
BIBLIOGRAFIA.....		73

INTRODUZIONE

La sedazione cosciente mediante protossido di azoto (N_2O) è una tecnica anestesiológica che consiste nel far respirare al paziente, attraverso una mascherina nasale, una miscela di ossigeno e protossido di azoto.

Gli effetti di questa tecnica sono senso di rilassatezza e riduzione della sensibilità al dolore, senza però causare perdita di coscienza, portando a una maggiore collaborazione del paziente. Talvolta possono essere accompagnate da leggera euforia, amnesia o sonnolenza. L'effetto di questa tecnica si ha nell'arco di tre minuti, poi svanisce altrettanto rapidamente alla fine della seduta. Il suo utilizzo coadiuva il benessere, ma non è un sostituto dell'anestesia locale. È inoltre necessario ottenere il consenso del paziente o del legale rappresentante di quest'ultimo per poter iniziare la procedura.

L' N_2O venne scoperto da Joseph Priestley nel 1772. Da allora viene utilizzato per scopi ricreativi e gli viene attribuito l'appellativo di "gas esilarante", diventò il protagonista dei *laughing gas parties* della borghesia inglese. Successivamente iniziò ad essere utilizzato come anestetico in medicina, in particolare in odontoiatria. Può anche essere impiegato come additivo alimentare e comburente nei motori a combustione interna.

La sedazione cosciente con protossido di azoto è indicata per pazienti ansiosi, odontofobici, bambini, non collaboranti e disabili. Ha effetti benefici anche su "pazienti normali".

L'obiettivo del presente studio è osservare la riduzione dell'ansia, impiegando la sedazione cosciente con protossido di azoto, attraverso l'analisi oggettiva dei livelli di cortisolo salivare. Questi valori oggettivi vengono successivamente, messi a confronto con i dati soggettivi del test di Venham.

Il paziente pediatrico non distingue i vari trattamenti odontoiatrici, ma può percepire la seduta odontoiatrica come un evento nocivo, arrivando addirittura ad essere odontofobico.

Il cortisolo è rilevabile nel sangue, nelle urine, nei capelli e nella saliva. Per il nostro studio si è preferito la valutazione del solo tampone salivare. I vantaggi sono la semplicità della raccolta e dell'analisi del campione, senza creare *discomfort* al paziente. Gli altri test sono risultati essere sì efficaci, ma eccessivamente dispendiosi in termini economici e pratici.

Il cortisolo, noto anche come ormone dello stress, segue nella saliva un andamento giornaliero. Tenzialmente nei 20 minuti dopo la sveglia si ha il picco massimo, dopo 90 minuti diminuisce quasi del 50% e si ferma al valore raggiunto per 3-8 ore. I livelli diminuiscono gradualmente arrivando quasi a 0 dopo 14 ore.

La raccolta del materiale biologico avviene in tre momenti: il giorno precedente al trattamento, 15 minuti prima e a 25 minuti dopo la seduta.

Il tampone viene, poi, riposto all'interno di un contenitore e analizzato da uno strumento chiamato spettrofotometro. Questo irradia il campione, eccitando così gli atomi di quest'ultimo e portandoli a uno stato superiore di energia. La conseguenza è la liberazione di energia. A ogni tipo di energia corrisponde un legame chimico e a ogni picco corrisponde una determinata lunghezza d'onda.

La saliva contiene numerose sostanze oltre al cortisolo tra cui acqua (98%), elettroliti, muco, IgA, enzimi.

Lo spettrofotometro evidenzia per ogni componente della saliva gli specifici picchi. Si è dovuto perciò tarare lo spettrofotometro in base ai valori di cortisolo puro, così da poter individuare i punti massimi della curva.

CAPITOLO 1 PROTOSSIDO DI AZOTO

1.1 Cenni storici

Il Protossido di azoto o ossido di diazoto, noto anche come gas esilarante è un gas inodore, incolore, non irritante, non infiammabile, dall'odore gradevole e leggermente dolce.

Combinato con ossigeno ha proprietà ansiolitiche, analgesiche e amnesiche ed è caratterizzato da rapida insorgenza, reversibilità e buona tollerabilità (non produce reazioni allergiche), facilità nella gestione delle concentrazioni e applicazione senza ago.

Generalmente produce sensazioni piacevoli che possono aiutare un paziente a rilassarsi. (1)

Nel 1767 il fisico e chimico Joseph Black sembra aver inavvertitamente preparato ossido nitroso scaldando nitrato di ammonio.

Questo gas è stato sintetizzato da Joseph Priestley nel 1772. Questa scoperta, come molte nel campo della chimica e della medicina, fu evento inaspettato e sorprendente. Gli interessi di Priestley per i gas di azoto nacquero dallo studio di due sostanze chimicamente simili, ossido nitrico e diossido di azoto. (52)

Alla fine del diciottesimo secolo il chimico Humphry Davy lo descrisse per la prima volta in una opera come sostanza in grado di annullare il dolore fisico, con possibile uso vantaggioso durante le operazioni chirurgiche. Questi furono i primi concetti di moderna anesthesiologia. (50)

La sintesi di N_2O è rimasta praticamente inalterata. Le caratteristiche di sicurezza, convenienza economica e rapido utilizzo lo hanno reso uno dei più popolari anestetici del XX secolo.

N₂O rimase una scoperta scientifica puramente accademica fino alla fine di quel secolo quando venne nuovamente preso in analisi da Thomas Beddoes e Humphrey Davy. (2)

Successivamente cominciò ad essere utilizzato in medicina come anestetico: la prima applicazione clinica fu nel 1844 da parte del dentista americano Horace Wells, che lo usò per controllare il dolore durante le estrazioni dentali. Da allora, N₂O ha condiviso una storia di 170 anni con la moderna anestesia dentale evitando così di coinvolgere un medico anestesista e avendo il vantaggio di tenere il paziente sufficientemente vigile e sveglio. (3)

Dal 1880 la miscela 50/50 di ossido di azoto e ossigeno è stata utilizzata come antidolorifico durante il parto, anche se il suo uso in questo contesto sembra essere in calo per via della non affidabilità nel sollievo dal dolore.

Celebri filosofi e psicologi lo utilizzarono come metodo per l'indagine filosofica e per accedere all'intuizione mistica. Gli effetti descritti furono brivido esteso dal torace alle estremità, aumentata sensibilità visiva, uditiva e di piacere e reazioni allucinogene.

Le conseguenze di questo gas vennero addirittura raccontate umoristicamente dai cortometraggi di Charlie Chaplin.

1.2 Impieghi

1.2.1 Gas esilarante

Dalla fine del '700 è stato impiegato per scopi ricreativi. A quell'epoca allietava i cosiddetti laughing gas parties della borghesia inglese.

I più frequenti effetti nell'uso dilettevole sono leggerezza corporea, cambiamenti nelle percezioni tattili, visive e uditive, disorientamento, vertigini, diminuzione dei livelli d'ansia, aumento del senso dell'umorismo, distacco da sé stessi e dall'ambiente attorno. (51)

È stato segnalato dal gruppo di ricercatori guidato da Stephen J Kaar in UK l'N2O sia l'ottava più frequente sostanza di cui si abusa. Solitamente viene consumato attraverso palloncini riempiti di gas. Normalmente non viene usata frequentemente da questi consumatori e non è associata ad un significativo pericolo. (4)

Analizzando un campione di 4883 consumatori si ha la conferma che N2O sia associato con allucinazioni, stato confusionale, persistente torpore e lesioni accidentali, rispettivamente 27.8%, 23.9%, 4.3% e 1.2% dei consumatori considerati. Dovrebbero però essere completati ulteriori studi per confermare la presenza di persistenti sintomi neurologici per chi ne fa uso ricreazionale. (4)

1.2.2 Settore alimentare

L' N2O viene utilizzato nella fabbricazione di prodotti lattiero-caseari come additivo e molto spesso come propellente nella panna montata spray.

In cucina il sifone da spuma è uno strumento utilizzato per produrre spume dei più svariati alimenti che, una volta ridotti in crema, vengono inseriti nel sifone, raffreddati, e spruzzati infine con il sifone dotato di cartucce di N2O, ottenendo un alimento cremoso e di consistenza particolare che dà in bocca una sensazione gradevole. Molti cuochi recentemente hanno adottato questo strumento nelle preparazioni di cucina molecolare. (5)

1.2.3 Motori a scoppio

N2O viene inoltre utilizzato per incrementare le prestazioni nei motori da competizione: una bomboletta ad alta pressione di N2O viene inserita nel circuito di alimentazione del motore in modo che il gas, scaldato oltre i 300°, rilasci l'ossigeno derivante dalla scissione, consentendo la sovralimentazione, cioè l'immissione di più carburante nel motore. Un altro vantaggio deriva dal fatto che il gas, passando dallo stato liquido a gassoso una volta vaporizzato nel

collettore di alimentazione sottrae calore, abbassando la temperatura dell'aria immessa nel motore. (6)

1.2.4 Propellente in motori chimici per razzi

Viene inoltre impiegato come additivo ad altri elementi combustibili nei motori ibridi dei razzi. In alcuni modelli di razzi, per esempio, viene utilizzata la paraffina come carburante, abbinata all' N_2O come ossidante.

1.2.5 Presenza in natura

Il protossido di azoto è presente nell'atmosfera ed è considerato uno dei gas serra più importanti, il terzo dopo l'anidride carbonica ed il metano. In termini relativi è presente in piccola quantità nell'ambiente, ma è molto potente nell'assorbire energia infrarossa riscaldando l'atmosfera (secondo alcune stime, a parità di quantità, l'effetto serra che genera è 300 volte superiore a quello dell'anidride carbonica) e possiede un tempo di permanenza più lungo di altri gas serra (circa 150 anni). Questo N_2O è generato per due terzi da fonti naturali e per un terzo è conseguenza dell'azione umana. La principale fonte biogenica naturale è la denitrificazione dei terreni, generata da una carenza di ossigeno nel suolo dovuta a ristagno idrico che determina la perdita dell'azoto, il quale viene sottratto al terreno generando N_2O in forma gassosa. Le emissioni dovute all'azione dell'uomo sono principalmente originate dall'agricoltura in conseguenza della grande diffusione dell'uso di fertilizzanti azotati, ma anche dagli allevamenti estensivi (le deiezioni degli animali generano N_2O) e dalla combustione della biomassa per generare energia. (7) (8)

1.3 Applicazione odontoiatrica

Oggigiorno secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità il protossido di azoto è uno dei farmaci indispensabili.

A fine Ottocento veniva fatto inspirare direttamente da un inalatore consistente in un sacchetto fatto di tessuto. Attualmente negli studi odontoiatrici il gas viene

somministrato da una macchina che regola il dosaggio sul vaporizzatore in base ai respiri del paziente, con una proporzione 2 a 1 di Ossido nitroso e Ossigeno. Se l'esposizione risultasse troppo rapida o eccessiva si potrebbero avere come conseguenze nausea e confusione persistente.

Sembra inoltre che l'anestesia con protossido di azoto possa essere utile nel ridurre il dolore cronico postoperatorio. (9)

1.3.1 Diffusione

Secondo "Survey of American Academy of Pediatric Dentistry on Nitrous Oxide and Sedation: 20 Years Later" dal 1996 si sono verificati cambiamenti nell'uso del protossido di azoto, tra cui: una percentuale maggiore di professionisti che usano N₂O; percezioni che più pazienti pediatrici hanno bisogno di N₂O; uno spostamento nell'uso di N₂O per durata dell'esperienza del professionista; una maggiore percentuale di intervistati certificati; e possibili crescenti preoccupazioni dei genitori a riguardo. (10)

Per la paziente incinta che è in stato di apprensione e necessita di cure dentistiche urgenti, il protossido d'azoto dovrebbe essere considerato l'agente sedativo di scelta. Qualsiasi evidenza di complicazioni durante la gravidanza giustifica certamente la consultazione con l'ostetrica della paziente.

1.3.2 Possibili complicanze

L'utilizzo frequente, cronico, in dosi massicce e l'abuso possono provocare polineuropatia, degenerazioni delle cellule nervose e severe carenze di vitamina B12. Inoltre l'inalazione del gas sopprime il bisogno d'aria, se l'assunzione non è alternata con inspirazioni ricche d'ossigeno può portare all'asfissia. Quest'ultima ha causato negli anni diversi decessi. (3)

1.3.3 Controindicazioni

Come qualsiasi altro agente farmacologico, il protossido d'azoto può non essere adatto a tutti i pazienti. Fondamentale è analizzare l'anamnesi di un paziente e considerare il piccolo numero di situazioni in cui la sedazione con protossido di azoto può essere controindicata o può almeno rappresentare una controindicazione relativa.

Le controindicazioni assolute sono: ostruzioni nasali anatomiche e/o indotte da malattia (come setto deviato, polipi nasali, infezioni delle vie respiratorie superiori, rinite allergica e sinusite grave) e disturbi psicologici o cognitivi (pazienti pediatrici gravemente fobici, con disturbi cognitivi o non collaborativi). Qualsiasi compromesso nella pervietà della tuba di Eustachio può portare ad aumenti di pressione all'interno dell'orecchio medio. Quindi, è controindicato l'impiego del protossido di azoto in caso di recente intervento chirurgico dell'orecchio. Altre controindicazioni relative sono la malattia polmonare ostruttiva cronica ostruttiva e la sinusite. (19)

Dovrebbe infine essere usato con cautela quando vengono trattati quelli con diagnosi di schizofrenia o disturbo bipolare. Questi pazienti sono trattati con molti agenti psicotropi, e l'uso del protossido di azoto può ulteriormente alterare la disposizione, portando a risultati altamente imprevedibili. La consultazione medica è fortemente incoraggiata per questi pazienti.

CAPITOLO 2 SEDAZIONE COSCIENTE CON PROTOSSIDO

2.1 Approcci pratici e psicologici

La sedazione cosciente con N₂O può costituire un supporto per ridurre l'ansia del paziente pediatrico. È però necessario applicare alcune accortezze per assicurarne l'efficacia.

2.1.1 Ambiente e appuntamenti

Oltre allo scopo della visita, uno dei fattori ambientali che possono causare ansia prima del trattamento dentale include la *waiting room experience*, in particolare il tempo di attesa e l'ambiente della sala di attesa. Non si sono evidenziate differenze importanti in termini di ansia sulla base della tipologia delle sale di attesa, quelle di tipo multisensoriale e quelle tradizionali. Nelle prime i piccoli pazienti potevano usufruire di musica di sottofondo e di una colonna luminosa che potevano toccare e su cui potevano arrampicarsi.

Confrontando i tempi di attesa e lo scopo della visita, invece, si è visto come l'ansia dentale fosse significativamente più elevata in pazienti con tempi di attesa maggiori o in pazienti sottoposti a procedure di emergenza.

Perciò l'ideale per i piccoli pazienti sarebbe evitare i trattamenti di emergenza, programmare visite odontoiatriche di routine e diminuire il tempo di attesa. (13)

2.1.2 Ansia dei genitori

Anche l'avere una madre ansiosa porta ad influenzare l'ansia dei bambini nell'81.3% dei casi. Per questo dobbiamo cercare di contenerla il più possibile. (14)

2.1.3 Distrazioni e visualizzazione di immagini positive

L'ansia percepita viene ridotta significativamente dalle visual distraction rispetto al convenzionale metodo tell-show-do. (15)

L'effetto delle immagini dentali positive è efficace nella riduzione dell'ansia, rispetto alle immagini neutre, misurate con il test di Venham. (16)

Le immagini positive associano l'odontoiatria a rappresentazioni familiari e felici (come tre bambini sorridenti o un orsacchiotto seduti su una poltrona

odontoiatrica) con l'obiettivo di mostrare le visite odontoiatriche in un'ottica positiva. (16)

2.1.4 Comportamento del team odontoiatrico

I comportamenti del dentista e del suo staff sono i mezzi principali per guidare il comportamento del paziente pediatrico. Fondamentali sono l'atteggiamento, il linguaggio del corpo e le capacità comunicative del dentista per creare una visita odontoiatrica positiva per il bambino e ottenere la fiducia del bambino e del genitore. I comportamenti del dentista e del personale includono comunicazione empatica e adeguato contatto fisico accompagnato da rassicurazione verbale.

La comunicazione si realizza attraverso il dialogo, il tono della voce, l'espressione facciale e il linguaggio del corpo. La comunicazione tra personale medico, bambino e genitori è di primaria importanza per ottenere risultati positivi. I quattro punti da rispettare nella comunicazione sono:

- il mittente
- il messaggio (l'espressione facciale e il linguaggio del corpo del mittente)
- il contesto o l'impostazione in cui viene veicolato il messaggio
- il ricevente (17)

Lo sviluppo cognitivo e la maturità del bambino determineranno il livello e la quantità di interscambio di informazioni. È dunque compito del dentista usare un vocabolario e un linguaggio del corpo appropriati per inviare messaggi coerenti con lo sviluppo intellettuale del ricevente.

Quando il linguaggio del corpo trasmette incertezza, ansia o urgenza, il dentista non riesce a comunicare efficacemente la fiducia nelle sue capacità cliniche.

È fondamentale il contesto nel quale i messaggi sono inviati. Se ci fossero delle distrazioni, come ad esempio un altro bambino che piange, si potrà avere ansia e interferenza nella comunicazione.

Il comportamento comunicativo dei dentisti è un fattore importante nella soddisfazione del paziente. Tra le azioni che compie il dentista che sono correlate alla scarsa soddisfazione dei genitori, vi sono la fretta durante gli appuntamenti, la mancanza di tempo per spiegare le procedure, l'esclusione dei genitori dalla sala esami e l'impazienza. In qualunque caso quando l'odontoiatra offre empatia e genuina preoccupazione, ci può essere una migliore accettazione di cura.

Se da un lato alcuni pazienti possono preferire un dentista di un genere specifico, dall'altro si è scoperto che i professionisti di sesso femminile e maschile trattano i pazienti e i genitori in modo simile.

Essenziale è che il personale clinico sia un'estensione del dentista nella guida comportamentale del paziente e nella comunicazione con il genitore. La collaborazione assicura che sia il paziente che il genitore abbiano un'esperienza dentale positiva. (18)

2.2 Funzionamento, componenti dell'apparecchio ed erogazione

Ciascun apparecchio è costituito da vari componenti:

- due bombole
- monitor
- mascherina nasale (silhouette)
- tubo di evacuazione
- palloncino



Una bombola contiene protossido di azoto (colore blu), mentre l'altra ossigeno (colore bianco). Le bombole hanno entrambe la capienza di 5 L, quella del protossido è a 50 atmosfere, mentre quella dell'ossigeno è a 25 atmosfere. A ciascuna bombola è collegato un manometro che indica il gas a disposizione.

Sul monitor sono indicate la percentuale di ossigeno e il flusso di aria al minuto. I valori nell'adulto sono di circa 6-7 litri/minuto, mentre nel bambino 4-5 litri/minuto.

Il tubo di evacuazione va attaccato all'aspiratore, così da evitare la dispersione del gas.

È necessario controllare sempre:

- il gonfiore del palloncino di scambio di aria: se troppo sgonfio si deve aumentare il volume/minuto
- la buona adesione della mascherina al viso del paziente nel caso in cui sia troppo gonfio si deve diminuire il volume/minuto e verificare se il flusso è stato bloccato in qualche parte lungo il suo percorso verso il paziente; normalmente il palloncino deve essere modestamente gonfio.

In mancanza di ossigeno la macchina si blocca.

Possiamo suddividere le fasi pratiche della sedazione cosciente in:

- Posizionamento del paziente nella posizione più confortevole e rilassante
- Scelta della mascherina nasale
- Apertura delle bombole: in senso antiorario fino all'arresto, poi si richiudono di mezzo giro
- Monitoring: devono essere monitorati numerosi parametri quali pressione del sangue, saturazione dell'ossigeno e frequenza cardiaca. Il pulsossimetro viene

lasciato sul dito del paziente durante l'intera durata della sedazione per misurare la frequenza cardiaca

- Induzione della sedazione
- Controllo della saturazione di ossigeno: terminata la sedazione si consiglia di somministrare ossigeno puro per circa 1 minuto fino a che la saturazione di ossigeno non abbia raggiunto il 99-100%

È opportuno istruire il paziente sul comportamento da tenere nelle varie fasi della sedazione. Nella fase di induzione della sedazione si esegue la titolazione, andando così ad individuare la corretta baseline del paziente.

La baseline è la dose efficace per la sedazione in quel paziente. È variabile in base a numerosi fattori quali stress, ansia, consumo di alcolici o fumo.

La baseline può essere suddivisa in:

- Baseline di sedazione, in cui si ha la riduzione del vomito e riduzione della soglia del dolore
- Baseline di benessere psicofisico, in cui il paziente si sente più rilassato e si sente molto bene

Non sempre bisogna portare il paziente alla base-line del benessere psicofisico.

È fondamentale il riconoscimento dei segni e dei sintomi del limite che non deve essere superato. L'odontoiatra infatti non può superare il piano 3 dello stadio I dell'anestesia.

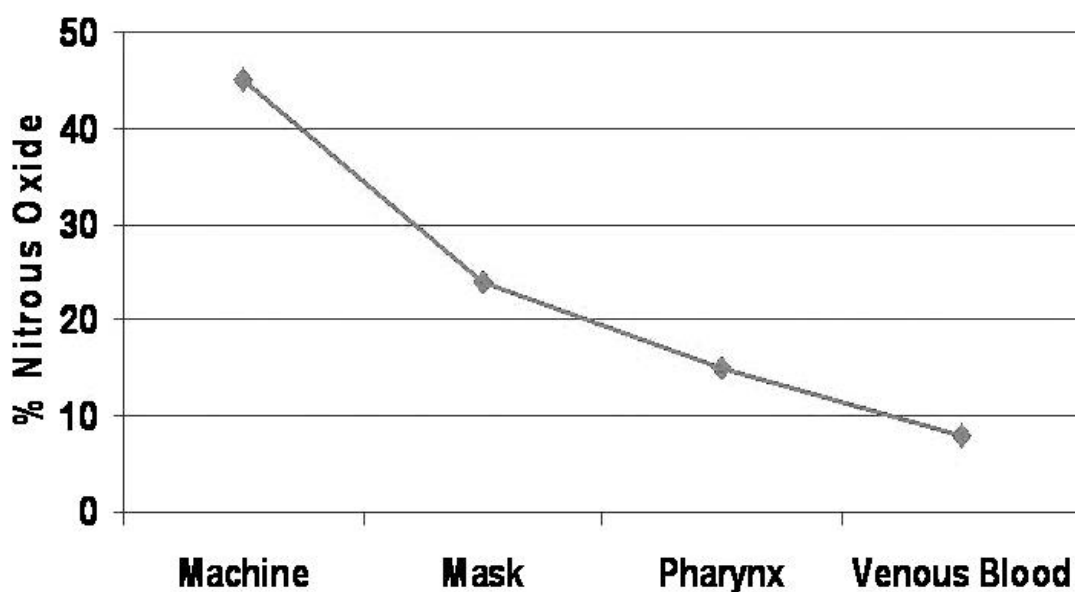
Durante la titolazione si riduce progressivamente la percentuale di ossigeno del 5% e si deve procedere ponendo domande al paziente riguardo il suo stato di rilassamento.

Perciò bisogna valutare oltre al riscontro del paziente, anche i battiti per minuto e la saturazione dell'ossigeno. Andando in sovradosaggio di protossido di azoto si ottiene un abbassamento della saturazione e un respiro più prolungato. Durante la sedazione la saturazione dell'ossigeno non deve scendere al di sotto del 95%, in modo tale da evitare le conseguenze cliniche da sovradosaggio.

In caso di sovradosaggio il paziente può manifestare nel post-operatorio emicrania, nausea e vomito.



La concentrazione di protossido d'azoto che esce dal riunito, e quindi la sua pressione parziale, non è identica a quella che raggiunge gli alveoli. Fattori come maschere nasali mal montate, spazio morto, respirazione in bocca e stato ventilatorio del paziente influenzano questa discrepanza. Anche se le impostazioni della macchina possono indicare fino al 70% di protossido di azoto, è improbabile che la concentrazione effettiva erogata agli alveoli superi il 30-50%. È perciò improbabile che si possano erogare più di 0,3-0,5 MAC con l'uso di unità di protossido di azoto standard. Proprio per questo dobbiamo valutare con una certa attenzione e un certo senso critico gli studi sull'uso dell' N_2O .



2.3 Farmacologia

Il protossido d'azoto è l'anestetico per inalazione più comunemente usato in odontoiatria ed è frequentemente adottato anche nei centri di emergenza e nei centri di chirurgia ambulatoriale. Se usato da solo, non è in grado attuare l'anestesia generale, può essere combinato con altri agenti inalatori e/o endovenosi in tecniche sedative o anestetiche generali. Impiegato singolarmente è estremamente sicuro e fornisce una sedazione minima e moderata per i pazienti odontoiatrici apprensivi.

2.3.1 Proprietà farmacocinetiche

L'assorbimento e la distribuzione di un gas anestetico ai tessuti cerebrali dipende in gran parte dai suoi coefficienti di ripartizione. Proprio per questo motivo, il protossido di azoto ha insorgenza più rapida degli altri agenti inalatori. Viene trasportato nel sangue come gas libero; non si combina con l'emoglobina e non subisce biotrasformazioni. L'eliminazione avviene per espirazione in un modo che è esattamente l'inverso dell'assorbimento e della distribuzione, e la sua bassa solubilità permette di rimuovere rapidamente il protossido d'azoto.

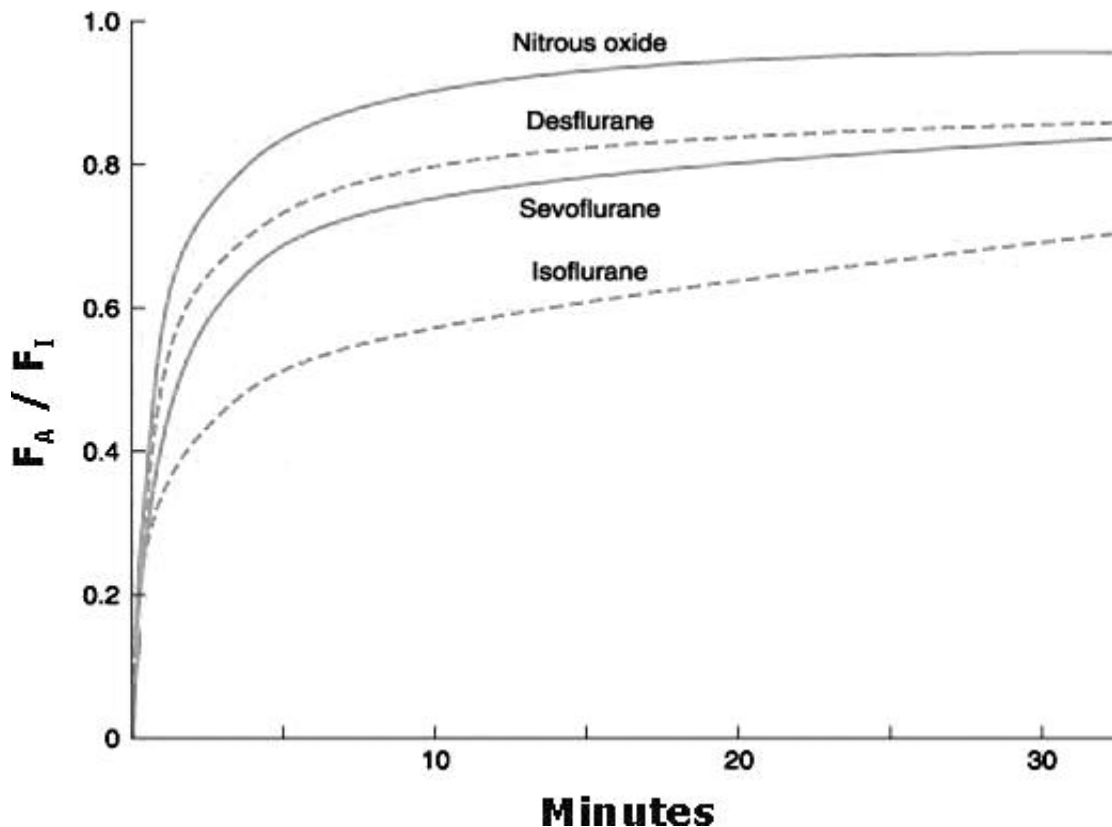
Possiede una bassa potenza ($MAC = 104$), ma essendo così sicuro permette l'uso di concentrazioni sub-MAC che sono ideali per alleviare l'apprensione e l'ansia. È considerato un gas inerte e benigno che ha poca o nessuna influenza sulle funzioni fisiologiche vitali: le funzioni respiratorie e cardiovascolari sono solo in minima parte influenzate, soprattutto se comparate con i cambiamenti prodotti da agenti più potenti.

Se il protossido d'azoto si trova in combinazione con altri anestetici, sedativi o oppioidi, allora questi agenti abbassano il MAC per il protossido d'azoto e lavorano sinergicamente per deprimere le funzioni respiratorie e cardiovascolari.

Anche se il 50% dei pazienti richiede più di 1 MAC per l'anestesia chirurgica, alcuni pazienti sono anestetizzati a concentrazioni più basse. Inoltre, il MAC di un particolare gas anestetico è spesso più basso nei bambini piccoli, negli anziani e nelle persone compromesse dal punto di vista medico. Inoltre, il MAC è abbassato dalla somministrazione concomitante di altri depressivi del SNC come oppioidi e sedativi. (19)

I gas assorbono e si distribuiscono come risultato dei gradienti di pressione e si equilibrano quando le pressioni parziali del gas inspirato sono uguali a quelle degli alveoli, del sangue e dei tessuti. I gas che hanno bassa solubilità nel sangue e nel tessuto adiposo raggiungeranno le tensioni e si equilibreranno più rapidamente. Questa tensione nel sangue fornisce la forza motrice per gli agenti inalatori per entrare nel cervello, dove si verifica la loro azione anestetica.

Osservando la tabella si noti come il protossido d'azoto abbia una solubilità molto bassa e quindi raggiunge l'equilibrio più rapidamente. Per questo motivo, il protossido di azoto ha l'insorgenza più rapida tra gli agenti inalatori.



Quando le tensioni dei gas in tutti i tessuti del corpo si equilibrano, la tensione dei gas ispirati (F_I) sarà uguale a quella degli alveoli (F_A). Da questo grafico si evince che il protossido d'azoto raggiunge circa il 90% di equilibrio entro 10 minuti.

Quando la somministrazione di gas anestetici è discontinua, la tensione alveolare fallisce, e l'equilibrio procede dai tessuti al sangue venoso e agli alveoli per l'espiazione. Gli anestetici per inalazione che hanno i coefficienti di distribuzione più bassi mostrano le più rapide insorgenza e cessazione degli effetti, il che li rende più adatti per i casi che richiedono alterazioni intermittenti durante l'anestesia. (19)

La dose di un gas anestetico per via inalatoria è espressa in percentuale nella miscela inspirata. Si parla di MAC o concentrazione minima alveolare che rappresenta la percentuale o la concentrazione del gas a 1 atmosfera che permette al 50% dei pazienti di essere insensibili ad uno stimolo chirurgico. Il protossido d'azoto è il meno potente dei gas anestetici, avendo un MAC di 104.

Oltre il 90% dei pazienti viene anestetizzato con la somministrazione di 1,3 MAC. Per i rimanenti servirà un dosaggio da 1,5 a 2,0 MAC.

Bisogna ricordare che il MAC è una misura della risposta alla dose di un agente inalatorio nella produzione di anestesia. Gli aumenti incrementali di MAC non prevedono con precisione l'influenza sulla funzione respiratoria o cardiovascolare. Perciò 0,5 MAC di un agente inalatorio non producono necessariamente la metà dell'influenza sulla pressione sanguigna che viene prodotta da 1,0 MAC.

L' N_2O , come tutti gli agenti inalatori, può deprimere la respirazione e la circolazione, in particolare nei pazienti con funzioni precedentemente compromesse. Tutti questi agenti tendono ad aumentare la frequenza respiratoria, ma a diminuire il volume respiratorio. La loro influenza sulla ventilazione comporta ipercapnia durante la somministrazione. Diverso è il caso del protossido che non riduce la ventilazione netta. (19)

	<i>Nitrous Oxide</i>	<i>Isoflurane</i>	<i>Desflurane</i>	<i>Sevoflurane</i>
Blood pressure	↔	↓ ↓	↓ ↓	↓
Heart rate	↔	↑ ↓	↔ ↑	↔
Tidal volume	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓
Respiratory rate	↑	↑	↑	↑
Net ventilation	↔ ↑	↓	↓ ↓	↓

Quando l'inalazione di alte concentrazioni di protossido di azoto viene interrotta, l'alta pressione parziale nel sangue trasferisce rapidamente il protossido di azoto agli alveoli. Questo diluisce la pressione parziale dell'ossigeno negli alveoli e può portare all'ipossiemia. Per questo normalmente si fornisce al paziente il 100% di ossigeno durante i primi minuti successivi all'interruzione del protossido d'azoto. Questa preoccupazione è tuttavia più teorica che clinica, infatti l'ipossiemia è

significativa solo per pochi minuti ed è stata documentata solo a concentrazioni >70% ed erogate con maschera integrale o con tubo endotracheale. (19)

Il protossido di azoto produce un lieve effetto analgesico a concentrazioni sub-anestetiche. Il meccanismo di questo effetto implica molto probabilmente un'interazione con il sistema endogeno degli oppioidi perché viene abolito dalla somministrazione dell'antagonista degli oppioidi, il naloxone. Il protossido d'azoto infatti stimola il rilascio di encefaline, che si legano ai recettori degli oppioidi che innescano vie noradrenergiche discendenti. È stato evidenziato come il 30% di protossido d'azoto somministrato con maschera completa equivale a 10-15 mg di morfina. Questa interazione con il sistema endogeno degli oppioidi può spiegare in parte il potenziale di abuso attribuito al protossido d'azoto.

Aumenta il flusso sanguigno cerebrale e la pressione intracranica, diminuendo il consumo di ossigeno cerebrale. Come l'ossigeno, supporta la combustione. Inoltre l' N_2O ha la capacità di produrre lesioni permanenti inattivando la vitamina B, che è componente dell'enzima metionina sintetasi. (20)

2.3.2 Controindicazioni

Il volume del gas e la pressione possono diventare pericolosamente elevati nel caso di ostruzione intestinale, di pneumotorace o di infiammazione della tuba di Eustachio.

La rottura della membrana timpanica è possibile durante la somministrazione di protossido di azoto, e la pressione negativa può svilupparsi dopo l'interruzione, portando a otite sierosa che può contribuire a nausea postoperatoria e vomito.

2.3.3 Tossicità cronica

Gli effetti avversi includono infertilità, aborto spontaneo, discrasie ematiche e deficit neurologici. Queste preoccupazioni riguardano solo l'esposizione cronica; si presume che i pazienti chirurgici sani potrebbero ricevere protossido di azoto senza danni.

Il protossido d'azoto ossida irreversibilmente l'atomo di cobalto della vitamina B12 e quindi riduce l'attività degli enzimi B12-dipendenti come la metionina e le sintetasi di timidilato. Questi enzimi sono vitali nella sintesi della mielina e degli acidi nucleici.

Si osservano cambiamenti megaloblastici nel midollo osseo dopo l'esposizione a concentrazioni anestetiche per 24 ore, e l'agranulocitosi è evidente dopo 4 giorni di esposizione. Studi su animali che hanno utilizzato l'esposizione intermittente a tracce di vari gas anestetici non hanno rivelato alcun effetto riproduttivo dannoso.

2.3.4 Farmacodinamica

Lo studio "Analysis of brain connectivity during nitrous oxide sedation using graph theory" analizza il cambiamento nel network cerebrale durante la sedazione con protossido di azoto. I partecipanti erano 20 volontari sani (10 uomini e 10 donne tra i 20 e i 40 anni) che non avevano avuto malattie sistemiche.

Successivamente alla sua somministrazione si verificano dei cambiamenti nei parametri di rete cerebrale che interferiscono con l'efficienza con i processi cognitivi e le attività di attenzione. (24)

CAPITOLO 3 STRESS

3.1 Descrizione

Si definisce come stress qualsiasi situazione che di fatto o anche solo potenzialmente possa essere una minaccia per l'organismo al mantenimento dell'omeostasi. Tra i fattori causali sono presenti condizioni fisiche quali disidratazione, emorragia, infezioni, esposizione a temperature estreme, traumi, sforzi fisici, condizioni psicologiche quali sofferenza, paura o ansia. (46)

Il sistema nervoso simpatico e l'adrenalina inibiscono la secrezione di insulina e stimolano la secrezione di glucagone, promuovendo indirettamente le variazioni metaboliche della fase di post-assorbimento. Anche SNS e adrenalina possono agire direttamente su alcuni tessuti bersaglio, favorendo variazioni metaboliche. (47)

La fase di post-assorbimento è caratterizzata dalla diminuzione del livello plasmatico di glucosio, che agisce sulle cellule alpha e beta del pancreas stimolando la liberazione di glucagone e inibendo quella di insulina.

Allo stesso modo, una diminuzione del glucosio plasmatico agisce direttamente sui recettori per il glucosio del SNC stimolando l'attività dei neuroni del SNS e causando un aumento di liberazione di adrenalina dalla midollare del surrene. L'aumento dell'adrenalina in circolo agisce sul fegato dove stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi, sulla muscolatura scheletrica dove stimola la glicogenolisi e sul tessuto adiposo dove stimola la lipolisi.

In condizioni normali il controllo simpatico del metabolismo gioca un ruolo minore rispetto all'insulina e al glucagone.

Il controllo simpatico diventa di fondamentale importanza nella reazione dell'organismo allo stress.

Quando si manifesta lo stress, si ha l'attivazione del SNS che scatena una serie di risposte definitive "lotta o fuggi" (aumento della frequenza cardiaca, vasocostrizione generalizzata, dilatazione delle vie aeree e altri effetti) e

aumenta i livelli plasmatici di glucosio (per via dell'aumento della gluconeogenesi e della glicogenolisi epatiche), degli acidi grassi e del glicerolo (dovuti all'aumentata lipolisi degli adipociti). Questi eventi rendono le sostanze energetiche più facilmente disponibili, contribuendo così a preparare l'organismo alla intensa attività fisica correlata alla risposta "lotta o fuggi". Così facendo l'organismo si prepara anche ad altre attività che richiedono energia, quali la riparazione dei tessuti e la difesa dalle infezioni. (26)

3.2 Parametri di valutazione dello stress dentale

Un metodo, usato in passato, per valutare lo stress dentale è il POQ, il questionario sulle origini fobiche. Successivamente è diventato popolare un questionario di auto-relazione di 16 articoli denominato Origins Questionnaire (OQ). Quest'ultimo mette in relazione la storia degli individui in relazione alla loro fobia. Si è riscontrato che il POQ indicava che il condizionamento fosse l'origine primaria della paura del 56% -78% delle volte. Di conseguenza, la validità costruttiva e la validità convergente del POQ sono risultate molto scarse. (56)

In tempi più recenti poiché la paura dentale può essere difficile da definire e misurare in modo efficace, la ricerca ha iniziato a creare una misurazione della paura dentale più pratica, affidabile e teoricamente efficace. La ricerca ha scoperto che l'Indice di ansia e paura dentale (IDAF-4C +), sviluppato da Jason Armfield, presentava forti correlazioni statisticamente significative con le precedenti misure di paura dentale. La creazione di una nuova scala della paura dentale è stata conseguente a problemi con le scale esistenti all'epoca. (57)

È composto da 3 moduli, ciascuno con 8 elementi, l>IDAF-4C + analizza le risposte emotive, comportamentali, fisiologiche e cognitive legate alla paura dentale. Ogni modulo utilizza una scala Likert che varia da 1-5, dove 1 rappresenta "fortemente in disaccordo" e 5 rappresenta "fortemente d'accordo". Utilizzando un'analisi esplorativa, "tutti gli elementi hanno mostrato una buona coerenza interna e una certa affidabilità test-retest alla revisione di 4 mesi. (58)

Secondo un interessante studio si può eseguire una valutazione dello stress e dell'ansia usando un test psicologico come State-Trait Anxiety Inventory for Children o visual analog scale e un test fisiologico come del cortisolo salivare. (22)

Lo stress prenatale è stato associato all'alterazione dell'asse HPA in periodi successivi della vita. Questi studi si sono focalizzati sulla quantificazione di parametri come cortisolo e cortisone nelle urine, nella saliva e nel capello. Essi vengono misurati da un flusso turbolento in una cromatografia associato a un liquido da cromatografia molto performante. (23)

3.3 Metodi per diminuire lo stress dentale

Sono stati utilizzati svariati metodi con lo scopo di diminuire lo stress intraoperatorio. Questi trattamenti sono essenzialmente una forma di contro condizionamento per invertire la paura in uno stato di accettazione e calma.

Si possono inoltre effettuare questionari sull'ansia pretrattamento, terapia cognitivo comportamentale (CBT), terapia di rilassamento, apprendimento del rilassamento assistito da computer (CARL), ipnoterapia (HT), terapia di gruppo (GT), desensibilizzazione sistematica individuale (ISD), farmacologica, implosione e rilassamento della deglutizione e in ultimo consentire ai piccoli pazienti eseguire rappresentazioni grafiche.

3.3.1 Questionari sull'ansia pretrattamento

Si ritiene che questi sondaggi pretrattamento possano aiutare a migliorare l'assistenza ai pazienti; tuttavia sarebbe interessante valutare l'attuale tasso di utilizzo di questi sondaggi e metodi di ansia per incoraggiare questa pratica. (59)

3.3.2 Desensibilizzazione sistematica individuale e terapia di gruppo

La desensibilizzazione sistematica individuale (ISD) è una terapia comportamentale in base alla quale gli individui vengono gradualmente esposti o incrementati a stimoli spaventosi. In questo processo, l'individuo deve prima identificare e accettare lo stimolo legato alla paura; secondo, l'individuo deve

imparare a impiegare una tecnica di rilassamento o di *coping*; e infine, l'individuo deve utilizzare il rilassamento appreso o la strategia di *coping* per reagire e superare lo stimolo pauroso. Si è scoperto che dopo 3 anni, il 65,5% dei pazienti con ISD controllavano bene la loro ansia durante gli appuntamenti dentali (sebbene questi risultati non fossero significativi). In questo lavoro, l'ISD è stata una combinazione di terapia di rilassamento muscolare ed esposizioni video di situazioni e strumenti dentali minacciosi con formazione sulla consapevolezza della tensione e lezioni di controllo del respiro. Sfortunatamente non si è identificata l'origine della paura dei partecipanti, pertanto sarebbero necessarie ulteriori ricerche. (60)

3.3.3 Inondazioni / implosione

L'inondazione è una forma di desensibilizzazione per il trattamento delle fobie quando il paziente ha un'origine della paura direttamente condizionata (origine 2). Nella terapia di inondazioni, il paziente è sottoposto a ripetute esposizioni di stimoli che inducono paura fino a quando non mostrano più una risposta di paura, causando l'interruzione della CR. L'implosione è usata per origini di paura indirette o non condizionate (Origini 1 e 3) che possono essere immaginate.

Si è riportato che tra i soggetti che hanno partecipato a due o più sessioni di questa tecnica, il 48% ha completato con successo i trattamenti odontoiatrici nei due mesi successivi. Non sembrano essere state condotte ulteriori indagini su questo metodo. (61)

3.3.4 Terapia comportamentale cognitiva

La terapia cognitivo-comportamentale (CBT) è un approccio psicoterapico per affrontare le emozioni disfunzionali, i comportamenti e le cognizioni negativi utilizzando una serie di sessioni orientate agli obiettivi. Secondo un interessante studio si è verificato che su un gruppo di pazienti sottoposti a CBT per superare la loro paura dentale anziché la sedazione, il 90% ha continuato a essere in grado di partecipare agli appuntamenti dentali senza sedazione dieci anni dopo. La ricerca attuale sembra supportare la CBT e la terapia di rilassamento per il trattamento delle paure direttamente condizionate (Origine 2). (62)

3.3.5 Terapia di rilassamento

La terapia di rilassamento è una serie diversificata di pratiche volte a suscitare una risposta di rilassamento, inclusa una riduzione dei sintomi di eccitazione fisica complessiva. L'individuo fobico implementa una particolare tecnica di rilassamento mentale come respirazione lenta e conteggio della deglutizione per ridurre lo stress. Sembra che i genitori svolgano un ruolo più secondario nel trattamento della paura e dell'ansia dentale infantile. I risultati sembrano suggerire che la CBT sia più efficace, ma dovrebbe essere combinata con la guida dei genitori nel trattamento della paura dentale pediatrica. Estrapolando questi dati, una combinazione di CBT e guida al rilassamento può fornire un trattamento efficace delle paure dentali (Origine 1). (69)

3.3.6 Apprendimento al rilassamento computer assistito (CARL)

Un recente sviluppo nel trattamento della paura dentale è dato dal CARL.

È un trattamento auto-stimolante per coloro che soffrono di fobie dentali in particolare della fobia degli aghi. Il programma inizia con la spiegazione dell'obiettivo da raggiungere, seguito da attività e video su come affrontare la paura. Il programma si basa sulla teoria della desensibilizzazione sistematica.

Il CARL è risultato essere estremamente utile e ha ridotto significativamente l'ansia dentale generale e specifica per iniezione. Dopo l'impiego di questo metodo, il doppio dei partecipanti al CARL (35,3%) rispetto ai controlli (17,6%) era disponibile a ricevere un'iniezione. Le origini della paura dei partecipanti non sono state valutate, quindi sono necessarie ulteriori ricerche. (65)

3.3.7 Ipnoterapia (HT)

Forse uno dei trattamenti meno conosciuti per la paura dentale è l'HT.

Quest'ultima tenta di creare uno stato di cambiamento inconscio, in base al quale l'individuo forma nuove risposte, atteggiamenti e comportamenti a stimoli precedentemente temuti. Pochi studi hanno analizzato l'efficacia clinica dell'ipnoterapia. Nel 1995 una ricerca ha riferito che rispetto alle terapie psicofisiologiche come la CBT, l'HT non abbia ridotto in modo significativo la paura dentale. Sembra però che il motivo fosse che alcuni soggetti fossero

scoraggiati dal concetto di ipnoterapia e non fossero completamente ricettivi. Successivamente si è scoperto che sebbene il 54,5% dei pazienti trattati con HT fosse in grado di presenziare regolarmente agli appuntamenti dentali, a 3 anni dal trattamento, non vi era alcuna differenza tra i gruppi HT, GT o ISD. (66)

3.3.8 Terapia farmacologica

L'uso di protossido di azoto e benzodiazepine in odontoiatria è stato a lungo impiegato per ridurre l'ansia. N₂O è stato spesso paragonato all'efficacia della CBT e alle terapie di rilassamento. Secondo uno studio del 2001 non sono state riportate differenze significative tra N₂O e CBT o terapia di rilassamento applicata. Ciò ha suggerito che a breve termine, entrambi i trattamenti erano efficaci. L'analisi delle benzodiazepine quando combinata con ISD non ha ridotto il tempo complessivo della terapia e non è stata vantaggiosa per il trattamento della fobia da iniezione. I risultati potrebbero essere stati distorti dal fatto che la paura dentale di ciascun partecipante potrebbe avere origini diverse. Pertanto, sono necessarie ricerche per determinare se alcune origini della paura e dei percorsi sono più ricettivi agli agenti farmacologici rispetto ad altri. (71)

3.3.9 Rappresentazioni grafiche

Uno dei metodi più semplici e intuitivi è dato dal consentire ai pazienti di disegnare prima e dopo il trattamento. È risultato efficace nei piccoli pazienti. (25)

3.4 Odontofobia

L'odontofobia consiste nello sperimentare paura o ansia sproporzionata rispetto all'effettivo pericolo. Presenta particolari componenti psicosomatiche che incidono sulla salute dentale di coloro che ne soffrono. Si è osservato che le paure dentali non siano legate alla qualità della vita, ma lo siano invece al benessere psicologico, al funzionamento sociale e alla vitalità. (64)

Coloro che hanno livelli più elevati di paura dentale tendono ad evitare il dentista e si presentano in modo irregolare agli appuntamenti odontoiatrici e tendono anche a peggiorare propria salute orale. Questi dati sono coerenti con altri studi che hanno osservato che, sebbene i pazienti abbiano prenotato gli

appuntamenti, non si siano presentati alla visita o l'abbiano cancellata prematuramente per paura. (67)

Si è inoltre evidenziato come l'odontofobia comporti una certa impotenza sociale associata ad imbarazzo che deriva dalla cattiva salute orale: i pazienti possono essere talmente imbarazzati dalla loro scarsa igiene orale da evitare di vedere il dentista per paura di essere rimproverati. Comprendere la psicologia estremamente complessa della paura dentale è essenziale nella prevenzione e nel trattamento dell'ansia, della paura e delle fobie dentali. (72)

L'incidenza della paura e dell'ansia dentale sembra essere relativamente costante in tutto il mondo, con alcuni sottogruppi che riportano livelli più alti di altri. Uno studio australiano ha riferito che il 16,1% degli individui ha sperimentato alti livelli di paura dentale, in cui gli adulti di età compresa tra 40 e 64 anni hanno riportato una maggiore incidenza di paura dentale e, secondo quanto riferito, le femmine di qualsiasi età avevano più paura del dentista rispetto ai maschi. (70)

L'incidenza riportata di alta paura e ansia dentale era un poco più bassa in uno studio islandese, con solo il 10%, ma leggermente più alta nella popolazione di Singapore, al 17,1%. Uno studio interculturale su pazienti cinesi e danesi ha riportato una paura dentale da moderata a elevata nel 30% dei cinesi e nel 15% dei partecipanti danesi. (73)

La comprensione dei fattori alla base dell'eziologia e del mantenimento dell'ansia dentale può aiutare i dentisti e i ricercatori a sviluppare interventi per fornire anche a questi pazienti adeguate cure dentali.

Per comprendere la psicologia estremamente complessa della paura dentale è essenziale comprendere i possibili percorsi della paura e dell'ansia dentale.

I processi noti per contribuire all'eziologia della paura e della fobia dentale includono una varietà di fattori genetici, comportamentali e cognitivi. È probabile

che la paura / fobia dentale di un individuo sia stata creata coinvolgendo una moltitudine di fattori.

3.4.1 Vulnerabilità genetica

Gli individui con fobie specifiche, inclusa l'odontofobia, possono aver ereditato fattori di vulnerabilità genetica che li predispongono all'ansia in generale o ad alcune fobie specifiche. Mentre gli individui con fobia dentale non ereditano direttamente la fobia stessa, i fattori di vulnerabilità genetica possono interagire con altri elementi eziologici che causano la fobia. È stato suggerito che, sebbene la genetica sia in grado di prevedere alcuni fattori legati alla paura dentale, essa non sia strettamente correlata alla fobia. (76)

3.4.2 Affettività negativa

L'affettività negativa si riferisce a una vulnerabilità all'esperienza di stati emotivi negativi. L'affettività negativa sembra essere un tratto di personalità stabile che predispone gli individui a una serie di disturbi psicologici, tra cui le fobie. La relazione tra affettività negativa e fobia dentale non è stata ancora stabilita. (79)

3.4.3 Esperienza

Attraverso il processo di selezione naturale, gli individui che hanno prontamente acquisito risposte di paura ed elusione a situazioni veramente pericolose hanno trasmesso questa tendenza alla loro discendenza. Come tale, la specie umana è "preparata" per acquisire più prontamente reazioni di paura agli stimoli che potrebbero aver rappresentato un vero pericolo per i nostri antenati. La fobia dentale può far parte di una tendenza evolutivamente benefica a proteggere l'involucro del corpo dall'intrusione di oggetti non nutrizionali. (77)

3.4.4 Condizionamento cognitivo (pavloviano)

Il condizionamento classico (o pavloviano) si riferisce al processo mediante il quale uno stimolo precedentemente neutro acquisisce la capacità di suscitare direttamente una risposta accoppiando questo stimolo con un altro stimolo incondizionato (US) che suscita la stessa risposta. Ad esempio, un individuo che sperimenta una procedura dolorosa e la risposta incondizionata di ansia /paura durante una visita dentale può acquisire un'associazione condizionata tra il

dentista (lo stimolo condizionato) e l'ansia /la paura. La rappresentazione dello stimolo condizionato è quindi in grado di suscitare la risposta condizionata dell'ansia durante la successiva consultazione dentale del paziente. (74)

3.4.5 Condizionamento operante

Il condizionamento operante si riferisce a un processo in cui la frequenza di un comportamento particolare ("operante") viene modificata attraverso le conseguenze che seguono il comportamento. Alcuni comportamenti possono essere "rinforzati" (cioè aumentati in frequenza) attraverso la loro associazione con conseguenze positive ("rinforzo positivo") o attraverso la rimozione di conseguenze negative ("rinforzo negativo"). In alternativa, i comportamenti possono essere "puniti" (cioè ridotti in frequenza) se portano a conseguenze negative ("punizione positiva") o alla rimozione di conseguenze positive ("punizione negativa"). Per le fobie, il processo di punizione positiva (ad esempio, dolore e ansia che si verifica durante una visita dal dentista) e rinforzo negativo (ad esempio, la riduzione dell'ansia che si verifica quando l'individuo evita il dentista) sono ritenuti più importanti, e questi comprendono il modello a due fattori di Mowrer per l'acquisizione e la manutenzione della fobia. (80)

3.4.6 Condizionamento vicario

Oltre a contribuire direttamente all'acquisizione della fobia, Rachman propone che gli individui possano anche acquisire indirettamente risposte fobiche. Uno di questi percorsi è stato chiamato esperienza vicaria o condizionamento vicario. Nel condizionamento vicario, l'individuo acquisisce una risposta di paura vedendo la spaventosa esperienza degli altri. Nella fobia dentale, ad esempio, un bambino che osserva una risposta di paura di un genitore che frequenta il dentista può imparare indirettamente che la situazione rappresenta una minaccia significativa. (75)

3.4.7 Trasmissione verbale

Rachman propose un secondo percorso indiretto all'acquisizione della fobia chiamato "trasmissione verbale". In questo processo, l'individuo acquisisce una paura o una fobia attraverso l'apprendimento della pericolosità di una situazione

dagli altri senza osservarla direttamente. Nella fobia dentale, ad esempio, un individuo può ascoltare storie di altri su esperienze traumatiche o dolorose che hanno avuto durante il trattamento dentale, il che può portare a una paura appresa delle procedure dentali. (81)

3.4.8 Contenuto cognitivo

Esistono diverse cognizioni che sono state identificate come importanti nell'acquisizione e nel mantenimento dei disturbi d'ansia, tra cui fobie specifiche. Questi includono una serie di idee sulla probabilità e sulla gravità di esiti negativi. Inoltre, gli individui possono avere convinzioni sulla loro incapacità di far fronte a un risultato avverso. (78)

3.4.9 Distorsioni cognitive

Oltre al contenuto della cognizione, le fobie sono associate a pregiudizi nel processo cognitivo. Ad esempio, è noto che individui con disturbi d'ansia come le fobie hanno distorsioni della memoria in cui i ricordi di esperienze e informazioni coerenti con la minaccia vengono recuperati più facilmente. Sebbene il legame tra pregiudizio cognitivo e paura e ansia dentale sia plausibile, non sono state ancora condotte ricerche per confermarlo. (82)

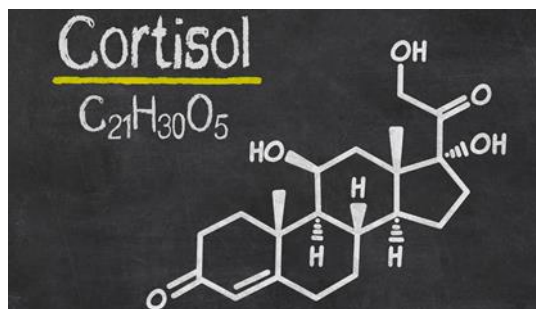
CAPITOLO 4 CORTISOLO

4.1 Descrizione e cenni di fisiologia

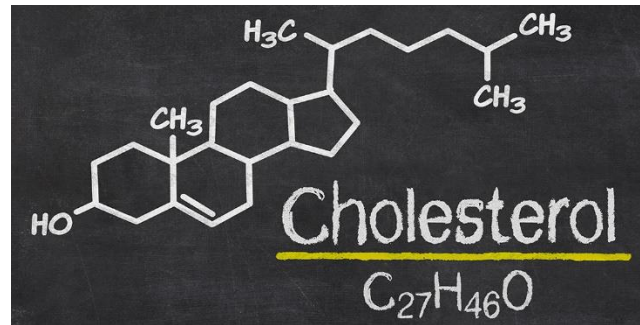
Il cortisolo è un ormone facente parte della tipologia degli steroidi, che a sua volta fa parte di quella dei lipidi.

I lipidi sono un gruppo di biomolecole la cui principale composizione è data da atomi di carbonio e di idrogeno uniti tra loro da legami covalenti non polari. Essi sono suddivisi in quattro classi: trigliceridi, fosfolipidi, eicosanoidi e steroidi.

Questi ultimi, di cui il cortisolo fa parte, hanno una struttura chimica formata da tre anelli a sei atomi di carbonio e da un anello a cinque atomi di carbonio.



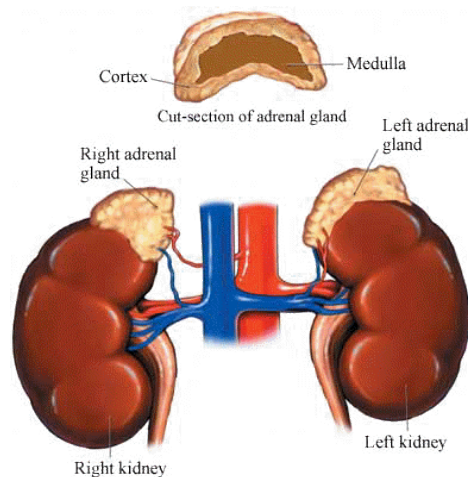
Il colesterolo, il più noto della categoria, è una molecola debolmente anfipatica per via della sua natura non polare e della presenza di un gruppo ossidrilico a un'estremità. Il colesterolo è precursore di tutti gli altri steroidi ed è uno dei più importanti componenti della membrana plasmatica cellulare. Molti steroidi fungono da ormoni, come il cortisolo, il testosterone e l'estradiolo. (26)



Il cortisolo viene prodotto e rilasciato dalle cellule della area fascicolata del surrene in risposta al suo precursore, l'ormone ipofisario ACTH.

La sua liberazione è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e, se non controllato, la sovrapproduzione e la sottoproduzione di cortisolo causano rispettivamente la sindrome di Cushing e la malattia di Addison. (27)

Le ghiandole surrenali sono due formazioni ghiandolari posizionate sulla porzione superiore di ciascun rene. Sono costituite da uno strato esterno denominato corticale (circa l'80% di tutta la massa) e da uno interno denominato midollare.

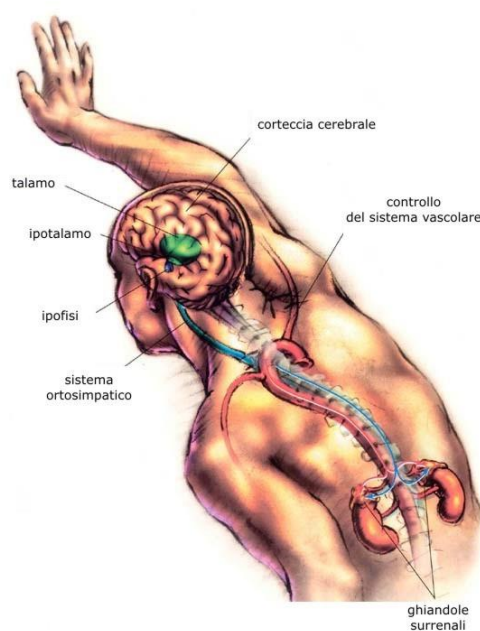


La corticale del surrene o corteccia surrenale si distingue in tre strati cellulari: uno strato più esterno chiamato zona glomerulare, uno strato intermedio detto zona fascicolare, e uno più interno definito zona reticolare. La corticale secerne

un gruppo di ormoni definiti adrenocorticoidi. Di questi ultimi fanno parte tre tipi di ormoni:

- Mineralcorticoidi (principalmente aldosterone) secreti esclusivamente dalla zona glomerulare che regolano il riassorbimento di sodio e l'escrezione di potassio nei reni
- Glucocorticoidi (principalmente cortisolo) secreti dalle cellule della zona fascicolata e della zona reticolare che regolano le risposte allo stress, il metabolismo proteico, glucidico e lipidico in svariati tessuti e anche i livelli plasmatici di glucosio
- Ormoni sessuali (principalmente androgeni) secreti dalle cellule della zona fascicolata e reticolare, oltre che dalle gonadi, che regolano prevalentemente la funzione riproduttiva. Negli individui di sesso maschile gli androgeni vengono secreti in quantità decisamente superiori dalle gonadi, mentre in quelli di sesso femminile gli androgeni surrenalici possono stimolare l'attività sessuale.

La midollare del surrene contiene cellule cromaffini che secernono catecolamine, di cui l'80% è dato dall'epinefrina (adrenalina), il 20% da norepinefrina (noradrenalina) e meno dell'1% da dopamina. (54)



Lo stress genera segnali nervosi che portano al coinvolgimento dell'ipotalamo che rilascia CRH, che stimola l'adenipofisi nel rilascio dell'ACTH. Quest'ultimo a sua volta induce la corticale del surrene ad aumentare la secrezione di cortisolo.

Così in azione, quest'ormone tende a inibire le funzioni non indispensabili in quel momento, garantendo il massimo sostegno agli organi vitali.

Si ricorda che quando la minaccia o la situazione di stress si dilegua, il sistema nervoso parasimpatico riduce la risposta del sistema nervoso ortosimpatico. (37)

Nelle patologie endocrine primarie l'origine dell'alterazione si riscontra nelle cellule endocrine secernenti gli ormoni. L'ipersecrezione primaria di cortisolo può essere dovuta ad una anomalia della ghiandola surrenale. L'eccesso di cortisolo nel sangue genera un feed-back negativo, che porta alla riduzione della secrezione di CRH e ACTH nel sangue.

Invece in caso di anomalia dell'adenipofisi si potrà avere ipersecrezione secondaria di cortisolo, come conseguenza di un'eccessiva secrezione di ACTH.

L'eccesso di ACTH nel sangue stimola infatti una eccessiva secrezione di cortisolo. Ciò produce un aumento del feedback negativo diretto all'ipotalamo, che riduce la secrezione di CRH.

Il rilascio di cortisolo è pulsatile ed è regolato da un ritmo circadiano, è infatti connesso al ciclo sonno-veglia e rischia di invertirsi negli individui che soffrono di insonnie.

Il ritmo circadiano del cortisolo nei neonati è già stabilito da un mese di età, prima di quanto dimostrato da studi precedenti. Gli studi più recenti forniscono anche intervalli di riferimento relativi al primo anno di vita dei livelli di cortisolo salivare nei neonati sani. (40)

Tra i fattori che possono generare stress distinguiamo quelli fisici e quelli emotivi.

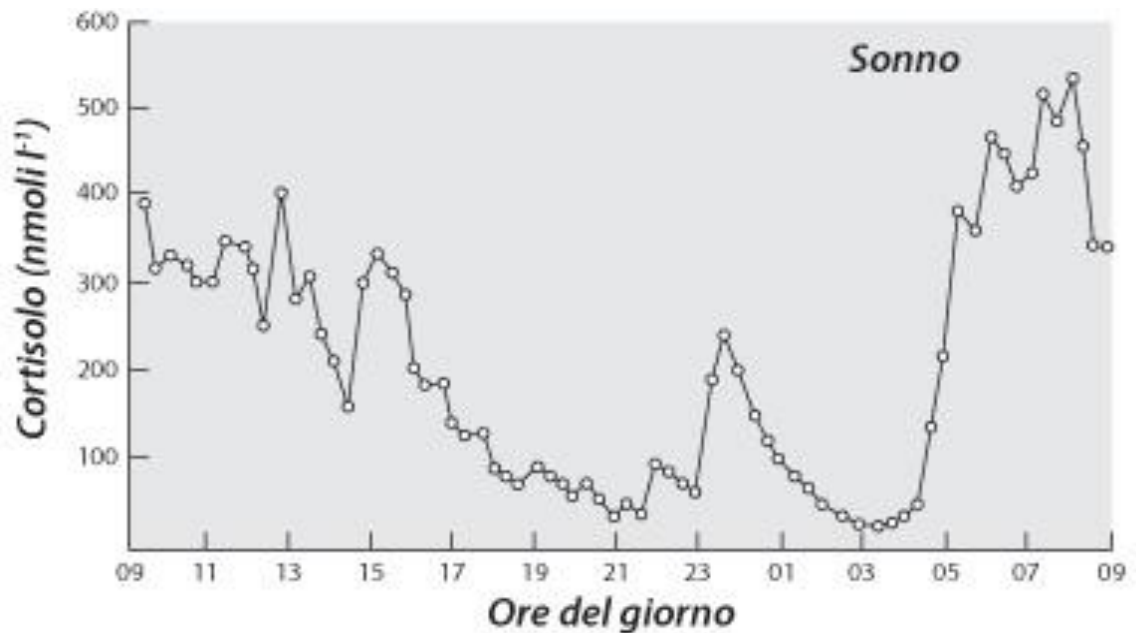
Tra quelli fisici annoveriamo sono normalmente interventi chirurgici, traumi, ustioni, infezioni, shock, dolore, esposizione a temperature estreme, sforzo fisico e ansia. (26)

Tra gli effetti del cortisolo troviamo quindi gli stimoli primari che inducono la secrezione di ACTH dall'adenoipofisi e di CRH ipotalamico, l'effetto sul metabolismo dei carboidrati con la ridotta assunzione di glucosio nelle cellule e aumento gluconeogenesi, l'effetto sul glucosio plasmatico comportando aumento della glicemia, stimolano la sensazione di fame, della gluconeogenesi epatica (con la conversione di alanina in glucosio), il catalizzare la secrezione di glucagone e il ridurre l'attività dei recettori insulinici.

Ha inoltre effetti sul meccanismo lipidico comportando l'aumento della lipolisi, effetti sul metabolismo proteico con la ridotta assunzione di amminoacidi nelle cellule e l'aumento proteolisi, inducendo la conversione delle proteine in glucosio, induce un aumento della gittata cardiaca, diminuisce la sintesi di collagene e della matrice ossea. (26)

Il 77% circa del cortisolo in circolo è legato alla transcortina o CBG (*Cortisol binding protein*), il 15% all'albumina, mentre il 3-10% è libero. (26)

Il grafico illustra le variazioni giornaliere di cortisolo



Mediamente nell'adulto il cortisolo varia tra 100-200 microgrammi/l o 250-550 nmol/l alle otto del mattino a 100 microgrammi/l o meno delle ore serali.

Per quanto riguarda il bambino con età inferiore a 10 anni i valori si aggirano in un range tra i 50 e i 100 microgrammi/l. (26)

Il cortisolo nella saliva segue un andamento giornaliero, in particolare nei bambini in età scolare.

- Nei 20 minuti dopo la sveglia si raggiunge il massimo livello di 9.69 (+/- 3.89) nmol/L
- Dopo 90 minuti diminuisce quasi del 50% e si ferma a 4.14 (+/-1.93) nmol/L per 3-8 ore
- Dopo 14 ore i livelli diminuiscono gradualmente, arrivando quasi a 0

Complessivamente non si sono evidenziate differenze specifiche in base al sesso, eccetto per tre momenti: 3,10 e 11 ore dopo la sveglia. (29)

Da ulteriori studi si è verificato che esistano variazioni individuali di cortisolo dal 50 al 73%.

Si è evidenziato inoltre che i maschi più piccoli e in generale i giovani con uno sviluppo più precoce mostravano una maggiore stabilità complessiva rispetto alle femmine più grandi e più fisicamente mature. Tutti i valori (eccetto il cortisolo prima di coricarsi) erano similmente stabili misurati nell'arco di giorni, settimane e anni. (30)

Sembra che l'ippocampo abbia un ruolo importante nella regolazione della secrezione del cortisolo prima del risveglio e sembra anche che nella maggior parte delle persone sane il risveglio sia associato ad una impennata nella liberazione del CAR (cortisol awakening response). Pare esserci un'associazione tra quest'ultima e la fine dell'inerzia del sonno.

L'evidenza è presentata per la ridotta sensibilità surrenale ai livelli crescenti di ACTH nel periodo di pre-awakening, mediata da una via extra-pituitaria al surrene dal nucleo suprachiasmatico (SCN). (31)

4.1.1 Ipercortisolismo

Il cortisolo va monitorato e mantenuto entro certi limiti. Come conseguenza dell'eccesso di questo ormone si possono manifestare ipertensione, irsutismo e alopecia, obesità tronculare, debolezza muscolare, alterazioni del ciclo mestruale, calo del desiderio sessuale, edema, infezioni ricorrenti, alterata tolleranza glucidica, osteoporosi e fratture, cefalee, depressione, dislipidemie, ritardo nella guarigione delle ferite, ipoprogesteronismo nel sesso femminile e morbo di Cushing.

Quest'ultimo è causato da una iperproduzione di cortisolo. Le caratteristiche tipiche sono ridistribuzione del grasso corporeo, perdita di massa muscolare, ipertensione, fragilità capillare, assottigliamento della cute, difficoltà di cicatrizzazione delle ferite, osteoporosi, immunodepressione, diabete secondario e psicosi. (49)

4.1.2 Relazione tra cortisolo e attività motoria

Il livello critico di esercizio fisico che provoca un aumento consistente della secrezione di cortisolo è pari a circa il 60% del VO₂max.

La quantità di cortisolo secreta è direttamente proporzionale alla durata e all'intensità dell'esercizio fisico. Si manifesta inoltre un incremento dell'ACTH già nel periodo pre-gara, causato dallo stress psicologico da competizione. (48)

Inoltre si ricorda che la risposta corticosurrenalica all'attività sportiva è potenziata dal digiuno e dallo stress psicologico, mentre è ridotta dall'ingestione di cibo. (26)

4.1.3 Relazione tra cortisolo, alpha amilasi e stress

Cortisolo e alpha-amilasi sono i più importanti markers salivari correlati a stress e ad ansia. Confrontando la concentrazione di cortisolo e alpha-amilasi in adulti sani si osserva un decremento durante procedure odontoiatriche non invasive e un aumento in caso di estrazioni. (28)

Quantificando la concentrazione di cortisolo salivare durante visite odontoiatriche di bambini in età scolare si evince come i meno collaboranti abbiano livelli di cortisone salivare più alti prima e subito dopo l'appuntamento. Ciò risulta essere particolarmente evidente nel periodo che anticipa la visita, che è infatti molto stressante.

Il gruppo dei non collaboranti presenta simili livelli alti di cortisolo prima e subito dopo l'appuntamento rispetto ai livelli a 30 minuti dopo la sveglia il giorno successivo all'appuntamento. I livelli di cortisolo in particolare erano significativamente più alti subito dopo l'appuntamento.

Per il gruppo collaborante invece l'appuntamento col dentista in sé non è evento stressante. Si stimano infatti livelli significativamente più bassi prima e subito dopo la visita, rispetto ai livelli a 30 minuti dopo la sveglia del giorno successivo. (38)

4.2 Metodi di analisi

La concentrazione di cortisolo può essere misurata in sangue, saliva, urine e capelli. (32)

La misurazione del cortisolo salivare è considerata affidabile e meno invasiva rispetto al prelievo di sangue, per questo viene considerato una valida alternativa a quest'ultimo. (38)

4.2.1 Saggi del cortisolo urinario

In condizioni normali, i reni filtrano, e in parte riassorbono, il cortisolo non legato e solo una frazione di circa il 2% viene espulsa immutata nelle urine. Il cortisolo urinario non è influenzato dai cambiamenti del metabolismo epatico, a differenza dei suoi metaboliti, e riflette meglio la concentrazione di cortisolo endogeno. (37)

I pazienti ipercortisolemici hanno una clearance del cortisolo renale significativamente più elevata rispetto a pazienti con livelli di cortisolo sierico normale a causa del rapido aumento del cortisolo libero da siero una volta la capacità di legame del CBG (Corticosteroid Binding Globulin) è stata superata a circa 500 nmol/L.

Il cortisolo urinario si può misurare con dosaggio radioimmunologico (RIA), test immunoenzimatico (EIA) e chemiluminescenza (CLIA).

La presenza di metaboliti coniugati del cortisolo nelle urine che può reagire in modo incrociato con anticorpi per il saggio immunologico, ha reso necessaria l'estrazione di cortisolo libero prima dell'analisi. Miscelando quindi l'urina con un solvente organico, come diclorometano, e rimuovendo lo strato acquoso, il cortisolo, che è meno solubile in acqua rispetto alla maggior parte dei suoi metaboliti, può essere separato da quest'ultimo prima dell'analisi. Per migliorare ulteriormente la specificità dei saggi di cortisolo urinario, è stata introdotta la cromatografia. Inizialmente veniva utilizzato come fase di purificazione prima del saggio, mentre ora è diventato il metodo di scelta.

I primi test HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione) non si sono dimostrati ideali a causa dei lunghi tempi di esecuzione necessari per garantire una adeguata separazione. Accoppiando HPLC o GC (gascromatografia) alla spettrometria di massa, i tempi di esecuzione sono stati notevolmente ridotti,

anche se la produttività è bassa e i costi elevati hanno impedito che questi test venissero utilizzati su larga scala.

Più recentemente, LC-MS/MS (cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa) ha fornito saggi altamente sensibili e specifici, di facile utilizzo, che si confrontano bene con il metodo reputato il gold standard, GC-MS.

Questi test, tuttavia, possono essere più suscettibili, rispetto ai test sierici, agli ioni a causa del contenuto variabile di sale e dei numerosi metaboliti steroidei presenti nel campione di urine. (33)

I metodi utilizzati di routine nei laboratori clinici sono i test immunologici IA e EIA, test di luminescenza e test di fluorescenza. Tuttavia, rimarrebbero una serie di problemi nei cosiddetti test immunoenzimatici diretti se l'estrazione e la pre-purificazione non venissero effettuate prima del saggio. Con l'introduzione di metodi cromatografici più specifici, come HPLC o LC-MS/MS. L'elevata specificità, in particolare di LC-MS/MS, facilita la misurazione affidabile del cortisolo sia nel plasma che nei campioni di urina e di saliva. (33)

4.2.2 Test immunologici IA

Sono metodi bioanalitici altamente selettivi che misurano la presenza o la concentrazione di analiti di dimensioni molto variabili (da piccole molecole a macromolecole) in una soluzione attraverso l'uso di un anticorpo o di un antigene come agente di bioriconoscimento.

La quantificazione dell'analita dipende dalla reazione di un antigene (analita) e di un anticorpo. Solitamente si basano su una reazione vincolante competitiva tra una quantità fissa di un analita e una quantità variabile di analita campione non etichettato per una quantità limitata di siti vincolanti su un anticorpo anti-analitico altamente specifico. Quando questi reagenti immunoanalitici vengono mescolati e incubati, l'analita si lega all'anticorpo formando un complesso immunitario. Questo complesso viene separato dalla frazione di reagente non legata, mediante una tecnica di separazione fisica o chimica. L'analisi si ottiene misurando l'attività, come ad esempio, radiazioni, fluorescenza o enzima, in una

delle due frazioni legate o libere. Viene costruita una curva standard che rappresenta il segnale misurato in funzione della concentrazione dell'analita non etichettato nel campione. La concentrazione dell'analita sconosciuto è determinata a partire da questa curva di calibrazione.

Questi metodi sono stati ampiamente utilizzati in molti importanti settori dell'analisi farmaceutica, come la diagnosi di malattie, il monitoraggio terapeutico dei farmaci, gli studi clinici farmacocinetici e di bioequivalenza nella scoperta di farmaci e dalle industrie farmaceutiche. L'analisi di solito comporta la misurazione di concentrazioni molto basse di farmaci a basso peso molecolare, biomolecole macromolecolari di interesse farmaceutico, metaboliti, e/o biomarcatori che indicano la diagnosi di malattia o la prognosi. Le loro importanza e diffusione nell'analisi farmaceutica sono attribuite alla loro specificità intrinseca, all'alta produttività e all'elevata sensibilità per l'analisi di un'ampia gamma di analiti in campioni biologici.

Il sistema di rilevazione nei saggi immunologici dipende da etichette facilmente rilevabili, come ad esempio radioisotopi o enzimi, accoppiate ad uno dei reagenti immunoanalitici (cioè analita o anticorpo). L'uso di queste etichette nei saggi immunoanalitici porta a metodi di analisi con sensibilità estremamente elevata e bassi limiti di rilevazione.

Nelle prime fasi della scoperta e dello sviluppo del farmaco, in particolare durante gli studi clinici farmacocinetici per il nuovo candidato farmaco, è necessario eseguire lo screening di un gran numero di campioni. Ciò può essere ottenuto solo utilizzando un metodo analitico ad alta produttività. L'analisi di matrici biologiche complesse (ad es. sangue o urine) con metodi immunoenzimatici, essendo basata su una specifica reazione vincolante, può essere ottenuta senza pretrattamento del campione. Inoltre, sono state sviluppate nuove tecniche per consentire la rapida produzione di anticorpi specifici. Queste tecniche hanno portato ad una drastica riduzione dei tempi di sviluppo di questi metodi. Il vantaggio del costo relativamente basso degli

strumenti e dei reagenti hanno consentito l'ampia diffusione di questo metodo in molti settori dell'analisi farmaceutica. (34)

4.2.3 Test immunologici EIA

L'approccio di base per l'uso di un enzima come etichetta del saggio immunoenzimatico è apprezzato accoppiando una molecola di enzima in uno dei reagenti immunoanalitici (analita o anticorpo). Il risultato sarà una reazione immunoanalitica. Dopo la separazione delle frazioni legate e libere, l'attività enzimatica viene monitorata in una delle due frazioni. Questo si ottiene aggiungendo il substrato, e successivamente monitorando il fatturato del substrato al prodotto. Il prodotto deve possedere differenze fisiche o chimiche misurabili, rispetto al substrato. Un esempio è dato dai substrati cromogenici incolori che vengono convertiti in prodotti colorati dall'azione dell'enzima. I prodotti colorati possono essere semplicemente misurati da uno spettrofotometro. Il segnale misurato viene poi correlato alla concentrazione dell'analita. Questo sistema di substrato enzimatico/cromogenico è uno dei più impiegati, ma possono anche essere utilizzati molti altri sistemi. (34)

4.2.4 Test di luminescenza e di fluorescenza

La luminescenza è l'emissione spontanea di luce da parte di una sostanza non derivante dal calore. Può anche essere definita come "luce fredda".

Questa forma di radiazione a corpo freddo può essere causata da reazioni chimiche, energia elettrica, movimenti subatomici o stress su un cristallo. (35)

Fotoluminescenza UV nella diagnostica microbiologica (39)

Tipologie di luminescenza	Meccanismi
Chemiluminescenza - Bioluminescenza - Elettrochemiluminescenza	Reazione chimica Reazione biochimica da parte di un organismo vivente Reazione elettrochimica
Cristalloluminescenza	Cristallizzazione

Elettroluminescenza - Cattodoluminescenza	Corrente elettrica passata attraverso una sostanza Colpito dagli elettroni
Meccanoluminescenza - Triboluminescenza - Fractoluminescenza - Piezoluminescenza	Azione meccanica su un solido I legami di triboluminescenza in materiale sono rotti I legami in alcuni cristalli sono rotti da fratture Azione di pressione su alcuni solidi
Sonoluminescenza	Bolle che implodono in un liquido quando sono eccitate da suono
Fotoluminescenza - Fluorescenza - Fosforescenza	Assorbimento dei fotoni Singoletto-singoletto relax elettronico Triplo- singoletto relax elettronico
Radioluminescenza	Bombardamento a radioluminescenza mediante radiazioni ionizzanti
Termoluminescenza	Rimissione di energia assorbita quando un la sostanza viene riscaldata

4.2.5 Cromatografia liquida ad alta pressione/ alte prestazioni (HPLC)

È una tecnica di chimica analitica utilizzata per separare, identificare e quantificare ogni componente di una miscela.

Si basa su pompe che consentono il passaggio di un solvente liquido pressurizzato contenente la miscela campione attraverso una colonna riempita con un materiale solido adsorbente. Ogni componente nel campione interagisce in modo leggermente diverso con il materiale adsorbente, causando portate

diverse per i diversi componenti e portando alla separazione dei componenti mentre escono dalla colonna.

Il kit per HPLC comprende tipicamente degassificatore, campionatore, pompe e rivelatore. Il campionatore porta la miscela campione nel flusso di fase mobile che la trasporta nella colonna. Le pompe forniscono il flusso desiderato e la composizione della fase mobile attraverso la colonna. Il rivelatore genera un segnale proporzionale alla quantità di componente del campione che emerge dalla colonna, permettendo così l'analisi quantitativa dei componenti del campione. Un microprocessore digitale e un software utente controllano lo strumento HPLC e forniscono l'analisi dei dati. Alcuni modelli di pompe meccaniche in uno strumento HPLC possono miscelare più solventi insieme in rapporti che cambiano nel tempo, generando un gradiente di composizione nella fase mobile. Diversi rivelatori sono di uso comune, come UV/Vis, array di fotodiodi (PDA) o basati sulla spettrometria di massa. La maggior parte degli strumenti HPLC ha anche un forno a colonna che permette di regolare la temperatura alla quale viene eseguita la separazione. (41)

L'HPLC è stato utilizzato per la produzione di prodotti farmaceutici e biologici, per scopi legali come per rilevare i farmaci per il miglioramento delle prestazioni nelle urine, per la ricerca come per separare i componenti di un campione biologico complesso, o di sostanze chimiche sintetiche simili l'una dall'altra e per scopi medici come rilevare i livelli di vitamina D nel siero del sangue. (45)

Il componente attivo della colonna, l'adsorbente, è tipicamente un materiale granulare fatto di particelle solide come silice, polimeri di dimensioni di 2-50 μm . Il liquido sotto pressione è tipicamente una miscela di solventi e viene definita "fase mobile". La sua composizione e la sua temperatura influenzano il grado di separazione tra i componenti del campione e l'adsorbente. Queste interazioni sono di natura fisica, chimica o il più delle volte una combinazione delle due. (45)

Questo metodo si distingue dalla tradizionale (a "bassa pressione") cromatografia liquida perché le pressioni operative sono significativamente più

elevate (50-350 bar). La cromatografia liquida ordinaria si basa tipicamente sulla forza di gravità per far passare la fase mobile attraverso la colonna. A causa della piccola quantità di campione separato in HPLC analitico, le dimensioni tipiche della colonna sono 2,1-4,6 mm di diametro, e 30-250 mm di lunghezza. Anche le colonne HPLC sono realizzate con particelle adsorbenti più piccole (2-50 μm nella dimensione media delle particelle). Ciò conferisce all'HPLC un potere risolutivo superiore (la capacità di distinguere tra i composti) quando si separano le miscele, il che lo rende una tecnica cromatografica molto diffusa. (45)

4.2.6 Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)

Negli ultimi quindici anni, la LC-MS/MS si è evoluta in una tecnologia vitale utilizzata per eseguire test di routine in molti laboratori clinici. Storicamente questa procedura era stata utilizzata principalmente da laboratori di ricerca, farmaceutici o commerciali; tuttavia, i progressi della tecnologia, la diminuzione dei costi per i sistemi di base, il software intelligibile, l'aumento del numero di protocolli e metodi pubblicati e il rilascio di kit approvati dalla Food and Drug Administration hanno permesso a un numero maggiore di laboratori clinici di perseguire questi strumenti come validi analizzatori clinici. (42)

LC-MS/MS è una potente tecnica analitica qualitativa e quantitativa con una vasta gamma di applicazioni cliniche, tra cui il monitoraggio terapeutico dei farmaci, la tossicologia, l'endocrinologia, la pediatria, la microbiologia e il campo emergente della proteomica. L'interesse per l'utilità clinica della spettrometria di massa continua a crescere, come dimostrano il numero sempre crescente di pubblicazioni e conferenze LC-MS/MS, nonché il recente lancio della Divisione di Spettrometria di Massa e Scienze della Separazione dell'AACC, American Association for Clinical Chemistry. (43)

La spettrometria di massa tandem si basa sull'accoppiamento degli spettrometri di massa in una serie per analizzare miscele complesse. Il metodo utilizza due filtri di massa disposti in sequenza con una cella di collisione tra loro. I filtri possono essere usati in modalità statica o di scansione per selezionare un particolare rapporto massa/carica o un intervallo. Nella cella di collisione, gli ioni

precursori entrano in collisione con le molecole di gas e vengono frammentati in ioni più piccoli, chiamati ioni prodotto. A seconda dell'applicazione clinica gli spettrometri di massa tandem sono versatili in quanto possono essere utilizzati con una varietà di modalità di scansione diverse. (44)

4.2.7 Vantaggi di LC-MS/MS

Essendo riconosciuta come tecnologia strategica, molti laboratori clinici la stanno attualmente impiegando al posto di altre metodologie. Tradizionalmente i test immunoenzimatici venivano sfruttati per misurare composti a basso peso molecolare. Tuttavia, essi presentano diversi limiti come problemi di specificità, mancanza di concordanza tra i saggi di diversi produttori e variazione da lotto a lotto dello stesso produttore a causa della reattività crociata variabile degli anticorpi. (36)

MS/MS (spettrometria di massa tandem) ha una selettività superiore per molti analiti poiché li riconosce per almeno due proprietà fisiche: il loro precursore e la massa ionica del prodotto. Quando MS/MS è accoppiato con LC, il tempo di ritenzione aggiunge un'altra proprietà per identificare correttamente l'analita, con conseguente maggiore specificità. (36)

I laboratori clinici hanno anche sperimentato situazioni in cui i produttori hanno ritirato improvvisamente i test immunoenzimatici dal mercato, lasciando i laboratori alla ricerca frenetica di metodi alternativi per ottenere i risultati dei test. Queste esperienze hanno dato ai laboratori un altro motivo per rivolgersi a LC-MS/MS.

MS/MS mostra anche flessibilità e versatilità nel consentire ai laboratori di offrire nuovi test sviluppati in laboratorio per biomarcatori o per i nuovi farmaci approvati prima che i kit o i test immunoenzimatici approvati dalla FDA arrivino sul mercato. Inoltre, la sensibilità di LC-MS/MS può consentire limiti di rilevazione più bassi per alcuni analiti, come gli steroidi, rispetto ai test immunologici e ad altri metodi.

Un altro vantaggio di LC-MS/MS è che offre ai laboratori clinici la possibilità di moltiplicazione, identificando e quantificando simultaneamente diversi analiti di interesse. Il *multiplexing* riduce il costo del test. LC-MS/MS offre risparmi sui costi e una maggiore produttività grazie alla preparazione semplificata o minima del campione per alcune applicazioni, rispetto ad altri metodi di preparazione del campione.

Nonostante i numerosi vantaggi di LC-MS/MS, non è privo di inconvenienti. Essendo un sistema ad alta complessità, richiede un alto livello di competenza tecnica. Inoltre, la bozza di documento guida sulla regolamentazione delle LDT (*Laboratory developed test*) recentemente rilasciata dalla FDA potrebbe influenzare la maggior parte dei test sviluppati ed eseguiti su LC-MS/MS. Attualmente, i laboratori sviluppano e convalidano i test LC-MS/MS secondo la CLIA, che ha stabilito gli standard di qualità per i test di laboratorio e i programmi di accreditamento per i laboratori clinici.

A differenza dei test approvati dall'FDA, le LDT hanno ulteriori requisiti di convalida analitica che includono una valutazione di imprecisione, accuratezza, linearità, recupero, sensibilità, specificità, tipi di campioni accettabili, condizioni di stoccaggio/trasporto e la definizione di intervalli di riferimento. La determinazione della preparazione appropriata del campione, la scelta della colonna, la fase mobile e la selezione di standard interni adeguati sono solo alcune delle molte sfide affrontate.

Possono inoltre verificarsi variazioni da saggio a saggio tra gli utenti LC-MS/MS, poiché i saggi LC-MS/MS non sono standardizzati o armonizzati e non sono disponibili calibratori commerciali. I produttori hanno perciò iniziato ad affrontare queste limitazioni e ora offrono kit per immunosoppressori e steroidi.

(36)

4.2.8 Applicazioni cliniche di LC-MS/MS

Inizialmente, la spettrometria di massa è stata utilizzata principalmente nello screening dei neonati e per diagnosticare i disturbi metabolici organici nei

laboratori clinici. Oggi, LC-MS/MS è la tecnologia leader utilizzata dai laboratori pediatrici per i programmi di screening neonatale grazie alla sua versatilità, sensibilità e specificità. Per esempio, viene utilizzata per diagnosticare disturbi degli aminoacidi come la fenilchetonuria.

Il monitoraggio terapeutico dei farmaci è un'altra disciplina in cui i test LC-MS/MS sono abbondanti per la misurazione quantitativa dei farmaci. Inizialmente, venne adottato da molti laboratori clinici per misurare i farmaci immunosoppressori come la ciclosporina. Ciò ha portato molti laboratori ad implementare LC-MS/MS come modo per far fronte agli elevati costi di invio e per soddisfare i requisiti dei medici trapiantatori.

Un altro vantaggio di LC-MS/MS rispetto ai test immunosoppressori per la misurazione degli immunosoppressori è la possibilità di cercare più analiti in un unico ciclo analitico. Nei pazienti a cui sono stati prescritti più farmaci o in quelli che passano da un immunosoppressore all'altro, i laboratori che utilizzano LC-MS/MS possono misurare contemporaneamente entrambi i farmaci in un'unica analisi, risparmiando tempo e denaro. Altri farmaci comunemente monitorati sono: antiepilettici, antifungini e antidepressivi.

Applicazioni più specializzate del TDM includono la misurazione di agenti antineoplastici come il Busulfano. Per quest'ultimo i campioni di sangue vengono raccolti in diversi momenti dopo la somministrazione del farmaco per misurarne la concentrazione e determinare l'area sotto la curva. Questo test farmacocinetico viene utilizzato per calcolare la clearance del farmaco e fornire una dose stimata per ridurre al minimo la tossicità, ottenendo allo stesso tempo concentrazioni appropriate per permettere una ablazione sufficientemente del midollo osseo prima del trapianto di cellule staminali ematopoietiche sia negli adulti che nei bambini.

In tossicologia, la GC-MS è stata la tecnica più utilizzata per i test di conferma di abuso di farmaci prescritti come le benzodiazepine e gli oppioidi. Al giorno d'oggi molti laboratori di tossicologia si stanno convertendo da GC-MS a LC-MS/MS e

stanno realizzando significativi miglioramenti nella produzione e risparmi sui costi. Mentre il costo iniziale di un sistema LC-MS/MS è molto più alto di un sistema GC-MS, i laboratori possono utilizzare metodi di preparazione del campione veloci, semplici ed economici senza i costi e i tempi aggiuntivi. Questi miglioramenti, insieme a tempi di analisi più brevi e alla capacità di *multiplexing*, forniscono una produttività e una capacità extra per i laboratori. (44)

L'endocrinologia rappresenta un'altra area in cui LC-MS/MS gioca un ruolo importante nei test clinici. I problemi di reattività crociata/specificità e gli effetti della matrice sono solo alcuni dei limiti che influenzano l'utilità clinica dei test immunologici utilizzati in endocrinologia. Ad esempio, deidroepiandrosterone (DHEAS) è un noto interferente nei test immunologici del testosterone a causa delle somiglianze strutturali tra questi steroidi. Inoltre, LC-MS/MS ha dimostrato di avere prestazioni superiori e sensibilità a basse concentrazioni per molti steroidi sessuali tra cui il testosterone nelle femmine e l'estradiolo. Anche le linee guida della Endocrine Society e dell'American Urological Association hanno evidenziato i limiti dei test immunologici per gli steroidi sessuali e hanno dimostrato che i metodi spettrometrici di massa sono superiori.

Altri vantaggi di LC-MS/MS includono campi di misura estesi e la possibilità di misurare più steroidi contemporaneamente, noti come profili steroidei completi, rispetto alla misurazione di singoli steroidi in test immunoenzimatici separati. Altre applicazioni rilevanti di LC-MS/MS includono la misurazione della tiroxina, del cortisolo urinario e della 25-idrossivitamina D.

Un'altra area in espansione per LC-MS/MS è nel campo della proteomica. La proteomica consiste nell'identificazione sistematica di proteine e nella loro caratterizzazione rispetto a struttura, funzione, attività, quantità e interazioni molecolari. Questa branca delle scienze biologiche è inclusa nelle cosiddette scienze OMICHE che caratterizzano la biologia dei sistemi.

Mentre la LC-MS/MS pone dei limiti alle dimensioni delle molecole che può misurare (m/z 2.000), le proteine o i peptidi più grandi possono essere digeriti

prima della misurazione. Le immunoglobuline, per esempio, rappresentano una classe di composti che deve essere digerita prima dell'analisi LC-MS/MS.

Anche le aziende farmaceutiche utilizzano anticorpi monoclonali come agenti terapeutici per una grande varietà di malattie. Ad esempio, l'infliximab è usato per trattare il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, e le concentrazioni terapeutiche sono associate alla risposta clinica e al miglioramento della prognosi. I test immunoenzimatici esistenti possono essere soggetti all'interferenza di anticorpi endogeni diretti contro l'infliximab, ma questo può essere superato utilizzando i metodi LC-MS/MS.

In conclusione, il futuro di LC-MS/MS è luminoso, poiché i produttori continuano a migliorare, automatizzare e semplificare la tecnologia e a rendere questa strumentazione altamente complessa più simile agli analizzatori chimici automatizzati e approvati dalla FDA. Alla fine, strumenti LC-MS/MS più semplificati e automatizzati. La commercializzazione di kit di reagenti più pronti all'uso, approvati dalla FDA, per LC-MS/MS minimizzerà anche lo sforzo necessario per lo sviluppo del metodo e la convalida estesa, rendendo LC-MS/MS accessibile a più laboratori. Ulteriori miglioramenti in termini di sensibilità, specificità e produttività faciliteranno anche un maggior numero di applicazioni cliniche.

Inoltre, alcune istituzioni stanno già utilizzando la SM/MS al di fuori del laboratorio clinico. Un esempio è rappresentato da alcune sale operatorie dell'Imperial College di Londra, in cui il coltello del chirurgo è collegato alla SM, così da differenziare il tessuto normale da quello canceroso. Tali progressi lasciano presagire un futuro entusiasmante per la LC-MS/MS e per i professionisti del laboratorio clinico che vogliono affrontare la sfida di affrontare la sua evoluzione nella scienza e nella tecnologia. (43)

4.3 Tamponi salivari

Il cortisolo salivare riflette anche i cambiamenti nel cortisolo sierico non legato e offre una affidabile alternativa alla misurazione del cortisolo libero nel siero.

LC-MS/MS è il metodo di scelta per la misurazione del cortisolo salivare; tuttavia, il suo uso è limitato da saggi scarsamente standardizzati. (37)

4.3.1 Saggi di cortisolo salivare

Il cortisolo entra nella saliva per diffusione, indipendentemente dalla portata salivare. Esso riflette il ritmo circadiano del cortisolo e il picco del mattino presto e risponde ai cambiamenti della concentrazione di cortisolo nel plasma in modo rapido e affidabile. L'interesse per la misurazione del cortisolo nella saliva iniziò negli anni '60, ma fu ostacolato dalla mancanza di saggi sensibili di cortisolo poiché le concentrazioni nella saliva sono meno di un decimo di quelle nel siero.

Il cortisolo salivare è stato misurato per la prima volta con RIA diretta nel 1978. Più recentemente i test immunoenzimatici del cortisolo nel siero sono stati adattati con successo a misurare il cortisolo nella saliva. Il limite di questi ultimi è la loro scarsa specificità, in particolare in presenza di una significativa reattività crociata con cortisone, presente in alta concentrazione nella saliva. La sensibilità del test può anche presentare un problema in quanto le concentrazioni di cortisolo salivare a tarda notte spesso si avvicinano ai limiti funzionali del rilevamento.

Il primo test LC-MS/MS per la misurazione del cortisolo salivare è stato descritto nel 2003 e ha promesso una maggiore specificità rispetto ai saggi esistenti. Da allora gli sforzi sono stati concentrati sull'adattamento di LC-MS/MS per fornire un servizio rapido e ad alta produttività, con numerosi saggi di successo ora disponibili. Concentrazioni medie di cortisolo salivare al mattino presto di 3,6 nmol/L e 8,3 nmol/L sono state rilevate utilizzando diversi test interni LC-MS/MS. Allo stesso modo, il cut-off di cortisolo salivare a tarda notte per la diagnosi della sindrome di Cushing è stato segnalato come 2,95 nmol/L e 2,1 nmol/L e sebbene sia probabile che si trovi sotto 3 nmol/L, un singolo cut-off è ancora da determinare. (53)

Un ulteriore studio sul cortisolo salivare a tarda notte ha mostrato sovrapposizione significativa tra le concentrazioni nei volontari sani e nei soggetti obesi, con intervalli di <0,11 - 16 nmol/L e <0,11 - 17,7 nmol/L rispettivamente.

I laboratori dovranno quindi definire i propri cut-off specifici per il test fino a quando è stata raggiunta una migliore standardizzazione dei test.

Anche la tecnica di raccolta dei campioni può contribuire alle differenze osservate tra le analisi del cortisolo salivare. La saliva è spesso raccolta per sbavare passivamente in un contenitore ma può essere raccolto masticando un batuffolo di cotone assorbente, tipicamente il Sarstedt Salivette®, che viene successivamente centrifugato per rilasciare il suo contenuto di liquido. Il recupero di steroidi da tamponi di cotone ha dimostrato di differire da altri dispositivi di raccolta, ad es. l'applicatore a punta di schiuma Whatman® e le schede di raccolta del sangue, con conseguenti diverse concentrazioni dovute semplicemente alla tecnica di raccolta utilizzata. Così lo sviluppo di qualsiasi saggio dovrebbe includere una valutazione del dispositivo. (37)

Altre potenziali interferenze con la misurazione del cortisolo salivare includono il campione di contaminazione con sangue durante la raccolta e il fumo prima della raccolta del campione; entrambi i quali possono portare a concentrazioni di cortisolo falsamente elevate. La maggior parte degli autori suggerisce di raccogliere la saliva almeno 30 minuti dopo aver mangiato, bevuto o spazzolato i denti, anche se ci sono poche prove a sostegno di questo approccio. Il cortisolo salivare è ora ampiamente utilizzato nei laboratori clinici: è stato suggerito come una comoda alternativa al siero per il monitoraggio dell'idrocortisone sostitutivo.

Come alternativa al cortisolo totale del siero è possibile utilizzare il test di Synacthen, uno screening di prima linea raccomandato per la sindrome di Cushing. Il cortisolo salivare è stato utilizzato anche per la ricerca di modelli di cortisolo basale nei neonati e nella valutazione della loro risposta allo stress.

Un marcatore alternativo del cortisolo libero da siero è il cortisone salivare, che mostra eccellente correlazione con la concentrazione di cortisolo libero da siero

e si trova in maggiore concentrazione di cortisolo salivare (a causa di una alterazione a livello parotideo). Sarebbe ora necessario un ulteriore lavoro per stabilire intervalli di riferimento adeguati e tagliare *offset* per il cortisone salivare. (37)

CAPITOLO 5 SPERIMENTAZIONE

5.1 Background

Il controllo dell'ansia rappresenta una parte essenziale e spesso quotidiana dell'attività odontoiatrica. Molte volte si devono fronteggiare problematiche emotive di pazienti odontofobici e poco collaboranti. In questo contesto, la sedazione cosciente con ossigeno e protossido d'azoto offre all'odontoiatra la possibilità di aumentare la collaborazione del paziente durante le sedute e lavorare in maniera più rilassata, ottenendo anche prestazioni migliori, riducendo lo stress della pratica clinica quotidiana. La sedazione inalatoria con protossido d'azoto è la metodica più indicata e diffusa in odontoiatria pediatrica: spesso si presentano bambini, anche molto piccoli, con patologie cariose in stato avanzato, sulle quali si tenta di eseguire terapie con scarso successo per la poca collaborazione del paziente.

5.2 Scopo della ricerca

Il seguente studio si pone l'obiettivo di andare a valutare, in modo oggettivo, attraverso la misurazione del cortisolo salivare, l'abbattimento dello stato di ansia nei pazienti pediatrici, sottoposti a trattamenti odontoiatrici, attraverso l'utilizzo della sedazione cosciente con protossido d'azoto.

5.3 Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su un totale di 20 pazienti, sia maschi che femmine, di età compresa tra i 6 e i 10 anni.

I criteri di inclusione prevedevano pazienti in età prepuberale e con BMI nella norma (dal 5° all'85° percentile), secondo i percentili proposti da Cole e Coll. (85)

I criteri di esclusione prevedevano inoltre pazienti con sindromi genetiche e malattie respiratorie croniche ed acute. (87)

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi di uguale entità (10 pazienti in ciascun gruppo) in maniera randomizzata:

- GRUPPO PROTOSSIDO (Gp), a cui veniva somministrato, durante il trattamento odontoiatrico, per via inalatoria, protossido d'azoto (N₂O),

alla percentuale di 50%, in associazione a ossigeno (O₂), alla percentuale di 50%, attraverso l'utilizzo di una macchina automiscelante.

- GRUPPO CONTROLLO (Gc), a cui veniva solamente appoggiata la mascherina sul naso, senza la somministrazione di gas durante il trattamento odontoiatrico.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una seduta di igiene odontoiatrica professionale, con durata di 20 minuti.

La valutazione dello stato di ansia è stata eseguita tramite:

- 1) Analisi della quantità di cortisolo salivare, utilizzando Salivette;
- 2) Test di Venham.

Il protossido d'azoto e l'ossigeno sono stati somministrati attraverso la macchina automiscelante MDM Digital di Reinhold in uguale quantità. L'analisi del cortisolo salivare contenuto nelle Salivette è stata eseguita presso il laboratorio analisi del dipartimento di Biochimica dell'Ospedale di Torrette.

Per ciascun paziente è stato adottato il seguente protocollo.

5.3.1 Protocollo

I genitori sono stati convocati una settimana prima del trattamento per compilare cartella clinica, anamnesi e per firmare:

- il consenso informato;
- l'autorizzazione al trattamento dei dati, secondo le norme vigenti in Italia (DPR 2016);
- l'autorizzazione al trattamento odontoiatrico;
- l'autorizzazione per la somministrazione di protossido d'azoto, previa esaustiva informazione.

Il genitore durante il trattamento è stato presente nella stanza dietro la testa del bambino in modo tale da non influenzare il test.

I parametri fisiologici valutati sono stati frequenza cardiaca, saturazione di ossigeno. Sono stati monitorati in maniera costante durante il trattamento, tramite l'utilizzo del saturimetro e registrati durante 6 stadi:

- T0: quando il paziente giunge in sala d'attesa e esegue il prelievo salivare iniziale;

- T1 (PRE SEDAZIONE): appena il paziente si siede sulla poltrona;
- T2 (INDUZIONE): dopo 5 minuti dall'inizio della somministrazione del protossido d'azoto (50-50%);
- T3 (SEDAZIONE): dopo 10 minuti dall'inizio della somministrazione del protossido d'azoto e dopo 5 minuti di igiene professionale;
- T4 (FINE): terminata la seduta di igiene professionale, al paziente viene somministrato ossigeno puro per 2 minuti, al termine dei quali si attendono 5 minuti per eseguire T4.
- T5: dopo 25 minuti dal termine dell'igiene professionale, quando il paziente esegue il prelievo salivare finale.

Tali misurazioni sono state eseguite dal secondo operatore che ha riportato i dati ottenuti nell'apposita tabella. (Figura 1)

Figura 1.

GRUPPO PROTOSSIDO	GRUPPO CONTROLLO
 inizio ig fine ig 10:15 10:25 10:00 P_i e $V_2 \rightarrow$ 10:05 T_1 bpm= $sO_2 =$ 10:10 T_2 bpm= $sO_2 =$ 10:20 T_3 bpm= $sO_2 =$ 10:30 T_4 bpm= $sO_2 =$ 11:00 P_f e $V_3 \rightarrow$	 P_i 10:00 Inizio igiene 10:15 Fine igiene 10:35 Note P_f 11:00
 P_i 10:20 Inizio igiene 10:35 Fine igiene 10:55 Note P_f 11:20	 P_i 10:20 Inizio igiene 10:35 Fine igiene 10:55 Note P_f 11:20
 P_i 10:40 Inizio igiene 10:55 Fine igiene 11:15 Note P_f 11:40	 P_i 10:40 Inizio igiene 10:55 Fine igiene 11:15 Note P_f 11:40
 P_i 11:00 Inizio igiene 11:15 Fine igiene 11:35 Note P_f 12:00	 P_i 11:00 Inizio igiene 11:15 Fine igiene 11:35 Note P_f 12:00

L'analisi del cortisolo salivare è stata effettuata nel seguente modo:

- P_b : prelievo basale, effettuato il giorno precedente al trattamento odontoiatrico, a casa, dalle ore 7 alle ore 8 del mattino. Il paziente doveva

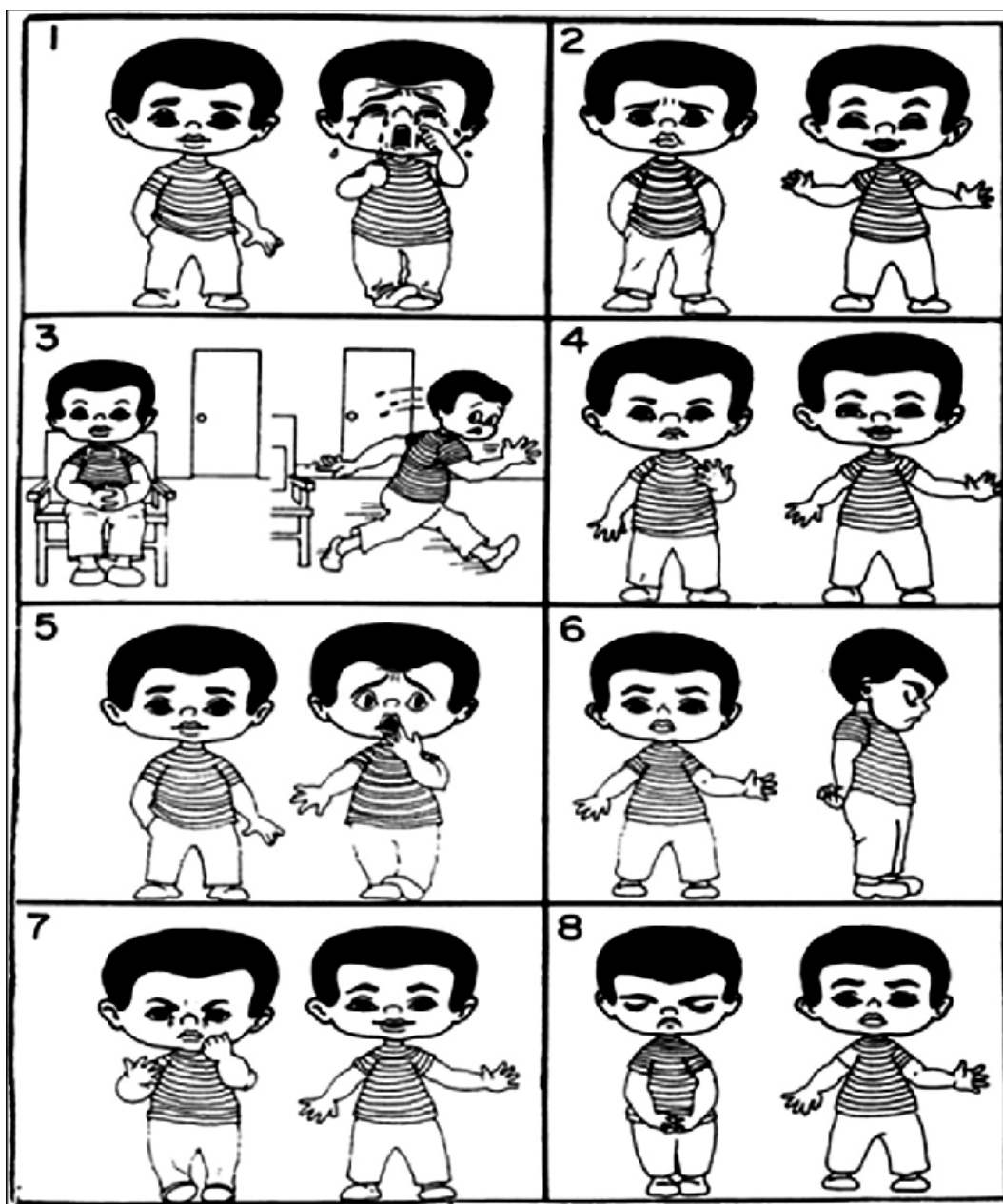
sputare nell'apposito contenitore, 1.1 ± 0.3 ml di saliva, prima di mangiare e lavare i denti. Il contenitore doveva essere conservato fino al giorno seguente a temperatura ambiente in un luogo non esposto al sole e al calore. (89)

- P_I: prelievo iniziale, effettuato 15 minuti prima del trattamento odontoiatrico. Il paziente doveva sputare 1.1 ± 0.3 ml di saliva nell'apposito contenitore e veniva seguito da un operatore che non indossava il camice, in modo da non influire sull'emotività del paziente. Tale prelievo veniva effettuato in una stanza, priva di riunito odontoiatrico e attrezzature mediche. (89)
- P_F: prelievo finale, eseguito dopo 25 minuti dal termine della seduta di igiene odontoiatrica, con le stesse modalità descritte per il P_I. (84)

Per la valutazione dello stato di ansia è stato utilizzato, inoltre, il test di Venham (Figura 2), eseguito in corrispondenza di P_b (V1), P_I (V2) e P_F (V3). Ciascun paziente ha dovuto scegliere tra 8 immagini di bambini quale più lo rappresenta dal punto di vista emotivo. Lo score di tale test andava da 0 a 8, in cui 0 indicava un paziente sereno, mentre 8 un paziente con ansia e non collaborante.

Nessun paziente sapeva se sarebbe stato sottoposto alla seduta di igiene con sedazione cosciente; egli infatti, una volta uscito dalla sala d'aspetto, doveva "pescare" da un contenitore una pallina di colore "blu" o di colore "verde". Il colore "blu" indicava che il trattamento doveva essere effettuato con l'utilizzo della sedazione cosciente con protossido d'azoto, mentre il colore "verde" indicava che il trattamento sarebbe stato effettuato in condizioni di coscienza normali.

Figura 2.



Il protossido d'azoto e l'ossigeno sono stati somministrati seguendo il seguente protocollo:

- fase di induzione, dalla durata di 5 minuti, in cui si raggiungeva un'erogazione di 50% di N₂O e 50% O₂, con un flusso erogato di 5ml/min, riducendo la quantità di O₂ del 10% fino al raggiungimento di 50%.
- fase di sedazione, in cui veniva somministrato in maniera continua per 10 minuti (durata del trattamento odontoiatrico) 50% di N₂O e 50% O₂, con un flusso erogato di 5ml/min;
- fase finale, in cui, al termine del trattamento odontoiatrico, il paziente veniva sottoposto a 2 minuti di erogazione di O₂ al 100%. (87)

5.3.1.1 *Consenso informato*

Il genitore o il tutore del paziente minorenne doveva firmare il consenso informato alla sedazione cosciente. Quest'ultimo rappresenta un dovere e una garanzia per il dentista e per il paziente. In esso sono esplicitate le modalità di esecuzione della sedazione cosciente con protossido di azoto, la ragione del suo impiego e le possibili complicanze.

In seguito è allegato il documento medico-legale fatto firmare al legale rappresentante del minore.

CONSENSO INFORMATO ALLA SEDAZIONE COSCIENTE con protossido d'azoto e ossigeno

Per sedazione cosciente si intende quella sedazione per la quale l'utente è capace indipendentemente e continuamente di mantenere il controllo del respiro, rispondere agli stimoli tattili e cooperare ai comandi verbali, ottenendo la riduzione dell'ansia, dell'agitazione psicomotoria e del dolore.

Modalità di esecuzione

La sedazione cosciente viene effettuata tramite l'utilizzo del protossido d'azoto (nome della macchina), per via inalatoria, alla concentrazione indicata nelle linee guida, a seconda dell'età. L'inalazione avviene tramite una mascherina nasale, quindi il paziente sarà in grado di aprire la bocca e comunicare con l'odontoiatra e potrà allontanare in qualsiasi momento la mascherina.

Perché viene effettuata?

Gli obiettivi della sedazione sono quelli di cercare di ridurre ma non di eliminare

il disagio per il paziente, diminuendo il grado di ansia e il dolore provato. Lo scopo è quello di ottenere un effetto analgesico, sedativo e ansiolitico, mantenendo sempre il controllo autonomo del respiro e l'interazione con il mondo esterno.

Come si ottiene?

Il farmaco utilizzato è il protossido d'azoto (N_2O), associato ad ossigeno (O_2). Il protossido d'azoto è un gas poco solubile, e per questo motivo non viene accumulato nell'organismo. Per questa sua caratteristica, l'induzione alla sedazione è rapida, così come è rapida la reversibilità degli effetti dopo l'interruzione dell'erogazione. La sedazione può essere sospesa in qualsiasi momento.

Quali sono le complicanze?

Tra le sensazioni che si possono provare durante la sedazione si annoverano:

- Leggerezza degli arti e lieve formicolio degli stessi
- Sensazione di tranquillità
- Riduzione dello stress e dell'ansia
- Riduzione del dolore
- Riduzione del riflesso del vomito

Tra le complicanze, anche se rare, si possono annoverare:

- Ricordi e sensazioni emotive forti piacevoli o meno
- Nausea e vomito sono molto rari sia nei bambini che negli adulti
- Attenzione nella guida dei veicoli, nei 30' successivi alla sedazione

Dichiaro di avere perfettamente letto e compreso quanto esposto e di accettare di usare per le cure odontoiatriche la Sedazione Cosciente con Protossido d'Azoto e Ossigeno.

Data_____

Firma paziente_____ Firma

medico_____

5.3.1.2 *Apparecchio per la sedazione cosciente*

I componenti e il funzionamento della macchina della sedazione cosciente con protossido di azoto sono state precedentemente illustrate nella sezione 2.2.

5.3.1.3 *Salivette*

Le Salivette Sarstedt® sono costituite da

(a) Tappo

(b) Tampone

(c) Contenitore interno sospeso

(d) Contenitore per la centrifuga



Picture 1 Parts of the Salivette collection device

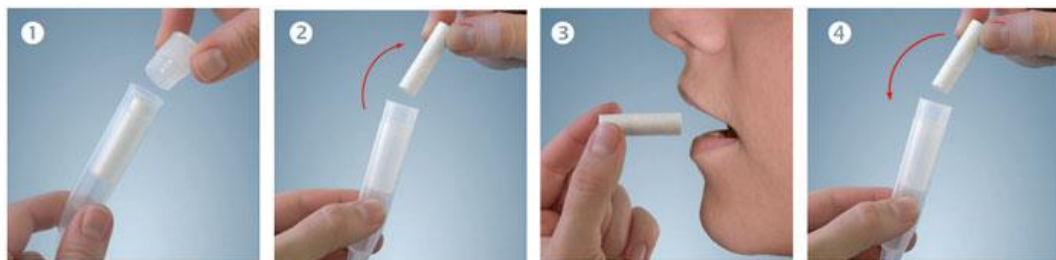
Cortisolo salivare Istruzioni per la raccolta del materiale biologico mediante Salivette Sarstedt®:

- Effettuare la raccolta della saliva all'ora indicata. Se la raccolta deve essere fatta al mattino, deve avvenire prima di lavarsi i denti. Durante il giorno il campione di saliva può essere raccolto non prima che siano passati 30 minuti dall'assunzione di cibi o bevande.
- Stringere saldamente il bordo del contenitore interno della Salivette (c) e rimuovere il tappo (a). La rimozione del tappo è facilitata se lo si spinge lateralmente.
- Estarre il tampone (b) dalla Salivette.
- Masticare delicatamente il tampone per un minuto.

- Riporre quindi il tampone nel contenitore interno e chiudere la Salivette premendo saldamente il tappo.
- Consegnare la Salivette, ben chiusa, al Centro Prelievi Ospedaliero.
- Nel caso di più campioni è importante conservarli in frigorifero.

Note importanti:

Prodotto non indicato per bambini al di sotto dei 3 anni o pazienti a rischio di deglutire la Salivette.



5.3.1.4 Spettrofotometria

La spettrofotometria è un metodo per misurare quanto una sostanza chimica assorbe fotoni quando il fascio luminoso passa attraverso la soluzione campione.

È uno dei metodi più utili di analisi quantitativa in campi come chimica, fisica, biochimica, ingegneria dei materiali e applicazioni cliniche.

Il principio di base è che ogni composto chimico assorbe, trasmette o riflette la luce (radiazione elettromagnetica) in un certo intervallo di lunghezza d'onda.

Lo spettrofotometro misura perciò l'assorbimento della luce in funzione della lunghezza d'onda negli UV e nelle regioni visibili e segue la legge di assorbimento della luce di Lambert-Beer. Secondo questa quando una luce monocromatica passa attraverso un mezzo assorbente, la quantità di luce che viene assorbita è

direttamente proporzionale al numero di molecole che assorbono la luce in quel mezzo o alla concentrazione di sostanza in quel mezzo. (83)

I componenti dello spettrofotometro sono sorgente di luce, collimatore, lente di condensazione, monocromatore, porta-campioni, selettore di lunghezza d'onda, cuvetta per la soluzione del campione, rivelatore fotoelettrico, e display digitale o misuratore.

Uno spettrofotometro, in generale, è costituito da due dispositivi: uno spettrometro e un fotometro. Uno spettrometro è un dispositivo che produce, tipicamente disperde e misura la luce. Un fotometro indica il rivelatore fotoelettrico che misura l'intensità della luce.

A seconda della gamma di lunghezza d'onda della sorgente luminosa, esistono due tipologie:

- Spettrofotometro UV-visibile: utilizza la luce nell'intervallo ultravioletto (185 - 400 nm) e visibile (400 - 700 nm) dello spettro delle radiazioni elettromagnetiche.
- Spettrofotometro IR: utilizza la luce nell'intervallo infrarosso (700 - 15000 nm) dello spettro delle radiazioni elettromagnetiche.

La luce proveniente dalla sorgente luminosa è nota come policroma o eterocromatica, poiché è composta da un'ampia gamma di lunghezze d'onda. La luce policroma viene riflessa indietro usando uno specchio piano che passa attraverso una fessura d'ingresso e cade sul monocromatore. Il monocromatore disperde la luce e la lunghezza d'onda desiderata viene focalizzata sulla fessura di uscita usando il selettore della lunghezza d'onda. (86)

I monocromatori producono radiazioni di lunghezza d'onda singola. Si basano sulla rifrazione tramite un prisma o sulla diffrazione tramite un reticolo. Per la regione visibile, i prismi sono costituiti da vetro e per la regione UV, da quarzo o silice. (86)

La fotocellula è un dispositivo fotoelettrico che converte l'energia luminosa in energia elettrica. Questa viene poi amplificata, rilevata e registrata. I fotoni colpiscono un catodo fotoelettrico nel vuoto, causando l'emissione di elettroni che è proporzionale all'intensità della radiazione, nelle fotocellule. Questi elettroni sono attratti da un elettrodo positivo e da un flusso di corrente, causando una differenza di potenziale attraverso un resistore incorporato nel sistema. Questa corrente viene amplificata elettronicamente e misurata.

Il tubo fotomoltiplicatore è simile ad una fotocellula in quanto ha un catodo con superficie fotoemissiva e un anodo a filo. Questi elettroni amplificati fluiscono verso l'anodo e viene generata una corrente fotoelettrica molto più grande di quella di una fotocellula.

$\lambda_{\max}$ è la particolare lunghezza d'onda alla quale le molecole che assorbono la luce assorbono la luce al massimo per un particolare composto. Essa è caratteristica di quel composto. (88)

5.4 Risultati

5.4.1 Risultati attesi

Ci si attende che il progetto di ricerca permetta di: (1) dimostrare l'efficacia del protossido d'azoto nell'abbattimento dell'ansia da procedura odontoiatrica, mediante il rilevamento dei livelli di cortisolo salivare; (2) correlare i dati oggettivi, ottenuti tramite la misurazione dei livelli di cortisolo salivare, con i dati soggettivi ottenuti tramite il test di Venham; (3) confrontare i risultati ottenuti dal test di Venham (V1, V2 e V3) tra il Gruppo protossido e il Gruppo controllo.

5.4.2 Rilevanza dei risultati

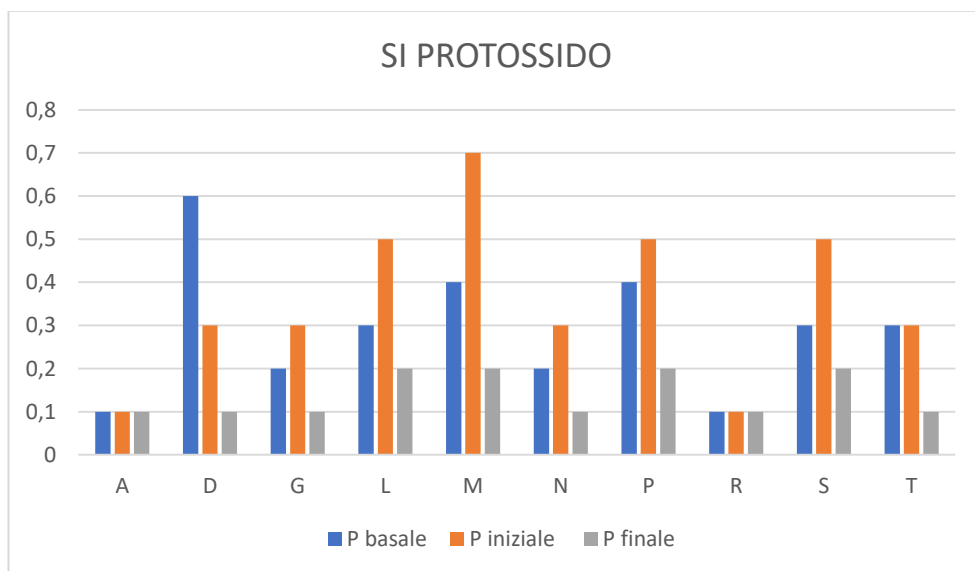
I risultati ottenuti da questo studio potranno portare miglioramenti nella pratica odontoiatrica, migliorando la collaborazione dei pazienti pediatrici e, di conseguenza, le prestazioni cliniche da parte dell'odontoiatra. Il protossido d'azoto è frequentemente impiegato in ambito medico, ma le possibilità di utilizzo in ambito odontoiatrico sono tutt'oggi poco conosciute per la mancanza di studi sperimentali. D'altra parte, l'ansia da poltrona odontoiatrica rappresenta

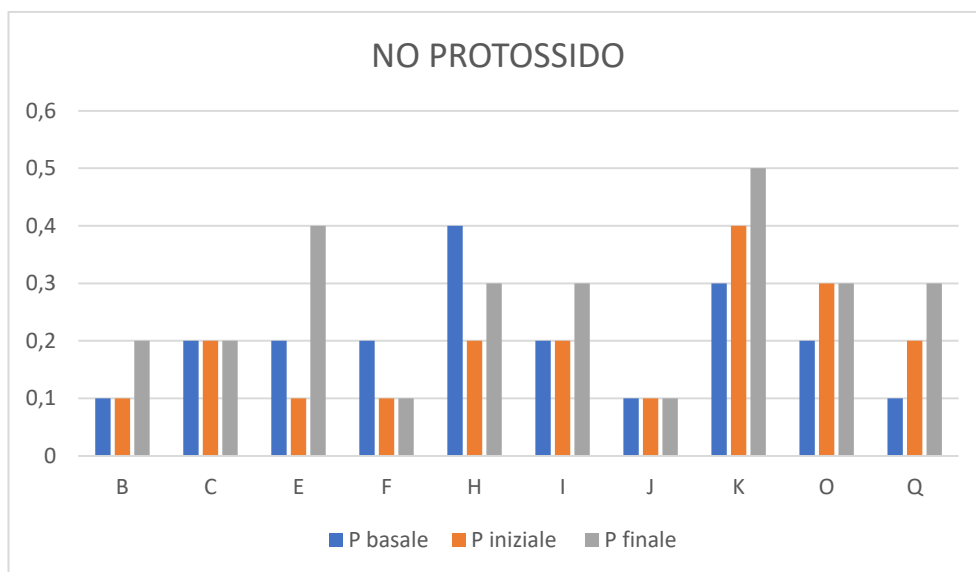
una problematica molto frequente. Per tale motivo, tale progetto potrà aumentare le conoscenze sull'utilizzo del protossido d'azoto, specialmente sulle sue potenzialità ansiolitiche, grazie alla raccolta di dati soggetti e oggettivi. I dati sono riportati di seguito nelle tabelle e nei grafici, ed espressi nell'unità di misura mcg/dl.

Pazienti	P basale	P iniziale	P finale	
A	0.1	0.1	0.1	SI
B	0.1	0.1	0.2	NO
C	0.2	0.2	0.2	NO
D	0.6	0.3	0.1	SI
E	0.2	0.1	0.4	NO
F	0.2	0.1	0.1	NO
G	0.2	0.3	0.1	SI
H	0.4	0.2	0.3	NO
I	0.2	0.2	0.3	NO
J	0.1	0.1	0.1	NO
K	0.3	0.4	0.5	NO
L	0.3	0.5	0.2	SI
M	0.4	0.7	0.2	SI
N	0.2	0.3	0.1	SI
O	0.2	0.3	0.3	NO
P	0.4	0.5	0.2	SI
Q	0.1	0.2	0.3	NO
R	0.1	0.1	0.1	SI
S	0.3	0.5	0.2	SI
T	0.3	0.3	0.1	SI

SI PROTOSSIDO			
<i>Pazienti</i>	<i>P basale</i>	<i>P iniziale</i>	<i>P finale</i>
A	0.1	0.1	0.1
D	0.6	0.3	0.1
G	0.2	0.3	0.1
L	0.3	0.5	0.2
M	0.4	0.7	0.2
N	0.2	0.3	0.1
P	0.4	0.5	0.2
R	0.1	0.1	0.1
S	0.3	0.5	0.2
T	0.3	0.3	0.1

NO PROTOSSIDO			
<i>Pazienti</i>	<i>P basale</i>	<i>P iniziale</i>	<i>P finale</i>
B	0.1	0.1	0.2
C	0.2	0.2	0.2
E	0.2	0.1	0.4
F	0.2	0.1	0.1
H	0.4	0.2	0.3
I	0.2	0.2	0.3
J	0.1	0.1	0.1
K	0.3	0.4	0.5
O	0.2	0.3	0.3
Q	0.1	0.2	0.3





CAPITOLO 6 CONCLUSIONI

Il presente studio ha cercato di provare l'efficacia della sedazione cosciente nei pazienti pediatrici. A tal fine, è stata condotta un'analisi di due gruppi di pazienti, il gruppo protossido e il gruppo controllo. Il campione era rappresentato da un totale di 20 pazienti, sia maschi che femmine, di età compresa tra i 6 e i 10 anni.

I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia del protossido d'azoto nella riduzione dell'ansia alla poltrona. Permettono inoltre di correlare i dati oggettivi, ottenuti tramite la misurazione dei livelli di cortisolo salivare, con i dati soggettivi ottenuti tramite il test di Venham. Questi risultati sono coerenti con le aspettative precedentemente espresse.

Tuttavia, è importante tenere presente che questa ricerca è stata sviluppata su un campione limitato; sono perciò necessari ulteriori approfondimenti e ricerche per testare la relazione tra cortisolo salivare e ansia alla poltrona, utilizzando la sedazione cosciente.

Una raccomandazione per ulteriori studi futuri potrebbe essere quella di realizzare uno studio simile ma che analizzi un numero maggiore di soggetti o uno studio che prenda in considerazione parametri differenti come il cortisolo sanguigno, urinario o del capello.

Concludendo, i risultati ottenuti dal presente studio potranno portare miglioramenti nella pratica odontoiatrica, aumentando le conoscenze sull'utilizzo del protossido d'azoto, specialmente sulle sue potenzialità ansiolitiche, grazie alla raccolta di dati soggettivi e oggettivi.

BIBLIOGRAFIA

1. California Dental Association Nitrous oxide. On-line all'URL https://www.cda.org/portals/0/pdfs/fact_sheets/nitrous_oxide_english.pdf.
2. Buslov A , Carroll M, Desai M S. Frozen in Time: A History of the Synthesis of Nitrous Oxide and How the Process Remained Unchanged for Over 2 Centuries; *Anesth & Analg Journal*. 2018; 127(1):65-70.
3. In Chi S; Complications caused by nitrous oxide in dental sedation; *J Dent Anesth Pain Med*. 2018; 18(2): 71–78.
4. Kaar S J, Ferris J, Waldron J, et al. Up: The rise of nitrous oxide abuse. An international survey of contemporary nitrous oxide use; *J Psychopharmacol*. 2016; 30(4):395-401.
5. Adhikari B M, Truong T, Bansal N et al. Use of gases in dairy manufacturing: A review; *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(15):2557-2569.
6. BD Racing, 2018, on-line all'URL <http://www.bdracing.it/protossido-di-azoto/>
7. Protossido di azoto, on-line all'URL <http://oasi.rse-web.it/index.php/protossido-di-azoto/>
8. Rilascio di protossido d'azoto nell'atmosfera in aumento secondo studio, Redazione, 2019, on-line all'URL <https://notiziescientifiche.it/rilascio-di-protossido-dazoto-nellatmosfera-in-aumento-secondo-studio/>
9. Chan M T V, Wan A C, Gin T et al. Chronic Postsurgical Pain After Nitrous Oxide Anesthesia; *Pain*. 2011; 152(11):2514-20.
10. Stephen Wilson S, Gosnell E. Survey of American Academy of Pediatric Dentistry on Nitrous Oxide and Sedation: 20 Years Later *Pediatr Dent*. 2016; 15;38(5):385-392.
11. Practice Guidelines for Moderate Procedural Sedation and Analgesia 2018: A Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force

- on Moderate Procedural Sedation and Analgesia, the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, American College of Radiology, American Dental Association, American Society of Dentist Anesthesiologists, and Society of Interventional Radiology*. *Anesthesiology* 2018;128(3):437-479.
12. AIFA Foglio illustrativo protossido di azoto. Milano; 2016.
 13. Fux-Noy A, Zohar M, Herzog K et al. The Effect of the Waiting Room's Environment on Level of Anxiety Experienced by Children Prior to Dental Treatment: A Case Control Study *BMC Oral Health*. 2019;19(1):294.
 14. Busato P, Rigo Garbín R, Nascimento Santos C, Paranhos L R, Rigo L. Influence of Maternal Anxiety on Child Anxiety During Dental Care: Cross-Sectional Study *Sao Paulo Med J*. 2017;135(2):116-122.
 15. Ghadimi S, Estaki Z, Rahbar P, Shamshiri A R. Effect of Visual Distraction on Children's Anxiety During Dental Treatment: A Crossover Randomized Clinical Trial *Eur Arch Paediatr Dent*. 2018;19(4):239-244.
 16. Gangwal R R, Badjatia S R, Dave B H. Effect of Exposure to Positive Images of Dentistry on Dental Anxiety among 7 to 12 Years Old Children *Int J Clin Pediatr Dent*. 2014; 7(3): 176–179.
 17. AAPD Behavior Guidance for the Pediatric Dental Patient, 2015. on-line all'URL
https://www.aapd.org/globalassets/media/policies_guidelines/bp_behavior_guide.pdf.
 18. Polimeni A Sedazione Terapia farmacologica in odontoiatria pediatrica In: Libro di Pedodonzia Antonella Polimeni. Seconda Ed. Trento Edra 2015: 468.
 19. Becker D E, Rosenberg M. Nitrous Oxide and the Inhalation Anesthetics *Anesth Prog*. 2008; 55(4):124–131.
 20. Eger E I, Lampe G H, Wauk L Z, Whitendale P, Cahalan M K , Donegan J H. Clinical Pharmacology of Nitrous Oxide: An Argument for Its Continued Use *Anesth Analg*. 1990;71(6):575-85.

21. Dennedy MC. Salivary cortisone and cortisol following synacthen, a future replacement for serum cortisol? Commentary to: Use of Salivary Cortisol and cortisone in the high and low dose synacthen test. Clin Endocrinol (Oxf). 2018;88(6):770-771.
22. Aksoy A, Cesur M G, Dağdeviren B H, Özkaynak Y A, Karacin G, Gültekin F. Assessment of Pain, Anxiety, and Cortisol Levels During the Initial Aligning Phase of Fixed Orthodontic Treatment Turk J Orthod. 2019; 32(1): 34–40.
23. Send T S, Bardtke S, Gilles M et al. Prenatal Maternal Stress Is Associated with Lower Cortisol and Cortisone Levels in the First Morning Urine of 45-month-old Children Psychoneuroendocrinology 2019;103:219-224.
24. Lee J M, Kim P J, Kim H G et al. Analysis of Brain Connectivity During Nitrous Oxide Sedation Using Graph Theory Sci Rep. 2020;10(1):2354.
25. Kiran S, Vithalani A, Sharma D J, Patel M C, Bhatt R, Srivastava M. Evaluation of the Efficacy of Play Therapy among Children Undergoing Dental Procedure through Drawings Assessed by Graphological Method: A Clinical Study Int J Clin Pediatr Dent. 2018; 11(5): 412–416.
26. Libro di Fisiologia Cindy Stanfield Stanfield C Messaggeri chimici In: Fisiologia. Quarta Ed. Napoli EdiSES 2017: 761.
27. Thau L, Gandhi J, Sharma S. Physiology, Cortisol. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
28. Miller C S, Dembo J B, Falace D A, Kaplan A L Salivary Cortisol Response to Dental Treatment of Varying Stress Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.1995;79(4):436-41.
29. Tzortzi C, Proff P, Redlich M et al. Cortisol Daily Rhythm in Saliva of Healthy School Children Int Dent J. 2009;59(1):12-8.
30. Kuhlman K R, Robles T F, Dickenson L, Reynolds B, Repetti R L. Stability of Diurnal Cortisol Measures Across Days, Weeks, and Years Across Middle Childhood and Early Adolescence: Exploring the Role of Age, Pubertal Development, and Sex Psychoneuroendocrinology 2019;100:67-74.

31. Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. The Cortisol Awakening Response: More Than a Measure of HPA Axis Function *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;35(1):97-103.
32. Jung C, Greco S, Nguyen H H T et al. Plasma, Salivary and Urinary Cortisol Levels Following Physiological and Stress Doses of Hydrocortisone in Normal Volunteers *Endocr Disord.* 2014;14:91.
33. Turpeinen U, Hämäläinen E. Determination of Cortisol in Serum, Saliva and Urine *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(6):795-801.
34. Darwish I A. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances *Int J Biomed Sci.* 2006; 2(3): 217–235.
35. Wilson T, Hastings J W. Bioluminescence *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:197-230.
36. AACC Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry The Swiss Army Knife for Clinical Laboratories, Paul Jannetto, 2015, . on-line all'URL <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2015/july/liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry>
37. El-Farhan N, Rees D A, Evans C. Measuring Cortisol in Serum, Urine and Saliva - Are Our Assays Good Enough? *Ann Clin Biochem.* 2017;54(3):308-322.
38. Boteaga Curcio W, Guimarães Abreu L, Faria Carrada C, Almeida Ribeiro Scalioni F, Almeida Ribeiro R. Relationship Between Salivary Cortisol Levels and Children's Behavior During a Dental Examination *J Dent Child (Chic).* 2017;84(2):80-85.
39. N.S. Singh, Ph.D. Thesis, Department of Physics, Manipur University, Manipur, India 2011.
40. Ivars K, Nelson N, Theodorsson A, Theodorsson E, Ström J O, Mörelius E. Development of Salivary Cortisol Circadian Rhythm and Reference Intervals in Full-Term Infants *PLoS One.* 2015;10(6):e0129502.

41. Fekkes D. State-of-the-art of High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Physiological Samples J Chromatogr B Biomed Appl. 1996;682(1):3-22.
42. Pitt J J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry Clin Biochem Rev. 2009; 30(1): 19–34.
43. Gros M, Petrović M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta. 2006;70(4):678-690.
44. Rockwood AL, Annesley TM, Sherman NE. Mass spectrometry. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th Ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2012:329–53.
45. Chen H, Horváth C. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. J Chromatogr A. 1995;705(1):3-20.
46. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. Indian J Endocrinol Metab. 2011;15(1):18-22.
47. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur J Pharmacol. 2008;583(2-3):174-185.
48. Strahler J, Fuchs R, Nater UM, Klaperski S. Impact of physical fitness on salivary stress markers in sedentary to low-active young to middle-aged men. Psychoneuroendocrinology. 2016;68:14-19.
49. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(5):1526-1540.
50. Goerig M, Schulte am Esch J. Frühe Beiträge zur Entwicklung der Lachgas-Sauerstoff-Anästhesie in Mitteleuropa [Early contributions for the

- development of nitrous oxide-oxygen anesthesia in central Europe]. *Anaesthesiol Reanim*. 2002;27(2):42-53.
51. Randhawa G, Bodenham A. The increasing recreational use of nitrous oxide: history revisited. *Br J Anaesth*. 2016;116(3):321-324.
 52. Schwilden H, Schüttler J. 200 years of nitrous oxide (laughing gas) and the end of an era?. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2001;36(10):640.
 53. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2015;386(9996):913-927.
 54. Lee DY, Kim E, Choi MH. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep*. 2015;48(4):209-216.
 55. Carter AE, Carter G, Boschen M, AlShwaimi E, George R. Pathways of fear and anxiety in dentistry: A review. *World J Clin Cases*. 2014;2(11):642-653.
 56. Menzies RG, Clarke JC. The etiology of fear of heights and its relationship to severity and individual response patterns. *Behav Res Ther*. 1993;31(4):355-365.
 57. Armfield JM. Development and psychometric evaluation of the Index of Dental Anxiety and Fear (IDAF-4C+). *Psychol Assess*. 2010;22(2):279-287.
 58. Armfield JM. Towards a better understanding of dental anxiety and fear: cognitions vs. experiences. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(3):259-264.
 59. Dailey YM, Humphris GM, Lennon MA. The use of dental anxiety questionnaires: a survey of a group of UK dental practitioners. *Br Dent J*. 2001;190(8):450-453.
 60. Moore R, Brødsgaard I, Abrahamsen R. A 3-year comparison of dental anxiety treatment outcomes: hypnosis, group therapy and individual desensitization vs. no specialist treatment. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(4):287-295.

61. Davies JG, Wilson KI, Clements AL. A joint approach to treating dental phobia: a re-evaluation of a collaboration between community dental services and specialist psychotherapy services ten years on [published correction appears in Br Dent J. 2011;211(6):262]. Br Dent J. 2011;211(4):159-162.
62. Lundgren J, Carlsson SG, Berggren U. Relaxation versus cognitive therapies for dental fear--a psychophysiological approach. Health Psychol. 2006;25(3):267-273.
63. Pine DS, Klein RG. Anxiety Disorders. In: Rutter's Child and Adolescent Psychiatry, Rutter M., editors. Oxford UK: Blackwell Publishing Ltd; 2009.
64. Moore R, Birn H. Faenomenet tandlaegeskraek [Phenomenon of dental fear]. Tandlaegebladet. 1990;94(2):34-41.
65. Heaton LJ, Leroux BG, Ruff PA, Coldwell SE. Computerized dental injection fear treatment: a randomized clinical trial. J Dent Res. 2013;92(7 Suppl):37S-42S.
66. Stivala F, Bonina F, Iacona G, Cordopatri F, Mazzone G. Effetti sulla stimolazione linfocitaria in vitro di sali alcalini di alcuni acidi aroil-idrazino-carboditioici e di derivati dell'1,3,4-ossadiazolo: ricerche preliminari [Effects of lymphocyte stimulation in vitro of alkaline salts of some aroyl-hydrazino-carbodithioic acids and 1,3,4-oxadiazole derivatives: preliminary research]. Boll Soc Ital Biol Sper. 1978;54(14):1264-1270.
67. Armfield JM, Stewart JF, Spencer AJ. The vicious cycle of dental fear: exploring the interplay between oral health, service utilization and dental fear. BMC Oral Health. 2007;7:1.
68. Themessl-Huber M, Freeman R, Humphris G, MacGillivray S, Terzi N. Empirical evidence of the relationship between parental and child dental fear: a structured review and meta-analysis. Int J Paediatr Dent. 2010;20(2):83-101.

69. Ten Berge M, Veerkamp JS, Hoogstraten J, Prins PJ. Parental beliefs on the origins of child dental fear in The Netherlands. *ASDC J Dent Child*. 2001;68(1):51-12.
70. Armfield JM, Spencer AJ, Stewart JF. Dental fear in Australia: who's afraid of the dentist?. *Aust Dent J*. 2006;51(1):78-85.
71. Willumsen T, Vassend O, Hoffart A. A comparison of cognitive therapy, applied relaxation, and nitrous oxide sedation in the treatment of dental fear. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(5):290-296.
72. Moore R, Brødsgaard I, Rosenberg N. The contribution of embarrassment to phobic dental anxiety: a qualitative research study. *BMC Psychiatry*. 2004;4:10.
73. Schwarz E, Birn H. Dental anxiety in Danish and Chinese adults--a cross-cultural perspective. *Soc Sci Med*. 1995;41(1):123-130.
74. Merckelbach H, Arntz A, de Jong P. Conditioning experiences in spider phobics. *Behav Res Ther*. 1991;29(4):333-335.
75. Rachman S. *Fear and Courage*. San Francisco: Freeman; 1978.
76. Fyer AJ, Mannuzza S, Chapman TF, Martin LY, Klein DF. Specificity in familial aggregation of phobic disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52(7):564-573.
77. Mineka S, Ohman A. Phobias and preparedness: the selective, automatic, and encapsulated nature of fear. *Biol Psychiatry*. 2002;52(10):927-937.
78. Carrillo-Díaz M, Crego A, Armfield J, Romero M. The moderating role of dental expectancies on the relationship between cognitive vulnerability and dental fear in children and adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41(3):269-278.
79. Kressin NR, Spiro A 3rd, Skinner KM. Negative affectivity and health-related quality of life. *Med Care*. 2000;38(8):858-867.
80. Mowrer O H In: *Learning Theory and the Symbolic Process* Prima Ed. New York John Wiley 1960.

81. Askew C, Field AP. The vicarious learning pathway to fear 40 years on. *Clin Psychol Rev.* 2008;28(7):1249-1265.
82. Waters AM, Wharton TA, Zimmer-Gembeck MJ, Craske MG. Threat-based cognitive biases in anxious children: comparison with non-anxious children before and after cognitive behavioural treatment. *Behav Res Ther.* 2008;46(3):358-374.
83. Atkins, Peter and Julio de Paula. *Physical Chemistry for the Life Sciences.* New York: Oxford University Press, 2006.
84. Gadicherla S, Shenoy RP, Patel B, Ray M, Naik B, Pentapati KC. Estimation of salivary cortisol among subjects undergoing dental extraction. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(2):e116-e119.
85. World Health Organization. *World Health Organization Child Growth Standards.* 2006. Accessed March 5, 2012.
86. Chang, Raymond. *Physical Chemistry for the Biosciences.* USA: University Science Books, 2005.
87. Corcuera-Flores JR, Silvestre-Rangil J, Cutando-Soriano A, López-Jiménez J. Current methods of sedation in dental patients - a systematic review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(5):e579-e586.
88. Spectrophotometer: Meaning, Parts and Operation | Laboratory | Biotechnology, on-line all'URL
<https://www.biotechnologynotes.com/biotechnology/laboratory-biotechnology/spectrophotometer-meaning-parts-and-operation-laboratory-biotechnology/1614>.
89. Salivette, Sarsted AG & co, on-line all'URL
https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf.