

PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA

INFLUÊNCIA DA ANSIEDADE E DO GÊNERO DO
AVALIADOR SOBRE A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
SULFURADOS VOLÁTEIS E BIOMARCADORES
SALIVARES

*Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Odontologia,
Área de Concentração em Fisiologia Oral.*

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Co-orientadora: Dra. Caroline Morini Calil

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

L628i	<p>Lima, Patricia Oliveira de. Influência da ansiedade e do gênero do avaliador sobre a produção de compostos sulfurados voláteis e biomarcadores salivares. / Patricia Oliveira de Lima. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Fernanda Klein Marcondes, Caroline Morini Calil. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Ciclo menstrual. 2. Proteínas salivares. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Calil, Caroline Morini. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Influence of anxiety and experimenter gender on the volatile sulfur compounds and salivary biomarkers production

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Menstrual cycle. 2. Salivary proteins

Área de Concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Fernanda Klein Marcondes, Olinda Tárzia, Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Data da Defesa: 25-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata PATRÍCIA OLIVEIRA DE LIMA aprovada.

Fernanda Klein Marcondes

Profa. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Olinda Tárzia

Profa. Dra. OLINDA TÁRZIA

Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Luiz e Deborah, por todo o apoio para que este trabalho pudesse ser concluído; por todo o carinho, amor e pelas palavras de confiança; por me ajudarem a me levantar e superar os momentos difíceis. Agradeço pelos simples olhar que acalma meu coração e conforta minha alma.

Ao meu irmão, Luis Fernando, pelo companheirismo e alegria de viver, tornando a vida das pessoas ao seu redor mais prazerosa.

À minha querida e eterna avó Iolanda, que mesmo tendo nos deixado, continua abençoando e iluminando meu caminho. Agradeço à senhora por todo orgulho, confiança e credibilidade em meu trabalho. Obrigada por estar sempre presente.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Fernanda Klein Marcondes, que possibilitou a realização deste trabalho, a concretização de um sonho. Pelos ensinamentos diários no exercício de seu ofício. Pelo seu exemplo como profissional, pela ética e competência com que conduz seus trabalhos, atitudes que tanto admiram seus alunos que buscam, à sua imagem, tornar-se bons profissionais. Obrigada pela paciência incansável na orientação deste trabalho; pelas críticas e sugestões que tanto me fizeram crescer.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, me fazendo acreditar que todos os sonhos podem ser alcançados.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba que tão bem me acolheu e pela infra-estrutura adequada à difusão do conhecimento, possibilitando a realização deste trabalho.

Aos voluntários, pela disponibilidade e boa vontade em auxiliar neste estudo. Por cederem parte de seu tempo para que este trabalho fosse realizado.

À FAPESP pelo apoio financeiro, concedendo-me a bolsa de estudos e o auxílio pesquisa.

À Caroline Morini Calil, co-orientadora prestativa, sempre disposta a ajudar. Obrigada pelos ensinamentos e pela experiência que auxiliaram em todo o delineamento, desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Obrigada pela amizade e companheirismo e muito obrigada por ser o elo entre mim e a Fisiologia, me abrindo as portas para meu primeiro contato com a experiência acadêmica.

Aos alunos de iniciação científica Eduardo Haruki Oзера e Pedro Henrique Moreira Paulo Tolentino por toda a ajuda no desenvolvimento deste estudo.

Ao Feliciano, técnico do laboratório de Fisiologia e Biofísica, pela amizade e momentos de descontração, por toda a ajuda na realização deste projeto e durante as aulas práticas com a Graduação.

À Eliete Riguetto, secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas e Elisa, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Érica e Raquel da Pós-Graduação e Eliane pela pronta disposição em auxiliar sempre

Aos meus amigos da Fisiologia: Rafaela, Mariana, Larissa, Bruna, Monaliza, Ana Paula, Rose, Nádia, Juliana, Letícia, Karla, Gustavo, Eduardo, Vander, Vinícius e Ivan pela amizade e companheirismo, tornando os meus dias mais alegres.

Às colegas da Farmacologia Lu Berto, Paty, Mirela e Cris pelos momentos de descontração.

À Daniela Baroni, minha amiga de coração, que dividiu comigo os melhores momentos vivenciados em Piracicaba.

Às minhas melhores amigas Gabi e Melina, por levantarem meu astral e me incentivarem sempre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho e compreenderam a minha ausência.

EPÍGRAFE

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerem que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade "

Paulo Freire

RESUMO

A halitose é a emanção de odores desagradáveis pelas narinas e pela cavidade oral, devido à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV) originados do metabolismo bacteriano, geralmente relacionados à higiene ou alterações bucais. Porém, fatores emocionais e o ciclo menstrual também influenciam a produção de CSV. Neste contexto, e considerando que o gênero do avaliador pode influenciar as respostas do voluntário, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da ansiedade e do gênero do avaliador sobre a produção de CSV e biomarcadores salivares. A situação de ansiedade foi induzida pelo *Video-Recorded Stroop Color-Word Test* (VRSCWT), validado como um modelo de ansiedade experimental. As concentrações bucais de CSV e salivares de cortisol, alfa-amilase, imunoglobulina A secretória (IgA) e proteínas totais, bem como as pressões arteriais sistólica e diastólica, frequência cardíaca (FC) e o fluxo salivar foram determinados antes e após a aplicação do VRSCWT. Os resultados foram avaliados utilizando-se Análise de Variância com Medidas Repetidas ($p < 0,05$). O VRSCWT induziu aumento significativo na concentração de CSV, em ambos os gêneros, sem influência do gênero do avaliador. Mulheres apresentaram maiores concentrações de CSV do que voluntários do gênero masculino, antes e após o VRSCWT. O VRSCWT também induziu aumento nos valores de pressão arterial em homens e mulheres em relação aos valores basais. O aumento na pressão arterial sistólica foi mais pronunciado quando os voluntários foram avaliados por um experimentador do gênero oposto. Mulheres, quando avaliadas pelo gênero oposto, apresentaram aumento significativo do cortisol e alfa amilase salivar em relação aos valores basais, sem alteração quando o VRSCWT foi aplicado por avaliador do mesmo gênero, ou em voluntários do gênero masculino. Não houve alteração sobre os valores de FC, fluxo salivar, IgAs e proteínas totais após a aplicação da situação ansiogênica. Os resultados demonstraram que o VRSCWT induziu ansiedade, a qual aumentou a produção de CSV, sendo que estes efeitos sofreram influência do gênero do voluntário e do avaliador.

Palavras – chaves: compostos sulfurados voláteis, ansiedade experimental, gênero do avaliador, ciclo menstrual, biomarcadores salivares.

ABSTRACT

Halitosis is the emanation of offensive odors from nostrils and oral cavity due to volatile sulfur compounds (VSC) production originated from bacterial metabolism, usually related to hygiene or oral alterations. However emotional factors and menstrual cycle have also been associated with the VSC production. In this context, and considering that the gender of the experimenter may influence the responses of the volunteer, the aim this study was to evaluate the influence of the anxiety and experimenter gender on the VSC and salivary biomarkers production. The anxiety was induced by Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT), validated as a model of experimental anxiety. The VSC concentration and salivary of cortisol, alpha-amylase, secretory IgA (sIgA) and total proteins, as well as, systolic and diastolic blood pressure, heart rate (HR) and salivary flow were evaluated before and after the application of the VRSCWT. Data were compared by Analysis of Variance with Repeated Measures ($p < 0.05$). The VRSCWT induced significant increase in the VSC concentration, in both genders, without influence of the experimenter gender. Women presented higher VSC concentration than men, before and after VRSCWT. The VRSCWT also induced increase in blood pressure in men and women in relation to basal values. The increase in systolic blood pressure was more pronounced when volunteers were evaluated by an experimenter of the opposite gender. Women, when evaluated by the opposite gender, presented a significant increase of cortisol and salivary alpha-amylase in relation baseline values, without changes when the VRSCWT was applied by the evaluator of the same gender, or male volunteers. There was no change on the values of HR, salivary flow, sIgA and total proteins after anxiogenic situation. The results showed that the VRSCWT induced anxiety and increased VSC production and that these effects were influenced by the volunteer and gender of the experimenter.

Key words: volatile sulfur compounds, experimental anxiety, gender of the experimenter, menstrual cycle, salivary biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS

CSV – Compostos sulfurados voláteis
COV – Compostos orgânicos voláteis
VRSCWT – *Video Recorded Stroop Color Word Test*
IgAs- Imunoglobulina A secretória
PAS – Pressão arterial sistólica
PAD – Pressão arterial diastólica
FC – Frequência cardíaca
H₂S – Sulfeto de hidrogênio
CH₃SH – Metilmercaptana
(CH₃)₂S – Dimetil sulfeto
CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina
ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
SNS- Sistema Nervoso Simpático
TSST - *Trier Social Stress Test*
ppb – partes por bilhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. PROPOSIÇÃO.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	20
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXO 1 (Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa.....	52
ANEXO 2 (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).....	53
ANEXO 3 (Beck Anxiety Inventory).....	58
ANEXO 4 (VRSCWT).....	59

1. INTRODUÇÃO

A emanação de odores desagradáveis pela cavidade oral halitose é uma das causas de halitose. Esta condição é causada por uma variedade de compostos sulfurados voláteis (CSV) e compostos orgânicos, que se originam na orofaringe ou no ar alveolar, a partir do metabolismo de bactérias gram-negativas sobre aminoácidos que contêm enxofre.

O mau hálito pode ser originado por numerosos fatores, como: gengivite, periodontite, próteses não higienizadas, inflamação nasal, sinusite crônica, diabetes mellitus, cirrose hepática, úlceras gastrointestinais, dentre outras (Attia & Marshal, 1882). Na maioria dos casos, a halitose tem origem na orofaringe (cerca de 90%), sendo que em 40% dos casos a origem desta condição se deve à formação de saburra lingual, principalmente no terço posterior do dorso da língua (Springfield *et al.*, 2001).

O estresse também tem sido sugerido como um agente etiológico do mau hálito, já que muitas vezes o paciente não apresenta nenhuma evidência clínica de patologias bucais que justifiquem sua causa. Diante disso, alguns estudos têm avaliado a influência das alterações emocionais sobre a produção de halitose (Kurihara & Marcondes, 2002; Queiroz *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006).

Um método importante e que tem sido muito utilizado para se avaliar a presença e a intensidade de estresse em humanos é por meio da quantificação de biomarcadores salivares. Nos últimos anos, houve um aumento no interesse do uso dos mesmos como indicadores das mudanças fisiológicas promovidas pelo estresse. A quantificação de cortisol é um método considerado eficaz para se avaliar estresse e ansiedade e reflete a atividade secretória do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). A alfa-amilase e a IgA secretória (IgAs) também têm sido propostas como biomarcadores do estresse, sendo que a primeira tem sido considerada um indicador da atividade simpática (Rohleder *et al.*, 2006), e a segunda, considerada um indicador do estado imune, ainda necessita de maiores esclarecimentos sobre seu mecanismo de produção frente a situações estressantes. Alguns estudos envolvendo situações ansiogênicas têm observado aumentos nas concentrações destas proteínas salivares (Evans *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1996), porém os resultados ainda são conflitantes.

A homeostasia da cavidade oral pode ser alterada por uma variedade de fatores

envolvendo relações complexas e há indícios que os hormônios sexuais apresentam importante papel nessa regulação (Mariotti, 1994). Alguns autores relataram que os hormônios sexuais apresentam potentes efeitos na manutenção da integridade dos tecidos periodontais e que as mudanças hormonais podem resultar em um aumento do fluido gengival, fornecendo nutrientes para microorganismos anaeróbios Gram-negativos (Koreeda, 2005; Güncü *et al.* 2005). Diante disso, tem sido demonstrado que as oscilações hormonais características do ciclo menstrual podem influenciar a produção de CSV em mulheres (Tonzetich *et al.*, 1978; Queiroz *et al.*, 2002, Calil, 2006); entretanto, há poucos estudos relatando se o estresse e a ansiedade podem exacerbar essas relações.

As alterações emocionais, como o estresse e a ansiedade, estão presentes com grande frequência no cotidiano das pessoas. Porém, seu estudo, nestas condições, torna-se complexo, já que fatores emocionais e sociais também devem ser levados em consideração. Desta forma, a ansiedade experimental, induzida laboratorialmente, tem sido estudada e aplicada, já que permite um melhor controle das variáveis experimentais. Um bom exemplo de modelo para indução de ansiedade experimental é o *Video Recorded Stroop Color Word Test* (VRSCWT), um modelo simples de teste que requer esforço mental. Este protocolo é baseado no conflito visual, já que as palavras são apresentadas em cores diferentes de seu real significado e tem se mostrado muito eficiente em induzir ansiedade (Leite *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004).

Um estudo conduzido por Calil (2006) observou que o VRSCWT foi capaz de induzir uma resposta ansiogênica somente em voluntários do gênero masculino, o que foi comprovado pelo aumento nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca. Os voluntários também apresentaram aumento nas concentrações de CSV após a aplicação do VRSCWT. Porém, em voluntárias do gênero feminino o teste não induziu ansiedade. Todos os voluntários foram submetidos ao teste por uma avaliadora do gênero feminino. A influência do gênero do avaliador na resposta à dor já foi sugerida por alguns autores (Larkin *et al.*, 1998; Kalai *et al.*, 2004). Assim, Kallai *et al.* (2004) observaram que voluntários homens e mulheres apresentaram maior tolerância ao estímulo doloroso quando examinados por alguém do gênero oposto ao seu. Já Larkin *et al.* (1998) relataram que homens, com alto nível de medo ou avaliação negativa em resposta a um questionário,

exibiram respostas cardiovasculares aumentadas a um teste mental apenas quando o observador era uma pessoa do gênero feminino. Entretanto, ainda existem poucos relatos na literatura relacionando a influência do gênero do experimentador sobre a eliciação de situações estressantes e ansiogências.

Sendo então o VRSCWT um modelo eficiente e validado na literatura e considerando-se que ainda não estão bem elucidados os mecanismos pelos quais o estresse e a ansiedade podem favorecer a produção de CSV, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da ansiedade experimental sobre a produção de CSV e das concentrações salivares de cortisol, alfa-amilase e IgAs, avaliando se o gênero do avaliador pode influenciar estas respostas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A halitose, também conhecida por mau odor ou mau hálito, é uma condição comumente vivenciada pela população em geral, constituindo um problema de saúde pública, e apresenta uma variedade de fatores etiológicos. Ela causa grandes constrangimentos a seus portadores, prejudicando o convívio social entre estas e os indivíduos com os quais se relacionam (Rosenberg & Culloch, 1992; Calil & Marcondes, 2006).

Entretanto, apesar de ser uma condição frequente, poucos cirurgiões-dentistas estão aptos a diagnosticar e estabelecer tratamentos eficazes para esse problema. Infelizmente, as faculdades de odontologia têm relevado esse assunto de grande importância e poucas são as disciplinas que abordam esse tópico em suas grades curriculares. Desta forma, os alunos são graduados despreparadamente, ou seja, sem grandes bases em relação ao mau hálito, e não sabem como solucionar esse mal que aflige uma grande parcela da população.

Os odores desagradáveis se devem à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV), especialmente sulfeto de hidrogênio (H_2S), metilmercaptana (CH_3SH), e dimetilsulfeto (CH_3SCH_3). Estes compostos resultam da degradação proteolítica, por bactérias orais gram-negativas, de aminoácidos que contêm enxofre, provenientes de restos alimentares, saliva, sangue e células epiteliais descamadas (Rosenberg *et al.*, 1991; Rosenberg & McCulloch, 1992; Springfield *et al.*, 2001). Outros gases como fenol, indol, escatol, putrescina e cadaverina também apresentam um papel relevante na produção de halitose (Springfield *et al.*, 2001).

Dentre os CSV, o H_2S e a CH_3SH são os principais gases responsáveis pelo mau hálito. Embora muitas bactérias produzam H_2S , a produção de CH_3SH , especialmente em grandes concentrações, está mais restrita à patógenos periodontais (Ratcliff & Johnson, 1999). Tem sido demonstrado que o H_2S é o composto predominante da halitose fisiológica, enquanto que a CH_3SH , o principal gás relacionado à doença periodontal (Yaegaki & Sanada, 1992). Esses dois compostos, principalmente a CH_3SH , têm sido considerados tóxicos, contribuindo para a etiologia da gengivite e periodontite. Estudos

observaram que a CH_3SH pode promover alteração da síntese do colágeno, aumentar a permeabilidade da mucosa intacta e estimular a produção de citocinas associadas com doença periodontal (Ratcliff & Johnson, 1999). Além disso, Person *et al.* (1990) encontraram que as taxas de $\text{H}_2\text{S}/\text{CH}_3\text{SH}$ estão consideravelmente aumentadas em bolsas periodontas de pacientes com periodontite. O terceiro principal CSV, o CH_3SCH_3 , também pode contribuir para a geração do mau hálito, podendo ser detectado na cavidade oral de alguns pacientes, mas, normalmente, são encontrados em concentrações menores, apresentando menor relevância dentre os CSV.

A maioria das espécies bacterianas que coloniza as superfícies orais, particularmente os tecidos duros, é sacarolítica, isto é, utilizam carboidratos como fonte de energia. Outras espécies são proteolíticas (assacarolíticas), pois utilizam proteínas, peptídeos ou aminoácidos como fonte de energia (Lindhe *et al.*, 1969). Algumas bactérias essencialmente proteolíticas, como a *Prevotella intermédia* ou o *Fusobacterium nucleatum*, quando se desenvolvem *in vitro*, são produtoras de mau odor e, por esta razão, presume-se que essas espécies contribuam para o mau hálito *in vivo*.

Há três métodos para se mensurar os CSV: avaliação organoléptica do ar emanado da cavidade oral, (Rosenberg & McCulloch, 1992), por meio de um monitor de sulfeto ou por cromatografia gasosa.

O método organoléptico consiste na avaliação subjetiva do odor emanado pela cavidade oral através do olfato humano de juízes treinados. Apesar das vantagens, como sua praticidade, não necessitar do uso de equipamentos e de simular as condições do dia a dia, apresenta como desvantagens a possibilidade de infecção e contaminação cruzada dos juízes que ficam constantemente expostos ao hálito de numerosas pessoas. Este tipo de análise pode ainda ter como desvantagem a adaptação dos receptores olfativos, dificultando as repetições de medidas (Rosenberg & McCulloch, 1992).

Os monitores de sulfeto têm sido caracterizados por apresentarem baixo custo, serem de fácil manuseio e possuírem pequenas dimensões, facilitando seu uso na prática clínica, destacando-se, dentre eles, o Halímetro® (Rosenberg *et al.*, 1991; Calil *et al.* 2006). Além disso, estudos têm demonstrado que eles apresentam melhor reprodutibilidade em comparação às avaliações organolépticas (Rosenberg, 1990; Rosenberg *et al.*, 1991).

Já os cromatógrafos gasosos, desenvolvidos por Tonzetich (1977), permitem a separação e quantificação dos gases que causam mau hálito, porém estes aparelhos exigem a presença de pessoal qualificado e alto custo de instalação, inviabilizado seu uso na prática clínica (Calil *et al.*, 2006). Recentemente um cromatógrafo portátil (Oral Chroma[®]) tem sido utilizado para avaliar as concentrações de CSV na cavidade oral (Aizawa *et al.*, 2005). Entretanto, apesar das pequenas dimensões e rápida obtenção das medidas, pouco é conhecido ainda a respeito de sua sensibilidade e especificidade na mensuração destes compostos.

A halitose pela manhã, ao acordar, é uma condição fisiológica conhecida como halitose matinal. Essa condição provavelmente ocorre devido à diminuição do fluxo salivar durante o sono, levando ao acúmulo de células epiteliais e alimentos na cavidade oral. A alimentação ou o ato de escovar os dentes remove essa halitose, sendo, portanto, uma condição passageira e controlável (Calil *et al.*, 2006). Já a halitose persistente é mais intensa e apresenta características peculiares à sua origem, sendo de mais difícil controle (Calil *et al.*, 2006) e pode estar relacionada à origens intra e extra-orais.

A maioria dos casos de halitose é ocasionada por fatores intra-orais, como má higiene bucal, placa dental, próteses não higienizadas, periodontite, saburra lingual ou por consumo de alimentos condimentados (Attia & Marshal, 1982; Calil *et al.* 2006). A presença de xerostomia também pode contribuir para o mau odor oral (Kleinberg *et al.*, 2002). Além disso, em uma menor porcentagem, o mau odor apresenta causas extra-orais, como desordens do trato respiratório, diabetes, doenças hepáticas, gastrointestinais e renais (Attia & Marshal, 1982). De acordo com a literatura, essas causas extra-orais podem estar associadas a odores típicos (acetona, enxofre, odor de peixe) como resultado da presença de compostos orgânicos voláteis (COV) no ar exalado oralmente e esses compostos podem fornecer uma informação valiosa sobre a condição fisiológica e patofisiológica do mau hálito (Miekisch *et al.*, 2004; van den Velde *et al.*, 2007).

Em relação à doença periodontal, tem sido observado que os CSV podem acelerar a destruição do tecido periodontal, o que pode explicar a razão de muitos pacientes frequentemente queixarem-se de mau hálito (Moritta & Wang, 2001). Diante disso, Yaegaki & Sanada (1992) indicaram que a saliva de pacientes com doença periodontal

contém altas concentrações de 2-quetobutirato, um metabólito intermediário na conversão de metionina para CH₃SH. Assim, pacientes com doença periodontal poderiam apresentar uma rápida conversão deste metabólito em um dos principais CSV responsáveis pela geração da halitose (Tsai *et al.*, 2008)

Entretanto, em alguns casos, o paciente não apresenta causas intra ou extra-orais que possam justificar a presença de halitose, causando grande constrangimento para o cirurgião-dentista que não consegue encontrar solução para o problema. Assim, fatores emocionais como o estresse e a ansiedade também têm sido relacionados à produção de CSV e conseqüente halitose (Eli *et al.*, 1996; Queiroz *et al.*, 2002; Kurihara & Marcondes, 2002; van den Broek *et al.*, 2007), porém, ainda existem poucos estudos que visem elucidar esta relação.

Biologicamente, a ansiedade pode ser definida como um estado emocional, ligado à percepção de determinados contextos ambientais (lugares, pessoas, atividades, etc.) que são comparados à vivência anterior (memória) e que ativam sistemas cerebrais específicos, com função adaptativa (sucesso do indivíduo) (Gray, 1987). A definição mais comum deste estado emocional é a de um sentimento de apreensão desagradável, vago, acompanhado de sensações físicas como o vazio no estômago, opressão no peito, palpitações, transpiração, dor de cabeça, falta de ar, aumento da frequência e dos batimentos cardíacos, tremores e sudorese, sintomas decorrentes da ativação do sistema simpático. Um sentimento de insegurança, causado pela expectativa de algum perigo, no qual a fonte é incerta, desconhecida (Graeff *et al.*, 1997). Já o estresse foi definido por Selye, em 1936, como um conjunto de defesas orgânicas contra qualquer forma de estímulo nocivo podendo ser de ordem física, psicológica ou psicossocial, definindo-a como a Síndrome Geral de Adaptação (Pacak & Palkovits, 2001), sendo esta reação que permite a adaptação dos seres vivos a estes estímulos aversivos, propiciando a sobrevivência dos mesmos (Selye, 1936). Mais recentemente, o estresse também foi definido por Chrousos & Gold (1992) como uma reação biológica a estímulos extrínsecos ou intrínsecos que resultam em perturbação da homeostasia.

Na área odontológica, a ansiedade e o estresse têm sido associados a reações alérgicas e inflamações orais, úlcera aftosa recorrente (Fábián & Fábián, 2000), doenças

periodontais e halitose (Queiroz *et al.*, 2002, Calil & Marcondes, 2006). Há ainda relatos da participação do estresse promovendo alteração dos mecanismos de homeostasia bucal (Queiroz *et al.*, 2002) Neste contexto, estes autores observaram que voluntários saudáveis apresentaram redução do fluxo salivar antes de um exame acadêmico, fator que contribuiu para o aumento na produção de CSV.

Algumas proteínas salivares, como a imunoglobulina A secretória (IgAs) e a lactoferrina, podem ter suas concentrações alteradas em situações de hipossalivação, como aquelas induzidas por terapia de radiação de cabeça e pescoço ou mesmo em indivíduos com síndrome de Sjögren (Almståhl *et al.*, 2001). Por serem fatores antimicrobianos, alterações nos níveis dessas proteínas também poderiam favorecer o acúmulo de microrganismos e, conseqüentemente, favorecer a produção de CSV. Porém, o efeito de alterações emocionais sobre a secreção das mesmas não está esclarecido na literatura.

Ainda em relação às proteínas salivares, o conceito de “anfifuncionalidade” (Levine, 1993; Bosch *et al.*, 2003) foi utilizado para descrever como estas atuam para regular a saúde oral. Ele sugere que as proteínas podem apresentar propriedades tanto danosas, favorecendo o potencial patogênico de outros organismos, quanto protetoras, contribuindo para a defesa do hospedeiro, dependendo do sítio ou local de ação da proteína. Por exemplo, a alfa-amilase, quando em solução, pode facilitar a eliminação de alguns tipos de microrganismos da cavidade oral e, por outro lado, quando adsorvida à superfície dental, facilita a aderência dessas bactérias (Levine, 1993).

Entretanto, apesar dos indícios sobre a participação da hipossalivação, da diminuição da atividade imunológica e das alterações nas concentrações de algumas proteínas salivares, induzidas pelo estresse ou ansiedade no desenvolvimento da halitose, ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais o estresse e a ansiedade contribuem para a ocorrência do mau hálito (Calil & Marcondes, 2006).

As alterações emocionais (estresse e ansiedade) podem ser influenciadas por várias características do indivíduo, tais como o ciclo reprodutivo, o gênero, as características genéticas e a idade (Bánky *et al.*, 1994; Horan, 2000). A influência do ciclo menstrual feminino tem sido cada vez mais considerada e estudada e as oscilações hormonais características do ciclo menstrual e síndrome pré-menstrual podem alterar a

homeostasia bucal e interferir em tratamentos odontológicos, como tem se observado através do aumento de exsudato gengival, descamação de células epiteliais da cavidade oral (Egelberg, 1964; Loe & Silness 1967; Lindhe & Attstrom 1967; Lindhe *et al.*, 1969) e também pelo surgimento da halitose (Tonzetich *et al.*, 1978). Diante disso, Queiroz *et al.* (2002) observaram uma maior produção de CSV em mulheres que sofriam de síndrome pré-menstrual. Porém, embora possamos considerar que, em mulheres, as flutuações hormonais acompanhadas de estresse e ansiedade poderiam alterar a homeostasia bucal, ainda não há trabalhos suficientes para esclarecer os mecanismos pelos quais o ciclo menstrual interfere na produção de CSV, relacionada ou não a situações estressantes e ansiogênicas.

A mensuração da intensidade do estresse em um indivíduo pode ser realizada por meio de duas principais maneiras: aplicação de questionários validados na literatura e quantificação de alguns marcadores do estresse, a qual pode ser realizada na saliva ou no sangue. Em relação aos questionários, o *Beck Anxiety Inventory* (BAI) tem sido amplamente utilizado e é considerado um método validado na literatura para avaliar os níveis de estresse (Beck & Sterr, 1993).

Atualmente, o cortisol tem sido utilizado rotineiramente como biomarcador do estresse. A quantificação de cortisol na saliva tem sido amplamente utilizada, sendo considerada um método bastante confiável, devido à simplicidade na coleta das amostras e também pelas correlações com as concentrações sanguíneas deste hormônio. A adaptação a estressores físicos ou psicológicos geralmente envolve a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando na liberação do hormônio corticosteróide cortisol pelo córtex da glândula supra-renal (Dallman *et al.*, 1994).

Além do cortisol, a enzima salivar alfa-amilase tem sido proposta como um marcador da atividade simpática induzida pelo estresse (Rohleder *et al.*, 2006), tendo sido observados aumentos significativos na concentração salivar de alfa-amilase em resposta a situações ansiogênicas (Bosch *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 2003; Granger *et al.*, 2006). Foi proposto que a avaliação da concentração salivar de alfa-amilase pode auxiliar na compreensão de mecanismos envolvidos na fisiologia do estresse, funções comportamentais e cognitivas (Granger *et al.*, 2007).

A IgAs também tem sido utilizada em vários estudos como um marcador de estresse, por ser considerada um indicador do estado imune, porém os dados disponíveis são conflitantes. Apesar de haver estudos mostrando que o estresse psicossocial crônico está associado à diminuição na produção de IgAs, favorecendo a ocorrência de doenças do trato respiratório superior (Cohen *et al.*, 1991; Totman *et al.*, 1980), estudos com estressores psicofisiológicos agudos, como falar em público (Evans *et al.*, 1994), apresentações orais (Bristow *et al.*, 1997) e testes mentais aritméticos (Willemsen *et al.*, 1998) estão associados a aumentos na produção de IgAs. Por outro lado, estudos envolvendo estresse agudo por avaliação acadêmica não evidenciaram alterações nas concentrações de IgAs (Ng *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2000).

Clinicamente, é difícil a determinação exata das causas que induzem estresse e ansiedade nos pacientes, pois além do medo associado ao próprio tratamento odontológico, deve-se levar em consideração que outros fatores (sociais, econômicos, psicológicos) também existem e podem acentuar aqueles relacionados ao tratamento. Diante disso, a indução de ansiedade em laboratório, através de protocolos experimentais, permite a padronização de variáveis e um maior controle sobre a indução e intensidade do estímulo, evidenciando a importância do desenvolvimento desses protocolos experimentais.

A ansiedade pode ser induzida por: procedimentos laboratoriais (como falar em público), situações da vida real (como cirurgias dentais) e administrações de drogas (como por exemplo, cafeína) (Silva *et al.*, 2004). Esses protocolos têm algumas vantagens, como o fácil recrutamento de voluntários, a rapidez na execução dos procedimentos, além do maior controle e homogeneidade da indução da ansiedade (Calil & Marcondes, 2006). Dentre estes procedimentos, os testes mentais (testes mentais aritméticos, *Stroop color-word test*) e o estímulo de falar em público são os mais utilizados. Em 1999, Leite *et al.* verificaram a eficiência do *Vídeo Recorded Stroop Color Word Test* (VRSCWT) como um modelo experimental para indução de ansiedade em humanos.

Em um trabalho prévio, observamos que o VRSCWT induziu aumento nas concentrações orais de CSV, sem alteração do fluxo salivar, em um grupo de homens saudáveis sistêmica e oralmente. Este efeito foi acompanhado do aumento na frequência cardíaca e pressão arterial sistólica que são indicadores da ativação simpática, confirmando

que o teste utilizado representava uma situação estressante (Calil & Marcondes, 2006). Porém, o VRSCWT não induziu ansiedade em mulheres (Calil, 2006). Ao avaliarmos as possíveis explicações para esta diferença, nossa hipótese é de que a aplicação do teste por uma mulher possa ter comprometido a indução da ansiedade nas voluntárias, já que a pesquisadora examinadora era do mesmo gênero que as voluntárias e estas adquiriram certa intimidade com a avaliadora. Neste contexto, Kallai *et al.* (2004), em um estudo sobre a influência do gênero do examinador na percepção e intensidade da dor, verificaram que tanto homens como mulheres demonstraram uma tolerância maior ao estímulo doloroso quando testados por alguém do gênero oposto, e provavelmente essa estratégia foi usada pelos voluntários como uma tentativa de impressionar o examinador do gênero oposto.

Assim, com o objetivo de avaliar a relação entre produção de CSV e ansiedade experimental, em homens e em mulheres (na fase menstrual), e a fim de complementar o estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, examinando-se o efeito do gênero do examinador na resposta ao VRSCWT, o presente estudo foi desenvolvido.

3. PROPOSIÇÃO

Estudar o efeito da ansiedade experimental e do gênero do avaliador sobre a produção de CSV em indivíduos saudáveis (homens e mulheres na fase menstrual), por meio da determinação da concentração oral de compostos sulfurados voláteis, nível de ansiedade, pressão arterial, frequência cardíaca, fluxo salivar, concentração salivar de cortisol, alfa amilase, IgA secretória e proteínas totais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos voluntários

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, participaram do estudo 39 voluntários, sendo 19 homens e 20 mulheres, com faixa etária entre 20 e 24 anos, do 2º e 3º ano do curso de Graduação em Odontologia da FOP – UNICAMP. Como critério de inclusão foi considerada a ausência de doenças periodontais, cáries, língua saburrosa, próteses, aftas e/ou ulcerações, alterações sistêmicas e/ou nasofaríngeas e respiração bucal já que todos esses fatores podem favorecer a produção dos CSV na boca. Para avaliação das condições bucais do paciente, antes de se submeterem ao experimento, foi realizada anamnese e exame clínico minucioso em cada voluntário. Neste, observou-se a condição periodontal, através de um índice de placa e gengival, sendo que os voluntários com mais de 10% de placa foram excluídos da amostra. Neste exame também foi avaliada a presença e o grau de saburra lingual dos voluntários, seguindo-se o seguinte índice:

- 0 – ausência de saburra
- 1 – saburra cobrindo menos que 1/3 do dorso da língua
- 2 - saburra cobrindo menos que 2/3 do dorso da língua
- 3 - saburra cobrindo mais que 2/3 do dorso da língua

Inicialmente abordamos 64 voluntários para participarem da pesquisa. Apenas um possível voluntário foi excluído por necessidade de tratamento odontológico (tratamento endodôntico e periodontal), sendo então devidamente encaminhado para tal. Três possíveis voluntários, que apresentaram níveis 2 ou 3 de saburra lingual, foram excluídos da amostra, e receberam limpadores linguais e instruções para higienização da língua. Os voluntários que apresentaram nível 1 de saburra, receberam um limpador lingual e instruções de higiene da língua para que a saburra fosse eliminada, sendo que antes do início do experimento um novo exame clínico foi realizado para a constatação da ausência de saburra.

Quando o intervalo entre a primeira e a segunda avaliação foi maior que 40 dias, novo exame clínico foi feito a fim de comprovar o bom estado de saúde bucal dos

voluntários.

Para as mulheres o período de seleção teve início seis meses antes do experimento para a determinação da duração do ciclo menstrual e de suas fases. Foram selecionadas aquelas que apresentaram regularidade no ciclo, sem a administração de qualquer anticoncepcional oral ou injetável. Para isso, foram abordadas 40 possíveis voluntárias, das quais foram selecionadas as 20 que apresentaram maior regularidade do ciclo. Uma das voluntárias, por iniciar o uso de anticoncepcional hormonal, no período em que estava sendo feita a avaliação da regularidade do ciclo menstrual destas, foi excluída da amostra. Um dos voluntários foi excluído da amostra por não querer mais participar do estudo e o número final de homens que compôs a amostra foi igual a 19.

Assim, considerando-se que 20 voluntárias foram excluídas por apresentarem pequenas irregularidades no ciclo menstrual, 4 voluntários foram excluídos por não apresentarem excelentes condições orais ao exame clínico e 1 voluntário desistiu do experimento, obtivemos um tamanho amostral de 39 voluntários que participaram deste experimento.

4.2. Delineamento Experimental

Em dia pré-determinado, os voluntários em jejum, no início da manhã, foram solicitados a comparecer ao Laboratório de Estresse da FOP – UNICAMP. Inicialmente os voluntários responderam ao *Beck Anxiety Inventory* (Beck & Sterr, 1993), para avaliação do nível basal de ansiedade. Em seguida, foi realizada a mensuração dos CSV, seguida pela determinação da pressão arterial e frequência cardíaca e coleta de saliva para posterior dosagem de cortisol e proteínas salivares, e posteriormente, eles foram submetidos ao teste de indução de ansiedade (VRSCWT). Imediatamente após o teste, foi feita nova mensuração dos CSV, nova coleta de saliva, e avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca. Terminado o experimento, foi oferecido um café da manhã completo nas dependências do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP - UNICAMP.

Os voluntários foram avaliados duas vezes, sendo que todos os procedimentos foram repetidos 30 a 45 dias após a primeira avaliação. Todo o experimento foi conduzido por um homem e por uma mulher (alunos do Programa de Pós-Graduação do Laboratório

de Estresse da FOP – UNICAMP), segundo aleatorização para experimento cruzado. Este sorteio estabeleceu se os voluntários seriam avaliados inicialmente por um homem ou por uma mulher, permitindo o delineamento do experimento.

4.3. Caracterização do ciclo menstrual

Em estudo anterior observamos que, em situação basal, mulheres nas fases pré-menstrual e menstrual apresentaram maiores concentrações de CSV do que mulheres na fase folicular e homens, e também que mulheres, na fase menstrual, apresentaram maiores concentrações de cortisol do que homens e mulheres nas fases folicular e pré-menstrual (Calil *et al.*, 2008). Assim, participaram deste estudo mulheres, durante a fase menstrual. A determinação do ciclo menstrual foi realizada pelo método do calendário. Optamos por este método, por ser preciso (quando há regularidade) e por eliminar as coletas de sangue já que todo procedimento invasivo seria mais um agente estressor no protocolo experimental, além do alto custo de repetidas dosagens hormonais de estrógeno e progesterona.

Seis meses antes do início do experimento, foi distribuído para cada voluntária um calendário. Durante este período, foi solicitado que elas anotassem mensalmente o primeiro e último dia de fluxo menstrual. Após esses seis meses foram selecionadas aquelas que apresentassem regularidade no ciclo menstrual. Com base na duração média do ciclo menstrual de cada voluntária, foi possível estimar o primeiro dia de fluxo menstrual e planejar a coleta de dados para cada voluntária.

4.4. Avaliação do Nível Basal de Ansiedade

No dia do experimento, antes da primeira mensuração dos CSV e coleta de saliva foi aplicado um questionário que tem a finalidade de revelar o nível basal de ansiedade dos voluntários. O *Beck Anxiety Inventory* é um instrumento de auto-relato, que mede a intensidade dos sintomas de ansiedade (Anexo 3). Além disso, é de fácil aplicação, com tempo médio de 10 minutos. É composto por 21 itens descritos na forma de comportamentos característicos e sentimentos que um sujeito com um estado de ansiedade alterado provavelmente estará sentindo, numa escala de avaliação de quatro pontos: absolutamente não, levemente, moderada e gravemente. Esses comportamentos se revelam

na forma de sensação de calor, medo de morrer, dificuldade de respirar, etc.

4.5. Medida dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

A mensuração dos CSV foi realizada utilizando-se um halímetro (*Halímetro RK17K, n de série H15248*, Interscan Co), de acordo com o protocolo descrito por Queiroz *et al.* (2002) e Calil & Marcondes (2006). Primeiramente foi solicitado que o voluntário permanecesse com a boca fechada por um minuto, mantendo normalmente a respiração pela cavidade nasal. Em seguida, uma cânula de plástico foi introduzida na cavidade bucal e assim o voluntário permaneceu com a boca entreaberta, aproximadamente 1,5cm. Recebeu orientações para não mover a língua e os lábios durante a coleta e assim evitar que os mesmos tocassem a cânula e interrompessem a sucção do ar bucal pelo aparelho. A respiração foi interrompida durante a mensuração, mas o voluntário foi orientado a respirar novamente caso sentisse algum desconforto. Porém, geralmente o valor era obtido antes que o voluntário sentisse necessidade de voltar a respirar. O valor das medidas foi expresso em partes por bilhão (ppb) em um monitor digital. Foram anotados dois valores, obtendo-se uma média dos mesmos (Figura 1).

As medidas dos CSV também foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso, o Oral Chroma® (Oral Chroma®, Abilit Corporation, Osaka, Japão) (Figura 2). Para essas medidas, inseriu-se uma seringa na cavidade oral dos voluntários, pedindo que a segurasse com os lábios sem que encostasse a língua em sua extremidade, durante o tempo de 1 minuto. Após esse tempo o ar foi coletado da cavidade oral dos voluntários, puxando-se o êmbolo da seringa. Após coletado o ar, uma parte dele foi descartado, empurrando-se a seringa até a marca de 0,5 mm, e o ar restante foi inserido no aparelho (Figura 3). Dentro de 8 minutos, os resultados de compostos sulfurados voláteis foram mensurados e expressos em: concentração de sulfeto de hidrogênio (H_2S), metilmercaptana (CH_3SH) e dimetilsulfeto (CH_3SCH_3).



Figura 1. Mensuração dos CSV pelo Halímetro



Figura 2. Equipamento Oral Chroma



Figura 3. Inserção do ar no aparelho Oral Chroma

4.6. Determinação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A determinação da pressão arterial foi feita utilizando-se um monitor digital (Digital Blood Pressure Monitor, marca *Pro Check*), recentemente calibrado. Para aferição da pressão arterial alguns cuidados foram tomados para maior precisão das medidas, como repouso inicial por 2 minutos e posição sentada com o braço apoiado em uma bancada, na altura do coração. As aferições foram realizadas sempre no braço direito do voluntário para maior precisão dos resultados.

Esta avaliação foi realizada como medida complementar para avaliar o nível

de estresse dos voluntários, já que a ativação simpática desencadeada por estímulos estressores resulta em aumento da atividade cardíaca e da resistência periférica. Foram determinados os valores de frequência cardíaca, pressão arterial média, sistólica e diastólica.

4.7. Coleta de Saliva

Foi feita a coleta de saliva não estimulada, de acordo com Tárzia (2003). O voluntário foi orientado a deglutir a saliva, que se encontrava na boca, e em seguida depositar no frasco toda a saliva que fosse secretada durante os cinco minutos seguintes. O volume obtido foi dividido por cinco e o resultado, apresentado em mL/ min. A saliva coletada foi centrifugada, e o sobrenadante foi armazenado em recipientes plásticos esterilizados, e colocados em gelo para sua conservação durante o transporte até armazenagem em freezer, para posterior dosagem de cortisol e proteínas totais (-20⁰C) e demais proteínas salivares (-70⁰C).

4.8. Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (condição ansiogência)

A situação eliciadora de ansiedade consistiu em se apresentar ao sujeito experimental uma prancha contendo 100 palavras designativas de cores (azul, amarelo, vermelho, verde e violeta), dispostas em uma matriz 10x10. Cada palavra foi pintada de uma cor diferente de seu significado e apresentada em ordem aleatória (Anexo 4). O sujeito deveria mencionar, na seqüência apresentada, a cor visualizada sem se importar com a palavra escrita. A tarefa deveria ser realizada em 2 minutos, e cada erro foi sinalizado com o toque de uma campainha. Toda situação do teste foi monitorada por uma vídeo-câmera e apresentada simultaneamente ao sujeito, em um monitor de TV, enquanto ele realizava a tarefa.

As instruções para o teste foram reproduzidas em uma fita cassete, sendo que a voz utilizada com as orientações ao voluntário estava de acordo com o gênero do avaliador, ou seja, quando o avaliador era uma pessoa do gênero masculino, a voz reproduzida pela fita também era masculina, da mesma forma que quando uma pessoa do gênero feminino aplicou o teste, a voz apresentada era feminina.

É importante relatar que todos os procedimentos, desde a recepção do

voluntário até a finalização do teste foram realizados pelo mesmo avaliador, seja ele homem ou mulher, de acordo com a ordem definida por sorteio, para a realização das avaliações. Desta forma, obtivemos maior controle sobre a influência do gênero do avaliador sobre as reações do voluntário.

4.9. Dosagens Bioquímicas

As concentrações salivares de cortisol foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se o Kit DSL ACTIVE® (Calil *et al.*, 2008). O coeficiente de variação dos ensaios foi menor que 10%. As concentrações de alfa-amilase e IgAs também foram determinadas por ELISA utilizando-se Kit Salimetrics (O'Donnell *et al.*, 2009; Shirtcliff *et al.*, 2001). A concentração de proteínas totais foi determinada através de Ensaio de Proteínas Comassie Plus (Bradford, 1976) da Thermo Scientific.

4.10. Análise Estatística

Para análise estatística foram considerados os seguintes fatores: gênero do voluntário, gênero do avaliador e efeito do teste de ansiedade sobre os voluntários. O planejamento para a coleta de dados e aleatorização da ordem do gênero do avaliador na aplicação do teste de ansiedade foram realizados sob assessoria de um profissional da área de estatística.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância com Medidas Repetidas através do procedimento MIXED do Sistema SAS*. Foi selecionada através do mínimo AIC à estrutura de covariância desestruturada e autorregressiva e o método de estimação REML. As comparações múltiplas de médias para os fatores principais e interações pré-planejadas foram feitas através do teste t de Student. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

* SAS Institute Inc. The SAS System – release 9.2- SP4- SAS Institute Inc, Cary: NC, 2002.

5. RESULTADOS

Anteriormente ao início do experimento, foi aplicado o questionário da escala Beck (*Beck Anxiety Inventory - BAI*) a todos os voluntários para avaliar seus níveis basais de ansiedade, o que poderia influenciar os resultados do experimento. Não foram detectadas alterações nos níveis de ansiedade dos indivíduos, já que todos apresentaram grau mínimo ou leve (Tabela 1).

Tabela 1. Nível de ansiedade dos voluntários, de acordo com *Beck Anxiety Inventory*, na situação basal, quando avaliados por um homem e por uma mulher.

Grau de ansiedade	Avaliador Homem		Avaliador Mulher	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
N	19	20	19	20
Mínimo	68,4%	60%	73,7%	75%
Leve	31,6%	40%	26,3%	25%
Moderado	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0

O teste de ansiedade induziu aumento dos valores de CSV em voluntários de ambos os gêneros ($p < 0,05$; Figura 4A), sem influência do gênero do avaliador ($p > 0,05$; Figura 4A). A concentração bucal de CSV apresentou-se maior em mulheres na fase menstrual em comparação com os homens, em situação basal e também após a aplicação do teste de ansiedade ($p < 0,05$; Figura 4A).

Os mesmos efeitos do teste de ansiedade e do gênero do voluntário foram observados sobre a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) (Figura 4B). Já em relação à metilmercaptana (CH_3SH) apenas homens apresentaram aumento significativo na produção deste composto após o teste de ansiedade, e este aumento foi observado apenas quando avaliados por uma pessoa do mesmo gênero (Figura 4C). Com relação ao dimetilsulfeto (CH_3SCH_3), embora sua produção não tenha sido alterada pela aplicação do VRSCWT ($p > 0,05$; Figura 4D), o gênero do avaliador parece influenciar sua produção, sendo que

quando o avaliador era do gênero feminino, homens e mulheres apresentaram maiores concentrações deste composto em relação aos valores obtidos quando o gênero do avaliador era masculino ($p < 0,05$; Figura 4D).

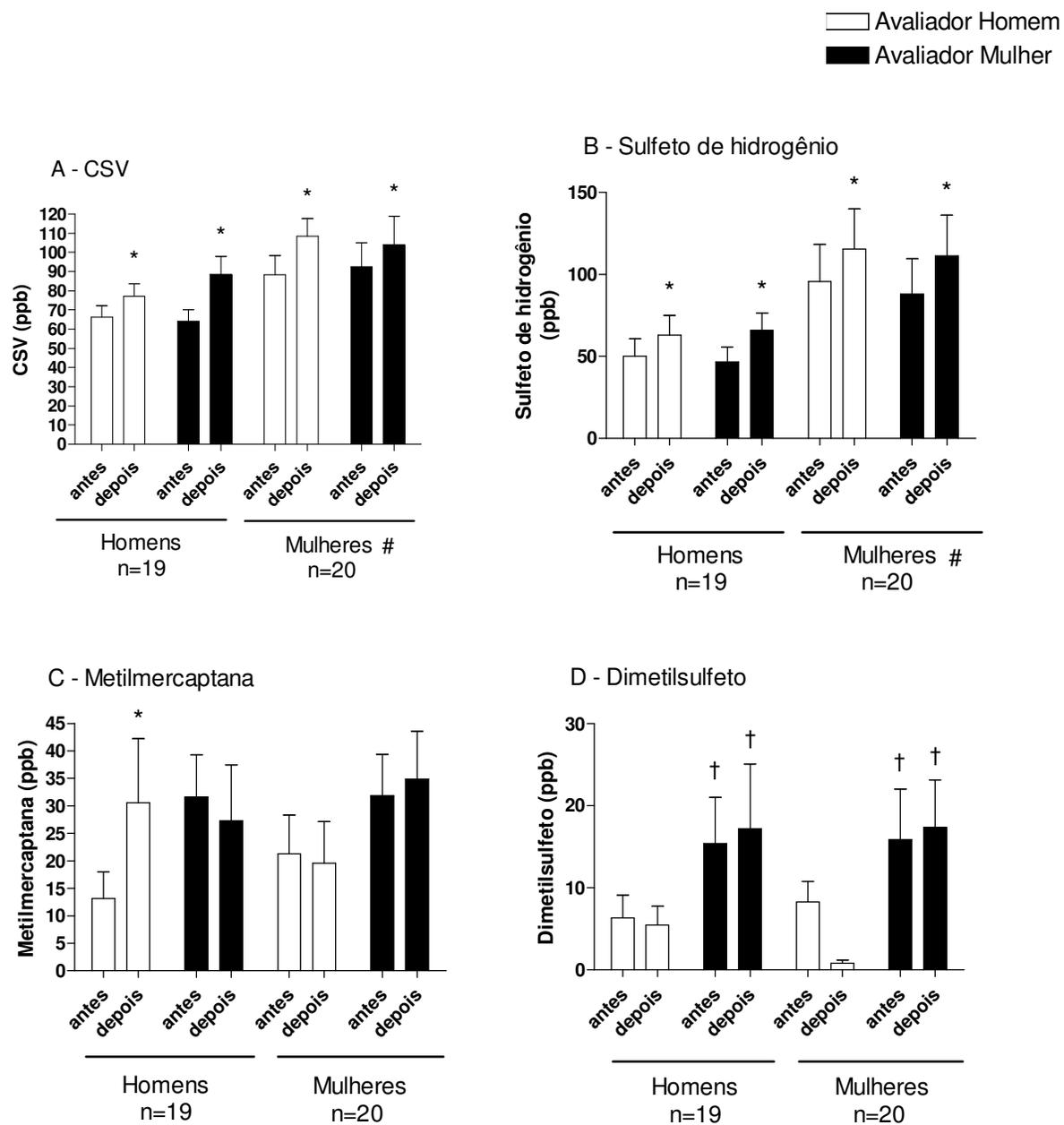
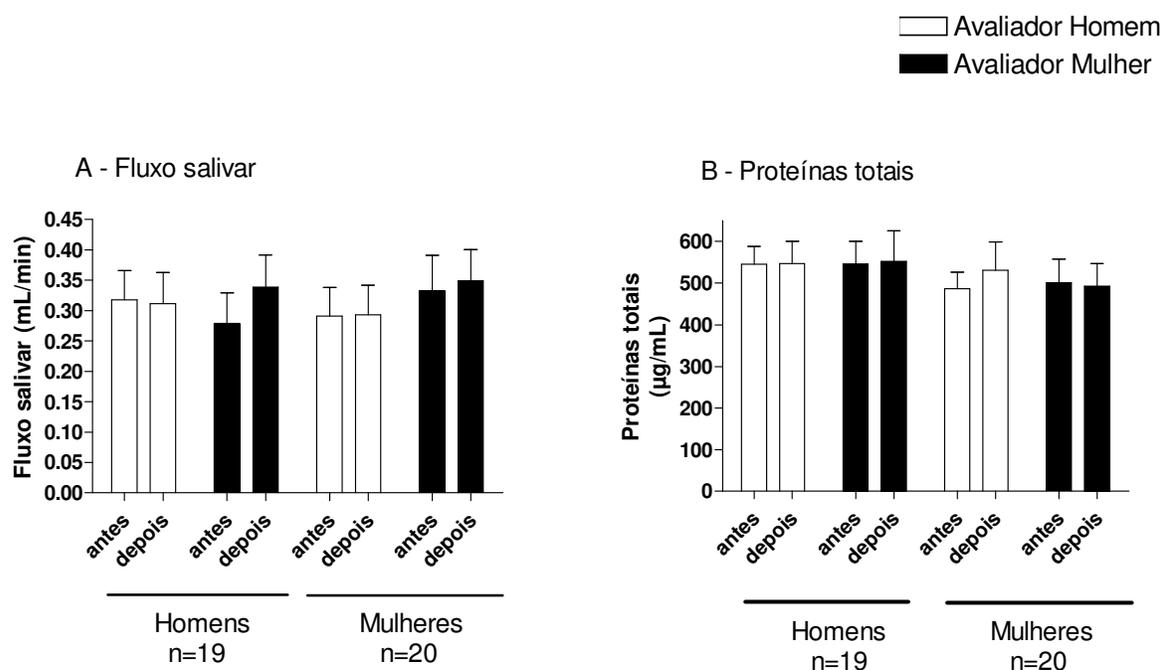


Figura 4. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (A), sulfeto de hidrogênio (B), metilmercaptana (C) e dimetilsulfeto (D) de homens e mulheres, antes e após a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), avaliados por uma pessoa do gênero masculino (barras brancas) e do gênero feminino (barras pretas). N= 19 homens e 20 mulheres. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. *Diferença estatística em relação aos valores apresentados antes da aplicação do VRSCWT. # Diferença estatística entre voluntário homem e mulher, nas medidas equivalentes. †Diferença estatística em relação à medida realizada por avaliador de gênero oposto ao do voluntário.

No que concerne ao fluxo salivar e também às proteínas totais, não houve diferença significativa entre homens e mulheres, em situação basal, ou após a aplicação do teste de ansiedade (Figura 5).



Figuras 5. Fluxo salivar (A) e concentração salivar de proteínas totais (B) de homens e mulheres, antes e após a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), quando avaliados por uma pessoa do gênero masculino (barras brancas) e do gênero feminino (barras pretas). N= 19 homens e 20 mulheres. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão.

Após a aplicação do VRSCWT, voluntários do gênero masculino e feminino apresentaram aumento significativo nos valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média em relação aos respectivos valores basais (Tabela 2). Com relação ao efeito do gênero do avaliador, voluntários homens e mulheres apresentaram maior aumento da pressão sistólica quando o teste de ansiedade foi aplicado por avaliador do gênero oposto

($p < 0,05$; Tabela 2), sem influência do gênero do avaliador nos valores de pressão arterial média e diastólica. Homens apresentaram valores maiores de pressão arterial sistólica, diastólica e média em comparação com as mulheres, tanto em situação basal, quanto após a aplicação do teste de ansiedade ($p < 0,05$; Tabela 2). A frequência cardíaca não foi alterada pelo teste de ansiedade e não sofreu influência do gênero do voluntário ou do avaliador ($p > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2. Pressão arterial sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca de homens e mulheres, antes e após a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), avaliados por uma pessoa do gênero masculino e do gênero feminino.

Parâmetros Cardiovasculares		Avaliador Homem		Avaliador Mulher	
		Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	Antes	116 ± 2	112 ± 3#	118 ± 2	109 ± 2#
	Depois	121 ± 2*	118 ± 2* #	129 ± 3*†	111 ± 3*#†
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	Antes	75 ± 1	71 ± 2#	76 ± 2	71 ± 2#
	Depois	80 ± 2*	77 ± 2*#	83 ± 3*	76 ± 1*#
Pressão Arterial Média (mmHg)	Antes	88 ± 1	84 ± 2#	90 ± 1	84 ± 2#
	Depois	94 ± 1*	90 ± 2*#	98 ± 3*	88 ± 2*#
Frequência cardíaca (bpm)	Antes	75 ± 2	79 ± 3	74 ± 2	79 ± 2
	Depois	75 ± 2	78 ± 3	73 ± 2	79 ± 2

N= 19 homens e 20 mulheres. *Diferença estatística em relação aos valores basais, apresentados antes da aplicação do VRSCWT. Os resultados estão apresentados em média ± erro padrão # Diferença estatística entre voluntário homem e mulher, nas medidas equivalentes. †Diferença estatística em relação à medida realizada por avaliador de gênero oposto ao do voluntário.

O VRSCWT promoveu aumento no cortisol salivar de mulheres avaliadas por homem ($p < 0,05$, Figura 6A), sem alteração quando as voluntárias foram avaliadas por uma mulher. O VRSCWT não alterou a concentração de cortisol em voluntários do gênero masculino ($p > 0,05$, Figura 6A). Mulheres na fase menstrual apresentaram valores significativamente maiores em comparação aos valores apresentados pelos homens, tanto em situação basal, quanto após o teste ansiogênico ($p < 0,05$, Figura 6A).

A alfa-amilase seguiu o mesmo padrão apresentado pelo cortisol, em que apenas voluntárias do gênero feminino apresentaram elevação desta variável quando avaliadas por uma pessoa do gênero oposto, sem alteração quando avaliadas por uma pessoa do mesmo gênero ($p < 0,05$, Figura 6B). Não houve diferença significativa entre homens e mulheres nas concentrações basais de alfa-amilase ($p > 0,05$, Figura 6B).

A concentração salivar de IgAs não sofreu influência do gênero do voluntário ou do teste de ansiedade ($p > 0,05$, Figura 3C).

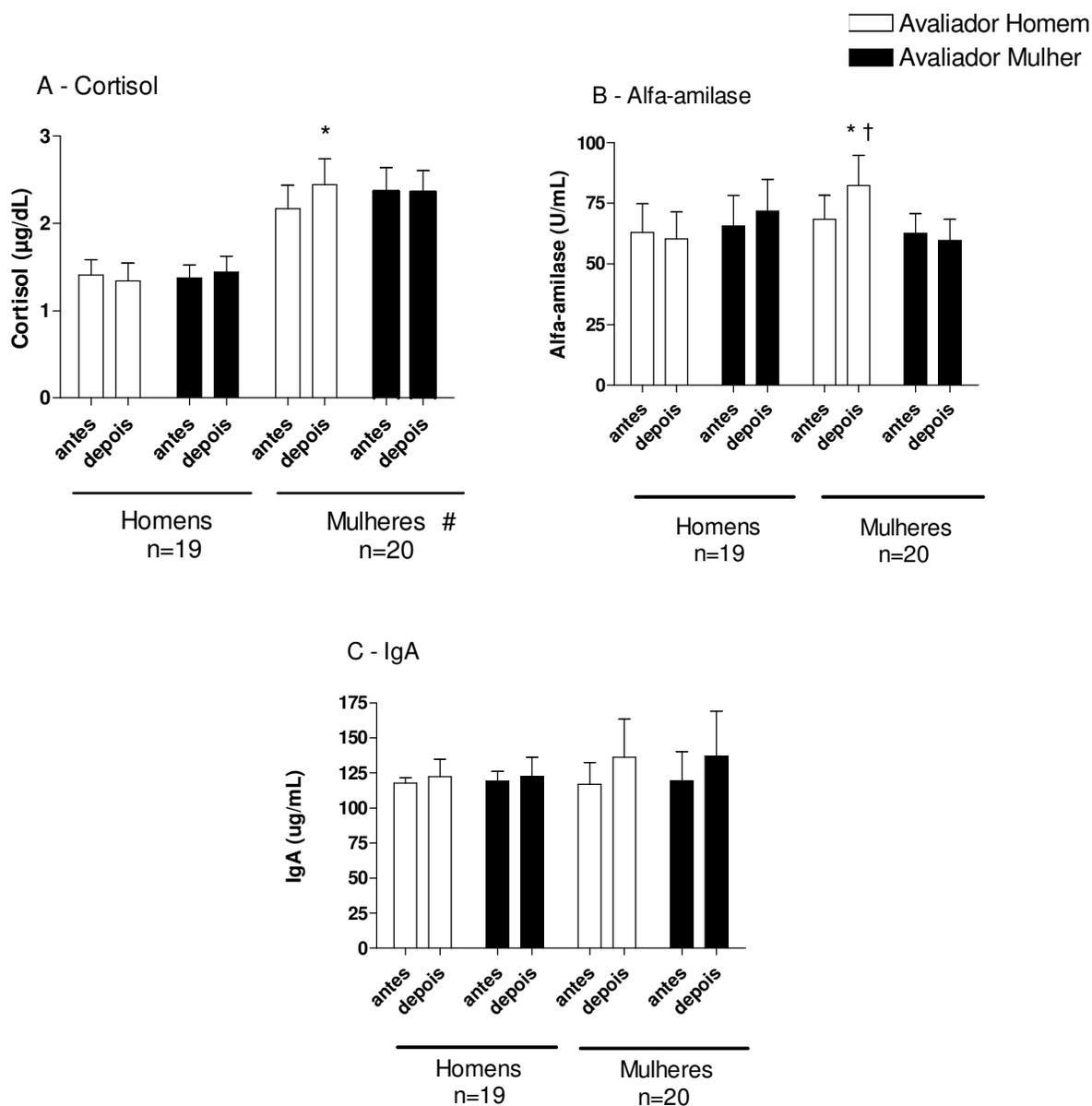


Figura 6. Concentração salivar de cortisol (A), alfa-amilase (B) e IgA secretória (C) de homens e mulheres, antes e após a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), quando avaliados por uma pessoa do gênero masculino (barras brancas) e do gênero feminino (barras pretas). N= 19 homens e 20 mulheres. Os resultados estão apresentados em média ± erro padrão *Diferença estatística em relação aos valores apresentados antes da aplicação do VRSCWT. # Diferença estatística entre voluntário homem e mulher, nas medidas equivalentes. †Diferença estatística em relação à medida realizada por avaliador de gênero oposto ao do voluntário

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que o gênero do voluntário e do avaliador podem influenciar os valores de pressão arterial sistólica, a produção bucal de CSV bem como a secreção de cortisol e alfa amilase salivares, em resposta à ansiedade experimental induzida pelo VRSCWT.

É conhecido que a produção de CSV ocorre a partir da metabolização bacteriana de aminoácidos sulfurados (células descamadas e restos alimentares) (Tonzetich, 1977), sendo que algumas etiologias têm sido propostas para explicar a halitose. As alterações emocionais, como o estresse e a ansiedade têm sido estudadas, tanto em animais quanto em humanos, como fatores etiológicos do mau hálito. Kurihara & Marcondes (2002) observaram aumento nas concentrações de CSV em ratos de laboratório submetidos a estresse por imobilização ou natação. Já um estudo envolvendo humanos avaliou a produção de CSV no dia de um exame acadêmico em comparação a uma semana antes e uma semana após o exame, observando um aumento na concentração desses compostos no dia da situação estressante (Queiroz *et al.*, 2002). No presente estudo, o aumento da produção de CSV em homens e mulheres saudáveis, quando submetidos ao VRSCWT reforça as evidências sobre a influência de fatores emocionais na produção destes compostos.

Nossos dados também confirmam resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa (Calil, 2006; Calil *et al.*, 2006) em que observamos aumento dos CSV em homens submetidos ao VRSCWT. Além disso, estes dados também permitem esclarecer o fato de que não havia sido observada alteração dos CSV nem dos parâmetros cardiovasculares em mulheres submetidas a este teste indutor de ansiedade (Calil, 2006). No estudo anterior, todas as análises, inclusive a coleta das amostras das voluntárias e voluntários, foram realizadas por uma pesquisadora. Esta teve frequente contato com as voluntárias a fim de agendar as coletas de amostras em três fases do ciclo menstrual (folicular, pré-menstrual e menstrual). Assim, a pesquisadora acompanhava constantemente o ciclo menstrual das voluntárias, perguntando-lhes sobre as fases do ciclo em que se encontravam, entrando em contato com elas a fim de obter conhecimento se a temperatura corporal havia aumentando ou se o fluxo menstrual tinha se iniciado, adquirindo, então,

certa intimidade com as mesmas. Ao contrário, no presente estudo, os voluntários não tiveram nenhum contato prévio com o avaliador que aplicou o teste indutor de ansiedade, pois a pesquisadora responsável por esta dissertação foi quem entrou em contato com as voluntárias para obter conhecimento a respeito do ciclo menstrual das mesmas e realizar os agendamentos das coletas de dados. Todas as coletas de amostra e a aplicação do VRSCWT foram feitas por pesquisadores desconhecidos pelos voluntários (o examinador do gênero masculino, bem como o examinador do gênero feminino), o que pode ter auxiliado a exacerbar o efeito causado pelo estímulo ansiogênico. Portanto, com base nos resultados agora obtidos, sugerimos que a ausência do efeito ansiogênico do VRSCWT no estudo anterior esteja relacionado à habituação das voluntárias à pesquisadora, e ao fato da avaliadora ser do mesmo gênero. Assim, em conjunto, o estudo prévio e os resultados obtidos no presente estudo mostram a necessidade de se considerarem os gêneros do voluntário e do avaliador no planejamento experimental.

Durante a situação basal, observamos que mulheres na fase menstrual apresentaram maiores concentrações de CSV (halímetro e sulfeto de hidrogênio) em comparação com os homens. Estes resultados estão de acordo com o de Queiroz (2002) e o de Calil *et al.* (2008), os quais, assim como o presente estudo, observaram um aumento das concentrações de CSV no período menstrual.

Alguns estudos têm avaliado essa relação entre CSV e ciclo menstrual, auxiliando na compreensão das variações nas concentrações desses compostos durante as fases do ciclo. Um estudo conduzido por Prout & Houps (1970), demonstrou que ocorre um aumento no número de bactérias na cavidade oral durante a menstruação. Este aumento pode ocasionar mudanças gengivais durante o ciclo menstrual, o que pode conduzir a uma periodontite ou gengivite, aumentando, desta forma, os CSV e, conseqüentemente, o mau hálito oral. Da mesma forma, Tonzetich (1978) também verificou que a concentração de CSV variava no hálito de acordo com o ciclo menstrual, sendo que esta foi mais elevada em torno da fase menstrual, o que poderia ser explicado pelo aumento da descamação epitelial da mucosa oral que ocorre neste período do ciclo reprodutivo.

Foi demonstrado que os tecidos gengivais e periodontais possuem receptores para andrógenos, estrógeno e progesterona e que mudanças nas concentrações destes

hormônios podem modificar os tecidos gengivais, levando a uma maior permeabilidade vascular e a uma diminuição na queratinização do epitélio gengival (Mariotti, 1994). Outros estudos têm demonstrado que níveis elevados de progesterona e estrógeno causam um impacto na quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, sendo associados à gengivite (Löe *et al.*, 1967; Koreeda *et al.*, 2005).

Entretanto, em nosso estudo, assim como nos de Queiroz *et al* (2002) e Calil *et al.* (2008), as voluntárias apresentavam boa saúde bucal, sem doença periodontal, gengivite, pontos de sangramento ou saburra lingual, conforme avaliado durante exame clínico. Assim, embora as oscilações hormonais de estrógeno e progesterona, que atingem seus picos poucos dias antes da menstruação, características do ciclo menstrual possam ter influenciado a homeostasia bucal e a permeabilidade vascular das voluntárias, outros fatores poderiam estar relacionados à alteração da produção de CSV durante o ciclo menstrual em condições orais saudáveis, como, por exemplo, o aumento do número de células descamadas na cavidade bucal durante essa fase do ciclo, as quais, como citado anteriormente, servem de substrato ao metabolismo bacteriano, conduzindo à produção de CSV.

Assim, considerando-se que no presente estudo, apesar de os voluntários serem saudáveis, e não apresentarem quaisquer alterações bucais, a ansiedade experimental e o ciclo menstrual induziram aumento na produção de CSV, nossos resultados sugerem que tais efeitos poderiam ser exacerbados em pacientes com alterações bucais evidentes, e reforçam a necessidade de boa higienização durante a fase menstrual do ciclo e em situações de estresse por exemplo.

Tonzetich (1977) propôs que entre os gases que contêm enxofre, o sulfeto de hidrogênio (H_2S), gás associado à halitose fisiológica, e a metilmercaptana (CH_3SH) seriam os principais associados à halitose, sendo que este último parece ser o principal gás relacionado à halitose causada por doença periodontal (Yaegaki & Sanada, 1992). O dimetilsulfeto ($(CH_3)_2S$) geralmente está aumentado em condições de desordens hepáticas, entretanto este gás é um componente menor dentre os CSV (Yaegaki *et al.*, 2000), sendo que há poucos relatos desse gás na literatura, e mais estudos ainda são necessários para elucidar seu papel e sua produção dentre os CSV.

Em nossos estudos observamos que o composto mensurado pelo Oral Chroma[®] que mais se aproximou do padrão dos CSV mensurados pelo Halímetro[®], apresentando correlação positiva, foi o H₂S, assim como observado por Sopapornamorn *et al.* (2006). Além disso, Yaegaki & Coil (2000) observaram que o Halímetro[®] tem baixa sensibilidade para CH₃SH. Neste contexto, o estudo de Takai *et al.* (2007) observou correlações significativas na mensuração dos compostos sulfurados voláteis realizada pelo Oral Chroma[®] e por medida organoléptica, em pacientes com doença periodontal. Porém, o Oral Chroma[®] é um cromatógrafo recentemente desenvolvido e ainda não está claro se sua sensibilidade e especificidade são semelhantes à dos cromatógrafos gasosos tradicionais.

Nossos resultados demonstraram que o VRSCWT induziu aumento na concentração de CH₃SH apenas em homens quando avaliados por pesquisador do mesmo gênero, enquanto que o (CH₃)₂S apresentou maior produção quando a avaliação no teste ansiogênico foi feita por uma mulher, independentemente do gênero do voluntário. Estes resultados são intrigantes, e não encontramos explicação possível na literatura. Uma possível explicação para este resultado intrigante é que a grande variação nas medidas nestes compostos poderiam sugerir pouca sensibilidade do aparelho na faixa de concentração detectada, considerando-se que nossos voluntários são todos saudáveis oralmente e que o (CH₃)₂S é um composto com menor destaque dentre os CSV.

Desta forma, como nossos voluntários são saudáveis, sem doenças bucais, o H₂S parece ser o principal gás produzido por esses voluntários, sendo provavelmente ele o principal responsável pelo aumento na concentração de CSV em pessoas ansiosas ou estressadas. Assim, estas hipóteses requerem outros estudos, como, por exemplo, a influência do estresse crônico sobre a produção desses compostos. Se a influência for comprovada, abre-se a possibilidade de serem estudadas diferentes terapias e medidas profiláticas, de acordo com o fator causador do aumento de CSV.

Com relação ao fluxo salivar, em nosso estudo, não foram observadas alterações promovidas pelo VRSCWT nesse parâmetro, ao contrário do que foi observado por Queiroz *et al.* (2002), o qual relatou que mulheres com síndrome pré-menstrual apresentaram uma redução do fluxo salivar, fator que pode ter contribuído para o aumento de CSV durante esta fase do ciclo por favorecer a retenção de células epiteliais, restos

alimentares e acúmulo de microrganismos. Entretanto, o estudo de Calil (2006), assim como nós, não observou redução do fluxo salivar em nenhuma fase do ciclo menstrual.

Embora sejam relatados efeitos inibitórios da ansiedade sobre a salivação, esse assunto ainda é contraditório. De acordo com Bosch *et al.* (2003), a ansiedade pode tanto diminuir como aumentar o fluxo salivar, dependendo do tipo de estímulo. Assim, alguns autores encontraram uma redução do fluxo salivar frente a tratamento odontológico (Morse *et al.* 1983) e a exames acadêmicos (Queiroz *et al.*, 2002), enquanto que Bosch *et al.*(2003) observaram um aumento do fluxo salivar em resposta a um vídeo exibindo procedimentos cirúrgicos. Shinjiro *et al* (2003) descrevem que o fluxo salivar pode não influenciar significativamente a intensidade do mau odor se sua taxa estiver dentro dos padrões de normalidade (fluxo salivar maior que 0,1 ml/min). Desta forma, nossos resultados mostram que a ansiedade induzida pelo VRSCWT não alterou o fluxo salivar, e, portanto, o aumento na produção de CSV não poderia ser explicado por redução na salivação.

Uma possível explicação para o aumento dos CSV após a situação ansiogênica poderia ser a alteração na concentração das proteínas salivares, as quais podem facilitar a agregação ou a aderência de microrganismos na cavidade oral, favorecendo o acúmulo de substrato nutritivo para bactérias (Rudney, 1995). Assim, o aumento de CSV poderia estar relacionado a um aumento de substrato protéico. Apesar de, no presente estudo, não ter sido observada alteração nas concentrações de proteínas totais após a aplicação do VRSCWT, esta hipótese não pode ser descartada porque a ansiedade pode ter alterado a concentração de proteínas salivares de forma diferencial, ocasionando aumento de algumas e redução de outras. Considerando-se que apenas a IgAs foi dosada e que nenhuma alteração foi observada em suas concentrações após o VRSCWT, outras proteínas, não avaliadas neste estudo, poderiam justificar o aumento nas concentrações de CSV.

A resposta ao estresse agudo envolve a ativação de dois sistemas: o sistema nervoso simpático (SNS) e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). A frequência cardíaca e a pressão arterial foram determinadas neste estudo como índices indiretos da ativação simpática (Natelson *et al.*, 1988; Koob, 1999). Já o cortisol foi determinado como reflexo da atividade do eixo HPA e a alfa-amilase e a IgAs foram dosadas porque têm sido propostas na literatura como possíveis marcadores do estresse.

Observamos neste estudo uma elevação nos valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média tanto em homens quanto em mulheres após a aplicação do VRSCWT, refletindo os sinais de excitação simpática, da mesma forma como foi observado por Leite *et al.* (1999). O voluntário foi informado, antes do início do experimento, de que seria avaliado, sendo importante destacar que essa característica torna o VSRCWT um teste eficiente em induzir ansiedade, promovendo assim excitação simpática. Evidências na literatura sugerem que o sistema noradrenérgico cerebral apresenta um papel importante em mediar as respostas a situações de ansiedade e estresse em humanos saudáveis. Embora não tenham sido dosadas em nosso estudo, é conhecido o papel das catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) na resposta a situações estressantes. A administração de norepinefrina e epinefrina, em voluntários saudáveis, resultam em aumento dos parâmetros cardiovasculares, da frequência respiratória e promoveram sensações subjetivas de ansiedade (Bremner *et al.*, 1996). Além disso, tem-se observado que aumentos na frequência cardíaca e pressão arterial durante situações de ansiedade são consistentes com aumentos nas concentrações de catecolaminas periféricas (LeBlanc & Ducharme, 2007).

Embora não tenham sido mensuradas, imediatamente após a aplicação do VRSCWT, os voluntários relataram sensações desagradáveis, apresentando comportamento de inquietação e sudorese aumentada, também decorrentes da ativação do SNS. Além disso, foi observada uma maior ativação desse sistema frente ao teste de ansiedade quando uma pessoa do gênero oposto estava observando o que pode ser confirmado pelo maior aumento da pressão sistólica quando o examinador era do gênero oposto ao do voluntário. Assim, esses resultados confirmam o efeito ansiogênico do teste utilizado e a influência do gênero do avaliador sobre sua resposta.

A ativação do sistema nervoso simpático resultou em aumento da pressão arterial e este efeito foi mediado pela ação estimulatória da norepinefrina e epinefrina sobre o cronotropismo (frequência cardíaca) ou inotropismo (força de contração) cardíaco, via receptores beta adrenérgicos, bem como do aumento da resistência periférica devido a seus efeitos vasoconstritores mediados pelos receptores alfa adrenérgicos (Silverthorn, 2003). Como em nosso estudo não observamos aumento na frequência cardíaca dos voluntários após a aplicação do teste de ansiedade, o aumento das pressões arteriais

sistólica e diastólica pode ser explicado pelo efeito inotrópico positivo e pela vasoconstrição induzida pelas catecolaminas. O maior aumento da pressão sistólica, mas não da diastólica, quando os voluntários foram avaliados pelo gênero oposto evidencia a influência do gênero do avaliador sobre a ativação do SNS.

Durante a situação basal, nossos resultados mostraram que voluntários do gênero masculino apresentaram maiores valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média quando comparados ao gênero feminino. Estes resultados provavelmente estão relacionados ao maior peso corporal e volemia (Azhim *et al.*, 2007) em homens do que em mulheres na mesma faixa etária. Além disso, como o ventrículo esquerdo dos homens é maior em relação ao das mulheres (Salton *et al.*, 2002), a força de contração cardíaca, bem como o débito cardíaco, são maiores no gênero masculino em relação ao feminino. Estes resultados também estão de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo anterior (Calil, 2006), em que observamos que homens apresentam valores mais altos de pressão arterial sistólica e diastólica quando comparados às mulheres nas fases folicular, pré-menstrual e menstrual do ciclo menstrual e com os resultados obtidos por Driziene *et al.*, (2008), os quais observaram maiores valores de pressão arterial sistólica (PAS) em homens quando comparados às mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual (folicular, ovulatória e lútea).

Em relação à frequência cardíaca basal dos voluntários, não foram encontradas diferenças significativas entre os gêneros e estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Kudielka *et al.* (2004), que avaliaram a frequência cardíaca de homens e mulheres de acordo com a idade, crianças, adultos jovens e adultos, e não encontraram diferenças basais relacionadas ao gênero em nenhuma faixa etária.

As diferenças sexuais sobre os parâmetros cardiovasculares são conhecidas por estarem relacionadas a fatores genéticos incluindo cromossomos sexuais X e Y e genes que controlam a produção e resposta dos hormônios sexuais (Ellis *et al.*, 2001). Algumas pesquisas têm indicado que hormônios sexuais femininos e seus efeitos na função vascular diferem durante o ciclo menstrual (Rosano & Panina, 1999; Williams *et al.*, 2001).

Tem sido também sugerido que essas diferenças entre os gêneros na reatividade cardiovascular podem ocorrer devido à maior atividade parassimpática basal em mulheres e

uma predominância na regulação vascular simpática em homens (Evans *et al.*, 2001). Além disso, estes autores observaram que homens apresentam maiores níveis de norepinefrina e epinefrina quando comparados às mulheres. Assim, estes efeitos poderiam justificar a maior pressão arterial encontrada em homens em nosso estudo.

Com relação ao estresse, o sistema límbico, ao ser estimulado, além de estimular o Sistema Nervoso Simpático, ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O núcleo paraventricular do hipotálamo, por meio da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) estimula a glândula adenohipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que entra na circulação geral e estimula o córtex da adrenal a secretar glicocorticóides (Guyton & Hall, 1997). Neste trabalho encontramos que a resposta do eixo HPA ao VRSCWT promoveu um aumento na concentração de cortisol apenas em mulheres, quando avaliadas por alguém do gênero oposto. Homens não apresentaram aumento nas concentrações deste glicocorticóide, sendo este resultado independente do gênero do avaliador.

É importante ressaltar que a exposição a diferentes tipos de estressores pode resultar em diferentes respostas fisiológicas, sendo que algumas são caracterizadas por intensa estimulação do eixo HPA, enquanto outras podem ativar preferencialmente o sistema nervoso simpático (Kudielka & Kirschbaum, 2005). O *Trier Social Stress Test* (TSST), um teste ansiogênico que associa uma simulação de entrevista a um emprego e um teste aritmético, mostrou-se superior em provocar ativação do eixo HPA, além de estimular o SNS. Já o *Stroop Test* tem sido caracterizado por produzir preferencialmente ativação do SNS, embora a resposta do eixo HPA a este teste tenha sido pouco estudada. Tem se observado ainda que testes aritméticos, associados a barulhos repetitivos, ativam o eixo HPA (Kajantie & Phillips, 2006). Assim, o modelo utilizado por nós, o VRSCWT, por estar associado à sinalização de erro pelo toque estridente de uma campainha, pode provocar também ativação do eixo HPA, como observado por nós pelo aumento das concentrações de cortisol em mulheres.

Alguns estudos na literatura têm atentado para a presença de dimorfismo sexual na atividade do eixo HPA (Stoney *et al.*, 1990; Kirschbaum *et al.*, 1999) e alguns autores sugerem que essas diferenças ocorrem na função e estrutura cerebrais (Patchev *et al.*,

1995). Além disso, esse dimorfismo também tem sido observado em relação à resposta ao estresse, promovendo variações individuais e diferentes entre homens e mulheres (Pachev & Almeida, 1998; Young, 1998). Essas diferenças sexuais na atividade do eixo ocorrem devido às ações organizacionais (período de desenvolvimento do SNC) e ativacionais (após a puberdade) dos hormônios sexuais, bem como a fatores culturais e aprendizado (Kelly *et al.* 1999; Clow *et al.* 2004). Diferenças na secreção de vasopressina, um peptídeo produzido pelos neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo, também podem explicar diferenças sexuais na função do eixo HPA, considerando-se que a vasopressina age estimulando diretamente a secreção de cortisol no córtex da adrenal (Perraudin *et al.* 1993). Born *et al.* (1995), relataram que a secreção de vasopressina também é dependente do gênero, ao observarem que a estimulação do CRH associada a injeção de vasopressina promoveu maiores aumentos de ACTH e cortisol plasmáticos em mulheres, quando comparado ao aumento observado em homens.

Em relação aos hormônios sexuais, tem sido sugerido que estes agem, particularmente, na sensibilidade do mecanismo de feedback negativo dos glicocorticóides, sendo que este efeito pode ser nos receptores de glicocorticóides, no sistema de CRH no cérebro ou na resposta ao CRH (Young *et al.*, 1993). Kirschbaum *et al.* (1999), observaram essas diferenças sexuais em resposta ao TSST, e que essas respostas são dependentes da fase do ciclo menstrual feminino, sendo que estes autores observaram que mulheres na fase folicular do ciclo apresentaram uma menor resposta ao estressor. Durante a fase lútea, a produção de cortisol em resposta ao TSST foi a mesma que a dos homens. Já o uso de contraceptivos orais reduziu a resposta ao estressor, evidenciando a influência das oscilações hormonais do ciclo menstrual sobre o cortisol salivar em resposta a um evento estressante.

A fase lútea do ciclo menstrual é caracterizada pelas altas concentrações de progesterona (Laufer *et al.*, 1982). Embora durante a fase menstrual do ciclo feminino os níveis de progesterona diminuam consideravelmente, as alterações causadas por este esteróide podem se perpetuar por alguns dias no organismo, já que o principal mecanismo de ação deste hormônio envolve a modulação da síntese protéica e requer horas ou dias para ser evidenciado (Calil, 2006).

Altemus *et al.* (1997) observaram que durante a fase lútea do ciclo menstrual há uma redução do número de receptores de glicocorticóides, sendo que os achados na literatura têm sugerido que a resposta ao estresse aumentada durante esta fase pode ser uma função da sensibilidade diminuída do mecanismo de feedback negativo dos glicocorticóides. Desta forma, podemos sugerir que a progesterona age como um antagonista dos glicocorticóides, podendo impedir o mecanismo de feedback negativo e aumentar a resposta ao estresse, explicando assim a maior resposta ao VRSCWT em mulheres na fase menstrual do ciclo em comparação aos homens observada em nossos resultados.

Ainda em relação ao cortisol, durante a situação basal, observamos que mulheres na fase menstrual apresentaram maiores concentrações de cortisol quando comparadas aos homens. Porém, resultados na literatura envolvendo a produção deste hormônio e sua relação com o ciclo menstrual ainda são conflitantes. Alguns estudos não observaram diferenças significativas nas concentrações de cortisol entre homens e mulheres, nas fases lútea e folicular do ciclo (Kudielka & Kirschbaum, 2003; Bouma *et al.*, 2009). Já Calil *et al.* (2008) observaram uma maior concentração de cortisol na fase menstrual do ciclo, assim como no presente estudo. Estes resultados podem ser explicados com base no fato desta fase ser uma situação desconfortante para a maioria das mulheres, podendo resultar em maior secreção de ACTH e cortisol neste período.

É conhecido que os hormônios sexuais e os glicocorticóides, bem como o ciclo menstrual (Barbany & Persson, 1992), estão envolvidos na regulação do fator neurotrófico derivado do cérebro (Begliomini *et al.*, 2007), fator também presente no plasma sanguíneo, envolvido na neurogênese e na plasticidade neuronal. Um estudo recente, conduzido por Pluchino *et al.* (2009) avaliou a relação entre este fator e as concentrações de cortisol em mulheres nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual ao longo do dia, tendo observado que, durante a fase lútea, mas não a folicular, o fator neurotrófico seguiu o mesmo padrão circadiano do cortisol. Eles também observaram que a fase lútea apresentou maiores valores deste fator em comparação com a fase folicular. Embora estas variáveis não tenham sido avaliadas durante a fase menstrual do ciclo, estes resultados demonstram que existe uma relação entre o fator neurotrófico derivado do cérebro e o eixo HPA,

evidenciando que as maiores concentrações de cortisol durante a fase menstrual do ciclo podem estar associadas à produção deste fator cerebral.

Diante disso, os maiores níveis basais de cortisol salivar em mulheres, a ausência de alteração do cortisol nos voluntários homens e o seu aumento nas mulheres, somente quando avaliadas pelo gênero oposto, observados no presente estudo, confirmam a influência do gênero e do ciclo menstrual na secreção basal de cortisol e mostram que, em resposta ao teste ansiogênico utilizado, mulheres na fase menstrual apresentaram maior sensibilidade do eixo HPA e que esta resposta foi dependente do gênero do avaliador.

Em relação à alfa-amilase, observamos que o efeito do teste de ansiedade sobre a sua produção foi semelhante ao observado para o cortisol. Este resultado mostra que a alfa-amilase parece refletir a ativação simpática, já que em mulheres seu padrão de variação foi semelhante ao da pressão arterial sistólica, inclusive no que concerne ao efeito do gênero do avaliador. E os dados aqui obtidos também suportam a hipótese de que a enzima salivar alfa-amilase possa ser utilizada como um marcador da atividade simpática induzida pelo estresse (Rohleder *et al.*, 2006; Soo-Quee & Choon-Huat Koh 2007). Já foram relatados aumentos significativos na concentração salivar de alfa-amilase em resposta a outras situações ansiogênicas, tais como exame acadêmico (Bosch *et al.*, 1996), apresentação de vídeos com cenas desagradáveis (Bosch *et al.*, 2003), e estressores laboratoriais (Granger *et al.*, 2006). Porém, Wolf *et al.*(2007) observaram que o estresse crônico por asma, em crianças, diminuiu as concentrações de alfa-amilase e Bosh *et al.* (2003), não encontraram alterações nas concentrações de alfa-amilase salivar após um teste de memória. Assim, as diferenças de respostas podem estar relacionadas às características do estímulo estressor e do sujeito.

Tem sido sugerido que estressores psicológicos podem resultar em uma maior ativação β -adrenérgica, que pode envolver os receptores da glândula parótida e estimular a liberação de alfa-amilase (Willemsen *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2009), refletindo, portanto, uma excitação simpática. Este mecanismo difere do cortisol, que reflete uma reação do eixo HPA. Entretanto, está claro que o eixo HPA e o sistema nervoso simpático trabalham conjuntamente para gerar mudanças fisiológicas associadas a respostas estressantes (Ziegler *et al.*, 1999) e, portanto, o tipo de estresse utilizado parece ter

promovido ativação dos dois sistemas simultaneamente nas mulheres, e este efeito foi dependente do gênero do avaliador. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Takai *et al.* (2004, 2007), os quais utilizaram a aplicação de um vídeo para promover indução de estresse e observaram aumento tanto nos valores de cortisol quanto de alfa-amilase, corroborando com nossos achados de que ambos podem apresentar um padrão de resposta semelhante frente a uma situação ansiogênica.

Pelos resultados de nossos estudos, observamos que os dois sistemas foram ativados, o que pode ser observado pelo aumento nos valores de pressão arterial e alfa-amilase (refletindo uma ativação do SNS) e também pelo aumento da concentração de cortisol (ativação do eixo HPA), evidenciando a eficácia do teste ansiogênico utilizado. Henry e colaboradores (1992) sugeriram que a atividade do sistema nervoso simpático aumenta frente a estressores percebidos como controláveis; entretanto, os mecanismos que levam ao aumento da alfa-amilase em resposta a uma situação estressante ainda não estão completamente esclarecidos (Nater *et al.*, 2006).

Embora os voluntários do gênero masculino tenham apresentado um aumento nos parâmetros cardiovasculares, evidenciando a ativação do SNS, eles não apresentaram aumento nos valores de alfa-amilase, o qual foi observado apenas em mulheres avaliadas por uma pessoa do gênero oposto. Uma possível explicação para esses resultados seria que mulheres, durante a fase menstrual do ciclo, são mais sensíveis ao VRSCWT em relação aos homens. Alguns estudos têm demonstrado que mulheres apresentam maior aflição subjetiva em resposta a eventos estressantes do cotidiano (Kudielka *et al.*, 2004) e exibem maior reatividade psicológica a estressores laboratoriais (Labouvie-Vief *et al.*, 2003) quando comparadas aos homens. Entretanto, os resultados na literatura em relação às diferenças sexuais e hormonais na produção de alfa-amilase em resposta ao estresse agudo ainda são conflitantes e poucos estudos têm relatado essa associação. Takai *et al.* (2007) não encontraram diferenças sexuais da alfa-amilase em resposta a um vídeo cirúrgico utilizado como agente estressor, enquanto Nierop *et al.* (2006), ao utilizarem o TSST como meio de indução de ansiedade, observaram que mulheres grávidas apresentaram uma menor produção de alfa-amilase quando comparadas à mulheres na fase folicular do ciclo menstrual após a situação ansiogênica. Ainda é relevante considerar que, como citado

anteriormente, as respostas ocorrem diferentemente de acordo com o tipo de estressor utilizado e, portanto, mais estudos nessa área precisam ser realizados a fim de elucidar o papel do gênero e das influências hormonais na resposta a estressores agudos.

Já em situação basal, não observamos diferenças na concentração de alfa amilase entre voluntários de ambos os gêneros. Estes dados estão de acordo com os estudos de Nater *et al.*, (2007), Takai *et al.* (2007) e Filaire *et al.* (2009) que mostraram não haver diferença na secreção basal de alfa-amilase entre homens e mulheres. Embora o número de trabalhos seja pequeno, estudos na literatura não têm encontrado influência do ciclo menstrual sobre a produção basal de alfa-amilase (Tenovuo *et al.*, 1981; Laine *et al.*, 1991).

Além da alfa-amilase, outras proteínas salivares também são importantes para a homeostasia bucal, dentre elas a imunoglobulina A secretória (IgAs), que é responsável pela inibição de enzimas microbianas envolvidas na colonização de microorganismos e de processos patogênicos (Gregory *et al.*, 1990), e promove a agregação de microorganismos, prevenindo o contato de microorganismos patogênicos com a superfície epitelial e assim facilitando sua remoção da cavidade oral. Embora o seu aumento também tenha sido relacionado ao estresse (Yu Shan Fa *et al.*, 2008), isto não foi observado no presente estudo, já que a concentração de IgAs não apresentou diferença em relação ao gênero, ou em resposta ao teste de ansiedade, indicando que a IgAs não seria um marcador sensível do estresse agudo causado pela ansiedade desencadeada pelo VRSCWT.

E de fato, a elevação da IgAs é dependente do estímulo estressor, pois enquanto alguns estudos envolvendo estressores psicofisiológicos agudos, como falar em público (Evans *et al.*, 1994), apresentações orais (Bristow *et al.*, 1997) e testes mentais aritméticos (Willemsen *et al.*, 1998) mostram aumento na produção de IgAs, outros estudos envolvendo estresse agudo por avaliação acadêmica não alteraram a sua secreção (Ng *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2000).

Um estudo conduzido por Hucklebridge *et al.*, 1998, observou que a IgAs salivar apresenta um padrão de produção diurno, com pico 30 minutos após o despertar, estando próximo ao padrão de secreção do cortisol salivar. Porém, ainda não está claro se esta variação diurna na secreção de IgAs salivar está associada à secreção do cortisol ou a outro mecanismo de controle que também tenha maior intensidade diurna. Diante disso,

nosso estudo parece indicar que a produção desta proteína está associada a outro mecanismo de controle que não o mesmo do cortisol, já que o padrão de produção do cortisol e IgAs salivar foram diferentes após a aplicação do VRSCWT, não havendo correlação entre esses biomarcadores.

O VRSCWT eliciu aumento no nível de ansiedade nos voluntários do gênero masculino, o que foi comprovado pelo aumento da atividade simpática representada pela elevação nos valores de pressão arterial, sem alteração das concentrações de cortisol e alfa-amilase. E, embora tenha ocorrido aumento nos valores de pressão arterial (sistólica, diastólica e média) em ambos os gêneros, independentemente do gênero do avaliador, o aumento da pressão sistólica foi mais pronunciado quando o voluntário foi avaliado pelo gênero oposto. O mesmo foi observado por Turner *et al.* (1986), os quais encontraram que diferenças nas respostas à pressão arterial frente a um procedimento de avaliação social ocorrem somente quando há interações entre experimentador e voluntário de gêneros opostos, mas não do mesmo gênero.

Além disso, mulheres apresentaram um aumento nas concentrações de cortisol e alfa-amilase salivar, apenas quando foram avaliadas por uma pessoa do gênero masculino. Estes resultados demonstram que existe influência do gênero do avaliador sobre a indução de ansiedade. Alguns estudos têm comprovado essa hipótese como, por exemplo, o trabalho de Kalai *et al.* (2004), o qual observou que homens e mulheres apresentaram maior tolerância ao estímulo doloroso quando testados por alguém do gênero oposto. Neste contexto, Levine & De Simone (1991) relataram que a cultura da sociedade ocidental é caracterizada por comportamentos característicos em cada gênero, sendo que homens apresentam-se como seres fortes que tentam impressionar as mulheres com sua capacidade de tolerar a dor, enquanto que mulheres exibem uma sensibilidade aumentada a fim de evocar o comportamento protetor do homem.

Em relação a estudos que envolvem indução experimental de estresse e ansiedade, alguns estudos têm observado que o gênero do experimentador e até mesmo de um observador podem influenciar nas respostas cardiovasculares ao estresse (Cacioppo *et al.*, 1990; McCubbin, 1991). Assim, Larkin *et al.* (1998), observaram que homens, com alto nível de medo ou avaliação negativa em resposta a um questionário, apresentam maiores

respostas cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) a um teste mental para indução de estresse apenas na presença de um observador do gênero feminino, sem alterações quando o observador era do gênero masculino. Embora essa relação entre gênero do avaliador e indução de ansiedade ainda não esteja completamente estabelecida, nossos resultados reforçam a sua existência e indicam que estudos futuros devem atentar para a importância do gênero do avaliador em pesquisas que envolvam indução de ansiedade.

7. CONCLUSÕES

- O VRSCWT mostrou-se eficiente em eliciar ansiedade em homens e mulheres.
- Há influência do gênero do avaliador sobre a resposta promovida pelo teste ansiogênico.
- O aumento na produção de CSV não está relacionado ao fluxo salivar e à imunoglobulina A secretória.
- O cortisol e alfa-amilase apresentam um padrão de resposta semelhante frente a ansiedade experimental induzida pelo VRSCWT.
- A IgAs não é um marcador sensível em resposta à ansiedade aguda eliciada pela pelo VRSCWT.
- Mulheres, na fase menstrual do ciclo, são mais sensíveis ao VRSCWT quando comparadas aos homens.

SUGESTÃO

- O gênero do avaliador deve ser o mesmo do voluntário em testes que envolvam indução de ansiedade, como o VRSCWT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Aizawa F, Kishi M, Moriya T, Takahashi M, Inaba D, Yonemitsu M. The analysis of characteristics of elderly people with high VSC levels. *Oral Dis.* 2005; 11: 180-2.
- Almståhl A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 345-52.
- Altemus M, Redwine L, Yung-Mei L, Yoshikawa T, Yehuda R, Detera-Wadleigh S *et al.* Reduced sensitivity to glucocorticoid feedback and reduced glucocorticoid receptor mRNA expression in the luteal phase of the menstrual cycle. *Neurosyparmacology.* 1997; 17(2): 100-9.
- Attia, E.L.; Marshal, K.G. Halitosis. *Can Med Assoc J*, Ottawa. 1992; 126: 128-35.
- Azhim A, Akioka K, Akutagawa M, Hirao Y, Yoshizaki K, Obara S *et al.* Effect of gender on blood flow velocities and blood pressure: role of body weight and height. *Proceeding of the 29th Annual Internacional*, 23-26, 2007.
- Bánky Z, Nagy GM, Halász B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to either, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology.* 1994; 59(1):63-71.
- Barbany G, Persson H. Regulation of neurotrophin mRNA expression in rat brain by glucocorticoid. *Eur J Neurosci.* 1992; 4: 396-403.
- Beck AT & Sterr RA. Beck anxiety inventory, manual. **Psychological corporation** San Antonio,Tx, 1993.
- Begliomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti, M, Freschi LM *et al.* Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod.* 2007; 22: 995-1002.
- Born J, Ditschuneit I, Schreiber M, Dodt C, Fehm HL. Effects of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *Eur J Endocrinol.* 1995; 132: 705-11.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Comittee of Medical Journal Editors - grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bosch J A, Brand H S, Ligtenberg T J, Bermond B, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen A. V. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosom Med.* 1996; 58:374–382.
- Bosh JA; DE Geus EJ, Ligtenberg TJ, Nazmi K, Veerman EC, Hoogstraten J *et al.* Salivary MUC5B – mediated adherence (ex vivo) of *Helicobacter pylori* during acute stress. *Psychomatic Medicine.* 2000; .62(1):40-9.
- Bosch J A, de Geus E J, Veerman E C, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen AV. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychomatic Medicine.* 2003; 65: 245–58.
- Bouma EM, Riese H, Ormel J, Verhulst FC, Oldehinkel AJ. Adolescents' cortisol responses to awakening and social stress; effects of gender, menstrual phase and oral contraceptives. The TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34(6): 884-93.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: Clinical studies. *Synapses.* 1996; 23: 39-51.
- Bristow M, Hucklebridge FH, Clow A, Evans P. Modulations of secretory immunoglobulin A and cardiovascular responses to an acute episode of stress and arousal. *J Psychophysiol.* 1997; 11: 2548-55.
- Cacioppo JT, Rourke PA, Marshall-Goodell BS, Tassinary LG, Baron RS. Rudimentary physiological effects of mere observation. *Psychophysiol.* 1990; 27:177-86.
- Calil CM & Marcondes FK. Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds. *Life Sciences.* 2006; 79 (7): 660-64.
- Calil CM. Influência do Estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis. Piracicaba, SP, 2006, 90p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP, 2006.
- Calil CM, Lima PO, Bernardes CF, Groppo FC, Bado F, Marcondes FK. Influence of gender and menstrual cycle on volatile sulphur compounds production. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(12):1107-12.

- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress systems disorders. *JAMA*. 1992; 267: 1244-52.
- Clow A, Thorn L, Evans P, Hucklebridge F. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress*. 2004; 7: 29-37.
- Cohen S, Tyrrell DA, Smith AP. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *New Engl J Med*. 1991; 325: 606-12.
- Dallman MF, Akana SF, Levin N, Walker CD, Bradbury MJ, Suemaru S *et al*. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Brain Corticosteroid Receptors.*; 1994; 746: 22-32.
- Driziene Z, Jakutiene E, Stakisaitis D, Pundziene P, Sveikata A. Characteristics of gender-related circadian arterial blood pressure in healthy adolescents. *Medicina (Kaunas)*. 2008; 44(10):768-74.
- Egelberg J. Gingival exudate measurements for evaluation of inflammatory changes of the gingivae. ***Odonotologisk Revy***. 1964; 15: 381.
- Eli I, Baht R, Kolowsky A, Rosenberg M. The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. *Psychosom. Med*. 1996; 58(2):.156-9.
- Ellis JA, Wong ZY, Stebbing M, Harrap SB. Sex, genes and blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001; 28:1053-55.
- Evans P, Bristow M, Hucklebridge F, Clow, A. Stress, arousal, cortisol and secretory immunoglobulin A in students undergoing assessment. *Br J Clin Psychol*. 1994; 33: 575-6.
- Fábian TK, Fábian G. Dental stress. *In: FINK, G. (Ed.) Encyclopedia of stress*. San Diego : Academic Press, v.1, p. 657-659, 2000.
- Filaire E, Dreux A, Massart A, Nourrit B, Rama LM, Teixeira A. Salivary alpha-amylase, cortisol and chromogranin A responses to a lecture: impact of sex. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106:71-7.
- Graef FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21(6): 791-9.
- Granger DA, Kivlighan KT, Blair C, El-Sheik M, Mize J, Lisonbee, JA *et al*. Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships. *J Soc Pers Relat*. 2006; 23: 267–90.

- Granger D A, Kivlighan K T, El-Sheik M, Gordis EB, Stroud L R. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 122-44.
- Gray J A. *The psychology of fear and stress.* Cambridge, England: Cambridge University Press, 1987.
- Gregory RL, Kindle JC, Hobbs LCL, Filler SJ, Malmstrom HS. Function of anti- *Streptococcus mutans* antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5: 181-8.
- Güncü GN, Tözüm TF, Caglayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontum – Review of literature. *Austral Dent J.* 2005; 50(3): 138-45.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. O sistema nervosa autonômico; a medulla supra-renal. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan,. In: *Tratado de Fisiologia Médica.* 1997; 9 ed, p. 693-703.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. Os hormônios adrenocorticais. Rio de Janeiro: : Guanabara-Koogan,. In: *Tratado de Fisiologia Médica.* 2002; 10 ed,. p.813-826.
- Henry JP. Biological basis of the stress response. *Integr Physiol Behav Sci.* 1992; 27: 66-83.
- Horan MA, Barton RN, Lithgow G. Biology of aging and stress. *In: FINK, G. (Ed.) Encyclopedia of stress.* San Diego: Academic Press, p.111-7, 2000.
- Hucklebridge F, Clow A, Evans P. The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int J Psychophysiol.* 1998; 31: 69-76.
- Kajantie E, Phillips DIW. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinol.* 2006; 31: 151-78.
- Kállai I, Barke A, Voss U. The effects of experimenter characteristics on pain reports in women and men. *Pain.* 2004; 112: 42-147.
- Kelly SJ, Ostrowski NJ, Wilson MA. Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 64, 655-64.
- Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J, Schommer NC, Hellhammer DH. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med.* 1999; 61(2): 154-62.
- Kleinberg I, Wolff MS, Coldpilly DM. Role of saliva in oral dryness, oral feel and oral

- malodour. *Int Dent J.* 2002; 53(3): 236-40.
- Koob GF. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. *Biol Psychiatry.* 1999; 46: 1167-80.
- Koreeda N, Iwano Y, Kishida M, Otsuka A, Kawamoto A, Sugano N *et al.* Periodic exacerbation of gingival inflammation during the menstrual cycle. *J Oral Sci.* 2005; 47(3): 159-64.
- Kudielka BM, Kirschbaum C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinol.* 2003; 28(1): 35-47.
- Kudielka BM, Buse-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Differential heart rate reactivity and recovery after psychosocial stress (TSST) in healthy children, younger adults, and elderly adults: the impact of age and gender. *Int J Behav Med.* 2004; 11:116-21.
- Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol.* 2005; 69(1), 113-32.
- Kurihara E, Marcondes, F.K. Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress.* 2002; 5(4): 295-8
- Labouvie-Vief G, Lumley MA, Jain E, Heinze H. Age and gender differences in cardiac reactivity and subjective emotion responses to emotional autobiographical memories. *Emotion* 2003; 3: 115-26.
- Laine M, Pienihakkinen K, Ojanotko-Harri A, Tenuovo J. Effects of low-dose oral contraceptives on female whole saliva. *Arch Oral Biol.* 1991; 36: 549-52.
- Larkin KT, Ciano-Federoff, LM, Hammel D. Effects of gender of observer and fear of negative evaluation on cardiovascular reactivity to mental stress in college men. *Int J Psychophysiol.* 1988; 29(3): 311-18.
- Laufer N, Navot D, Schenker JG. The pattern of luteal phase plasma progesterone and estradiol in fertile cycles. *Am J Obstet Gynecol.* 1982; 1; 143(7), 808-13.
- LeBlanc J, Ducharme MB. Plasma dopamine and noradrenaline variations in response to stress. *Physiol Behav.* 2007; 91(2-3): 208-11.
- Leite, J.R.; Seabra, M.L.; Sartory, V.A.; Andreatini, R. The video-recorded Stroop color-word test as a new model of experimentally-induced anxiety. *Progr in Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 1999; 23(5): 809-22.

- Levine FM, De Simone LL. The effects of experimenter gender on pain report in male and female subjects. *Pain*. 1991; 44: 69-72.
- Levine MJ. Salivary macromolecules. A structure/function synopsis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 694: 11-16.
- Lindhe J, Attstrom R, Bjorn AS. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycle. *J Periodontal Res*. 1969; 4: 97.
- Lindhe, J.; Attstrom, R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res*. 1967; 2: 194.
- Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol. Scand*. 1963; 21: 533.
- Löe, H.; Theilade, E.; Jensen, S.B.; Schiott, C.R. Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. **J Periodontal Res.**, 2: 282-289, 1967.
- Lowe G, Urquhart J, Greenman J. Academic stress and secretory immunoglobulin A. *Psychol Rep*. 2000; 87: 721-2.
- Mariotti A. Sex steroids hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5: 27-53.
- McCubbin JA, Wilson JF, Bruehl S, Brady M, Clark K, Kort E. Gender effects on blood pressures obtained during an on-campus screening. *Psychosom*. 1991; 53: 90-100.
- Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta*. 2004; 347 (1-2): 25-39.
- Morita M, Wang HL. Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. *J Clin Periodontol*. 2001; 28: 213.
- Morse DR, Schacterle GR, Esposito JV, Chod SD, Furst ML, DiPonziano J *et al*. Stress, meditation and saliva: a study of separate salivary gland secretions in endodontic patients. *J Oral Med*. 1983; 38(4): 150-60.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav*. 1988; 43: 41-6.
- Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhas W, Koller MM *et al*. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity--associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendoc*. 2006; 31: 49-58.

- Nater M, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. **Psychoneuroendoc.** 2007; 32: 392-401.
- Nierop A, Bratsikas A, Klinkenberg A, Nater UM, Zimmermann R, Ehlert U. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and attenuates salivary α -amylase response to psychosocial stress in human pregnancy. *J Clin Endocrinol.* 2006; 91: 1329-35.
- Ng V, Koh D, Mok BY, Chia SE, Lim LP. Salivary biomarkers associated with academic assessment stress among dental undergraduates. *J Dent Educ.* 2003; 67(1): 091-4.
- O'Donnell K, Kammerer M, O'Reilly R, Taylor A, Glover V. Salivary α -amylase stability, diurnal profile and lack of response to the cold hand test in young women. *Stress.* 2009; 3:1.
- Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications of stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001; 22(4): 502-48.
- Patchev VK, Hayashi, S, Orikasa, C, Almeida OFX, Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences of hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J.* 1995; 9: 419-23.
- Patchev VK, Almeida OF. Gender specificity in the neural regulation of the response to stress: new leads from classical paradigms. *Mol Neurobiol.* 1998; 16: 63-77.
- Perraudin V, Delarue C, Lefebvre, H, Contesse V, Kuhn, JN, Vaudry H. Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V_1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 1522-28.
- Persson, S.; Edlund, M.B.; Claesson, R.; Carlsson, J. The formation of hydrogen sulfide and methanethiol by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5: 195-201.
- Pluchino N, Cubeddu A, Begliuomini S, Merlini S, Giannini A, Bucci F *et al.* Daily variation of brain – derived neurotrophic factor and cortisol in women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause. *Hum Reprod.* 2009; 24(9): 2303-09.
- Prout RE, Hopps RM. A relationship between human oral bacteria and the menstrual cycle. *J Periodontol.* 1970; 41(2):98-101.
- Queiroz CS, Hayacibara MF, Tabchoury, COM, Marcondes FK, Cury JA. Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 337-40.

- Ratcliff, P.A.; Johnson, P.W. The relationship between oral malodor, gingivitis, and periodontitis. A review. *J Periodontol.* 1999; 70(5):485-9. Review.
- Rohleder N, Wolf J, Maldonato EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology.* 2006; 43 (6): 645–52.
- Rosano GM, Panina G. Oestrogens and the heart. *Therapic.* 1999; 54:381-85.
- Rosenberg M. Bad breath: diagnosis and treatment. *Univ Tor Dent J.* 1990; 3(2): 7-11.
- Rosenberg M., Kulkarni, GV, Bosy A, McCulloch CAG. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *J Dent Res.* 1991;70(11) 1436-40.
- Rosenberg M, McCulloch CA. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontal.* 1992; 63(9): 776-82.
- Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral healthy? *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6(4): 343-67.
- Salton BA, Chuang ML, O'Donnell CJ, Kupka MJ, Larson MG, Kissinger KV *et al.* Gender differences and normal left ventricular anatomy in adult population free of hypertension. *Journal of the American College Cardiology.* 2002; 36(4): 1055-60.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 1936; 138(1): 32.
- Shinjiro K, Shuji A, Kenjiro G, Kurihara E, Toshiro A, Tadamishi T. Low salivary flow and volatile sulfur compounds in mouth air. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod,* 2003; 36: 38-41.
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with Psychoneuroendoc. 2001; 26(2):165-73.
- Silva FT, Prado GB, Ribeiro LCG, Leite JR. The anxiogenic vídeo-recorded Stroop color-word test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. *Physiol Behav.;* 2004; 82(2-3): 215-230.
- Silverthorn DU. A pressão arterial é estimada por esfigmomanometria. *In: Fisiologia Humana - uma abordagem integrada.* São Paulo. Editora Manole. 2003; 2ª ed, p. 450.
- Silverthorn DU. Fluxo sanguíneo e Controle da Pressão Arterial. *In: Fisiologia Humana – uam abordagem integrada.* São Paulo. Editora Manole. 2003; 2ªed, p. 443-473.

- Soo-Quee Koh D, Choon-Huat Koh G. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med.* 2007; 64: 200-10.
- Sopapornamorn, P, Ueno M, Shinada K, Vachirarojpisan T, Kawagushi Y. Clinical application of a VSCs monitor for oral malodour assessment. *Oral Health & Prev Dent.* 2006; 4:91-7.
- Springfield J, Suarez FL, Majerus GJ, Lenton PA, Furne JK, Levitt MD. Spontaneous Fluctuations in the Concentrations of Oral Sulfur-containing Gases. *J Dental Res.* 2001; 80(5): 1441-44.
- Stoney CM, Owens JF, Matthews KA, Davis MC, Caggiula A. Influences of the normal menstrual cycle on physiologic functioning during behavioral stress. *Psychophysiol.* 1990; 27(2): 125-35.
- Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eko K, Uchihshi KT. Effect of pshychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol.* 2004;49:963 68.
- Takai N, Yamagushi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. Gender-specific differences in salivary biomarker responses to acute psychological stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 510-15.
- Tárzia, O. Halitose: Um desafio que tem cura. São Paulo: Editora de publicações biomédicas, pp228, 2003.
- Tenovuo J, Laine M, Soderling E, Irjala K. Evaluation of salivary markers during the menstrual cycle: peroxidase, protein and electrolytes. *Biochem Med.* 1981; 25: 337-45.
- Tonzetich J. Oral malodour an indicator of health status and oral cleanliness. *Int Dent J.* 1977; 28:309-19.
- Tonzetich J, Preti G, Huggins GR. Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cicle. *J Int Med Res.* 1978; 6(3):245-54.
- Totman R, Kiff J, Reed SE, Craig JW. Predicting experimental colds in volunteers from different measures of recent life stress. *J Psychosomat Res.* 1980; 24: 155-63.
- Tsai CC, Chou HH, Wu TL, Yang YH, Ho KY, Wu YM, Ho YP. The levels of volatile sulfur compounds in mouth air from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res,* 2008; 43(2): 186-93.
- Turner S.M, Beidel DC, Larkin KT. Situational determinants of social anxiety in clinic and

- nonclinic samples: Physiological and cognitive correlates. *J Consult Clin Psychol.* 1986; 54: 523-7.
- Van den Broek A, Feenstra L, Baat C. A review of the current literature on etiology and measurement methods of halitosis. *J. Dentistry.* 2007; 35: 627–35.
- Van den Velde S, Quiynen M, van Hee P, van Steenberghe D. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Sci.* 2007; 853 (1-2): 54-61.
- Willemsen G, Ring C, Evans P, Clow A, Hucklebridge F, Carroll D. Secretory immunoglobulin A and cardiovascular reactions to mental arithmetic and cold pressor. *Psychophysiol.* 1998; 35: 252-9.
- Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, Paige J, Blombery PA, Sudhir K *et al.* in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2001; 86: 5389-95.
- Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and α -amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol.* 2007; 78: 20-8.
- Yaegaki, K.; Sanada, K. Volatile sulphur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontitis. **J Periodont Res.**, 27: 233-238, 1992.
- Yaegaki K, Miyazaki H, Kawaguchi Y. Clinical guidelines for halitosis. Tokio: Quintessence Publishing, p.13-26, 2000.
- Yaegaki K, Coil JM. Examination classification and treatment of halitosis; clinical perspectives. *J Can Dent Assoc.* 2000; 66: 257-61.
- Young EA, Kotun J, Haskett RF, Grunhaus L, Greden, JF, Watson SJ *et al.* Dissociation between pituitary and adrenal suppression to dexamethasone in depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1993; 50: 395-403.
- Young EA. Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. *J Gend Specific Med.* 1998; 1:21-7.
- Yu SF, Jiang KY, ZhouWH, Wang S. Relationship between occupational stress and salivary sIgA and lysozyme in assembly line workers. **Chin Med J.** 2008; 121(17):1741-3.
- Ziegler DR, Cass WA, Herman JP. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol.* 1999; 11: 361-69.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis", protocolo nº 1087/2007, dos pesquisadores FERNANDA KLEIN MARCONDES, CAROLINE MORINI CALIL, EDUARDO HARUKI OZERA, PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA e PEDRO HENRIQUE MOREIRA PAULO TOLENTINO, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/12/2007.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "A study about the relation between emotional changes and the production of volatile sulfur compounds", register number 1087/2007, of FERNANDA KLEIN MARCONDES, CAROLINE MORINI CALIL, EDUARDO HARUKI OZERA, PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA and PEDRO HENRIQUE MOREIRA PAULO TOLENTINO, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 12/12/2007.</p>		
 Prof. Pedro Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>

ANEXO 2 – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO assinado por todos os voluntários que participaram deste estudo.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações contidas neste documento têm por objetivo convidá-lo e informá-lo(a) sobre a pesquisa intitulada “Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis”, a ser desenvolvida pelas pesquisadoras Patrícia Oliveira de Lima, Caroline Morini Calil, Eduardo Haruki Ozera e Fernanda Klein Marcondes, do Depto de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Após a leitura de todas as informações aqui contidas e esclarecimento das dúvidas que surgirem, você terá total liberdade para decidir se concorda em participar como voluntário(a) deste estudo. Em caso afirmativo, ao final do termo deverá fornecer seus dados pessoais e assinar o consentimento para sua participação.

1. Título da pesquisa: “Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis”.

2. Justificativa: Geralmente o mau hálito, ou halitose, é causado por má higiene oral, doenças periodontais e outras alterações bucais, e em menor frequência, por problemas gastro-intestinais, hepáticos, renais e por diabetes. Entretanto, em alguns pacientes não há nenhum sinal orgânico que justifique o surgimento do mau hálito. Nestes casos, tem sido sugerido que o estresse e a ansiedade estejam relacionados com o surgimento da halitose, embora haja poucos estudos sobre esta relação. A realização deste estudo se justifica porque o tratamento da halitose é um problema importante e atual na área da Odontologia, e o conhecimento dos fatores que determinam o seu aparecimento serão de grande auxílio no estabelecimento de estratégias terapêuticas, principalmente nos casos que parecem estar relacionados ao estresse e ansiedade.

3. Objetivo: Estudar a influência das alterações emocionais sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis. Estes compostos são produzidos pela ação de bactérias bucais sobre restos de alimentos e células da mucosa oral, e são responsáveis pelo mau hálito.

4. Procedimentos: Serão selecionados 20 homens, e pré-selecionadas 40 mulheres, que não

façam uso de anticoncepcional hormonal, entre alunos do 2º e 3º anos do curso de Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP. Participarão do estudo 20 mulheres que apresentarem regularidade no ciclo menstrual, a ser determinada pelo método do calendário. Para as mulheres o período de seleção terá início seis meses antes do experimento para a determinação da duração do ciclo menstrual e de suas fases. Durante este período de seis meses, será solicitado que elas anotem mensalmente o primeiro e último dia de fluxo menstrual no calendário que será fornecido para a pesquisa. Após esses seis meses serão selecionadas aquelas que apresentarem regularidade no ciclo menstrual. Todos os voluntários serão submetidos a uma anamnese, exame clínico intra-oral e avaliação psicológica por profissionais habilitados. Os voluntários selecionados serão aqueles que não apresentarem doenças periodontais, cáries, língua saburrosa, próteses, aftas e/ou ulcerações, alterações sistêmicas e/ou naso-faríngeas e respiração bucal, pois estes fatores poderiam alterar a produção dos CSV.

Todos os voluntários selecionados apresentar-se-ão nos dias determinados às 7:00h, nas seguintes condições: não ter realizado nenhum tipo de higiene bucal, em jejum de 8 horas, não ter ingerido alimentos condimentados (alho, cebola, salame, pickles) no dia anterior ao experimento e não ter utilizado perfumes, colônias, loção após barba e outros compostos com derivados alcoólicos, no dia do experimento, já que todos estes fatores podem favorecer a produção de CSV no hálito. Os voluntários responderão ao *Beck Anxiety Inventory*, um questionário amplamente validado na literatura, para avaliação do nível basal de ansiedade. Posteriormente será feita a aferição da pressão arterial, frequência cardíaca e coleta de saliva, para dosagem de fluxo, cortisol e proteínas salivares, seguida da medida da concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (CSV), utilizando-se um monitor de sulfetos, o halímetro. Primeiramente será solicitado ao sujeito permanecer com a boca fechada por dois minutos. Em seguida, uma cânula de plástico será introduzida na cavidade bucal e assim o voluntário permanecerá com a boca entreaberta aproximadamente 1,5cm, recebendo orientações para não mover a língua e os lábios durante a coleta e assim evitar que os mesmos toquem a cânula e interrompam a sucção do ar bucal pelo aparelho. O ar expirado é levado ao interior do aparelho via cânula por sucção, o ar passa através de um sensor eletroquímico o qual efetua a contagem das moléculas dos CSV presentes na amostra de ar coletado. O valor é expresso em um monitor digital. Em seguida, os voluntários serão submetidos ao teste de indução de ansiedade: *Video Recorded Stroop Color Word Test* (VRSCWT), que consiste em se apresentar ao voluntário uma prancha contendo 100 palavras designativas de cores (azul, amarelo, vermelho, verde e violeta), dispostas em uma matriz 10X10, na qual cada palavra é pintada de uma cor diferente de seu significado e apresentada em ordem aleatória. O sujeito deve mencionar, na seqüência apresentada, a cor visualizada sem se importar com a palavra escrita. A tarefa deve ser realizada em 2 minutos, e cada erro é sinalizado com um toque de uma campainha. Toda situação do teste é monitorada por uma vídeo-câmera e apresentada simultaneamente ao sujeito, em um monitor de TV, enquanto ele realiza a tarefa. Após o teste, nova determinação da pressão arterial, frequência cardíaca, CSV e coleta de saliva serão realizados. Ao final do experimento, será oferecido um café da manhã completo nas dependências do departamento de Ciências Fisiológicas.

5. Grupo controle ou placebo: Não está previsto no estudo grupo controle ou placebo.

6. Descrição apropriada dos métodos alternativos existentes: Há dois modelos experimentais de ansiedade que atendem todas as características e que não violam os princípios éticos de pesquisa com seres humanos. O VRSCWT será usado neste estudo. O método alternativo existente seria a utilização do protocolo de Simulação de Falar em Público (SFP), que consiste de uma gravação em videocassete do discurso de um voluntário sobre um assunto definido poucos minutos antes da tarefa. Apesar de eficaz, esse método envolve também implicações interpessoais, uma vez que a familiaridade ou não com o tema a ser apresentado pode diferir entre os voluntários, constituindo uma variável importante, difícil de ser controlada. Com relação à caracterização das fases do ciclo menstrual, o método alternativo seria a dosagem dos hormônios sexuais. Porém a coleta de sangue, por ser um procedimento invasivo, seria mais um agente estressor no protocolo experimental. E caso a dosagem fosse realizada na saliva, o custo das mesmas, já que seriam realizadas várias vezes na mesma voluntária, seria muito alto, o que dificultaria a realização do estudo. Com relação à determinação da concentração bucal dos compostos sulfurados voláteis, os métodos alternativos seriam a avaliação do hálito dos voluntários por um juiz (método organoléptico) e a dosagem destes por cromatografia gasosa). O método escolhido para este estudo foi o uso do halímetro porque já dispomos deste equipamento em nosso laboratório de pesquisa.

7. Desconforto ou riscos possíveis: O voluntário poderá sentir algum desconforto durante a realização do exame clínico para averiguação das condições orais, porém este desconforto não será diferente daquele que pode ocorrer em qualquer exame clínico, e para diminuir este efeito, o voluntário será informado claramente do porquê da realização do exame e dos procedimentos a serem realizados. Além disso, como o jejum também pode ser desconfortante, planejamos a realização de somente dois experimentos por dia com o objetivo de evitar atrasos, e limitar ao mínimo possível o período de jejum dos voluntários. Estes receberão, ao final das avaliações, um café da manhã completo nas dependências do departamento. O teste utilizado para indução de ansiedade poderá causar algum desconforto decorrente da percepção que o voluntário terá de seu desempenho no teste e da imagem que terá de si mesmo e daquela que imagina que outras pessoas possam ter. Porém, o teste de cada voluntário será confidencial, e os estudos já realizados com este protocolo não indicam alterações fisiológicas que requeiram cuidados médicos. Por fim, pode haver algum desconforto pelo fato de que, devido ao horário das aulas (8h00), aos voluntários será solicitado o comparecimento no local do experimento às 7h00, e portanto será necessário que os mesmos acordem uma hora mais cedo nos dias em que as análises serão realizadas. Não há como diminuir o desconforto que isto possa causar ao voluntário. Porém, lhe será explicado que este horário foi determinado para diminuir o transtorno que a realização do experimento lhe causaria, se fosse realizado no horário de aulas ou de intervalo para almoço, e também para a padronização da coleta de dados.

8. Benefícios ao voluntário: Como benefício direto, os voluntários receberão informações sobre o resultado de sua avaliação clínica bucal e psicológica, e quando necessário receberão

encaminhamento formal para o respectivo tratamento. Ao final do estudo os voluntários serão convidados a assistirem a apresentação dos resultados obtidos, e seus significados na área de estudo em questão. Desta forma, os voluntários receberão informações sobre halitose, e, no experimento 1, sobre a determinação da duração do ciclo menstrual possibilitando maior auto-conhecimento sobre seu ciclo reprodutivo.

9. Indicação da forma de acompanhamento e assistência e seus responsáveis: De acordo com as avaliações realizadas durante o período de seleção dos voluntários, e no decorrer do estudo, casos que requeiram tratamento Odontológico ou Psicológico, receberão o respectivo encaminhamento, incluindo informações sobre os tratamentos a que os alunos da Universidade têm direito, no CECOM, localizado no campus de Campinas. O telefone deste serviço lhes será informado para agendamento da consulta. E, caso no primeiro semestre de 2008, sejam abertas inscrições para tratamento odontológico na FOP, os alunos também serão informados de que poderão entrar em contato com o Serviço Social da FOP para providenciarem sua inscrição para realização do tratamento na própria instituição.

10. Forma de contato com as pesquisadoras e com o CEP:

Fone: 2106-5380 / 2106 5212 E-mail: fklein@fop.unicamp.br / patyolima@terra.com.br / eduozero@fop.unicamp.br

Endereço: Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) UNICAMP, Av. Limeira, 901, CEP: 13.414-9000, Piracicaba-SP.

Em caso de dúvida quanto a questões éticas, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) UNICAMP. Av. Limeira, 901, Vila Areião, CEP: 13.414-903, Piracicaba-SP. Telefone/Fax: 2106-5349 / cep@fop.unicamp.br / www.fop.unicamp.br/cep

11. Garantia de esclarecimentos: O voluntário tem a garantia de que, em qualquer momento, antes, durante e após a conclusão da pesquisa, poderá entrar em contato com as pesquisadoras responsáveis para solucionar quaisquer dúvidas que possam surgir, com relação à pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de fornecer informações atualizadas sobre halitose, durante o estudo, ainda que isto possa afetar a vontade do indivíduo sobre o tema halitose, durante o estudo, ainda que isto possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando do mesmo.

12. Liberdade do voluntário em retirar seu consentimento: O voluntário terá total liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhuma penalização ou prejuízo acadêmico.

13. Garantia do sigilo: Durante a coleta de dados, os voluntários serão identificados por um número e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo, de tal forma que os pesquisadores assegurem a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

14. Formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa: O Voluntário deverá vir em jejum para a realização das análises propostas no estudo. Logo

ANEXO 3 – Beck Anxiety Inventory



Data: _____

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

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

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

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

Traduzido e adaptado por permissão de The Psychological Corporation, U.S.A. Direitos reservados ©1991, a Aaron T. Beck.
Tradução para a língua portuguesa. Direitos reservados ©1993 a Aaron T. Beck. Todos os direitos reservados.
Tradução e adaptação brasileira, 2001, Casa do Psicólogo® Livraria e Editora Ltda. BAI é um logotipo da Psychological Corporation.

ANEXO 4 – Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT)

Matriz utilizada no VRSCWT

Vermelho	verde	violeta	amarelo	Azul	violeta	amarelo	verde
Azul	verde	Vermelho	violeta	verde	Azul	Vermelho	amarelo
Vermelho	verde	Vermelho	Azul	verde	Azul	Vermelho	verde
verde	Azul	violeta	Vermelho	Azul	verde	violeta	Azul
amarelo	Vermelho	verde	violeta	Vermelho	Vermelho	Azul	violeta
Azul	Azul	verde	Azul	amarelo	verde	Vermelho	Azul

No cartão original os quadrados medem 26X26mm e as letras têm altura de 4mm.