

C2

CAROLINE MORINI CALIL

**INFLUÊNCIA DO ESTADO DE ANSIEDADE E DO
CICLO MENSTRUAL SOBRE A PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.
CPG. 23/01/2007
Fernanda Klein Marcondes
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, área de concentração Fisiologia Oral.

Orientadora : Prof^a Dr^a Fernanda Klein Marcondes

PIRACICABA
2006

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LAFES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BC
Nº CHAMADA I/UNIANP
C128i
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 21669
PROC. 16.415.07
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 13/03/07
BIB-ID 40 2969

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

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

C128i Calil, Caroline Morini.
Influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis. / Caroline Morini Calil. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Halitose. 2. Estresse. 3. Ciclo menstrual. 4. Proteínas salivares. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Influence of anxiety and menstrual cycle on the production of volatile sulfur compounds in healthy individuals

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Halitosis. 2. Stress. 3. Menstrual cycle. 4. Salivary proteins

Área de Concentração: Fisiologia oral

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Iraídes Nunes dos Santos, Fernanda Klein Marcondes, Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, Maria José Costa Sampaio Moura, Antonio Bento Alves de Moraes

Data da Defesa: 01-12-2006

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 01 de Dezembro de 2006, considerou a candidata CAROLINE MORINI CALIL aprovada.

Fernanda Kle Marcondes

PROFa. DRa. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Iraides Nunes dos Santos

PROFa. DRa. IRAIDES NUNES DOS SANTOS

Maria Jose Costa Sampaio Moura

PROFa. DRa. MARIA JOSE COSTA SAMPAIO MOURA

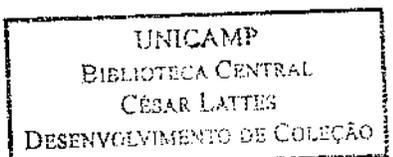
Maria Cecilia Ferraz Arruda Veiga

PROFa. DRa. MARIA CECÍLIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

Antonio Bento A. de Moraes

PROF. DR. ANTONIO BENTO ALVES DE MORAES

80607-7008



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **Nó e Fran**, por todo apoio, carinho e amor; por sempre terem respeitado, qualquer que fosse minha decisão. A minha mãe por me ouvir pacientemente sempre. A meu pai por ter esperança e otimismo em tudo.

Ao **Fabiano**, meu marido, companheiro e amigo, pelo amor que recebo todos os dias, por ter compreendido meus momentos de ausência e mesmo assim admirar meu trabalho.

A vocês, meu agradecimento pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente.

Aos meus irmãos **Paulo e Fábio**, pelos momentos de alegria e companheirismo.

Ao meu avô **Nelo**, onde quer que esteja, por orgulhar-se da minha profissão e da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes**, pela amizade e solicitude para me orientar, desde nosso primeiro contato; por sua preocupação com a qualidade de todos os projetos, e por sua dedicação e competência na realização deste trabalho em especial; por sua incansável paciência ao ensinar, principalmente ao corrigir, e buscar novos caminhos para me incentivar sempre. Agradeço também pela confiança em mim depositada, e por me incentivar a trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude.

Esperando ter correspondido, a minha admiração e meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários, por aceitarem alterar as suas rotinas e ceder parte de seu tempo para o desenvolvimento deste estudo.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

À professora **Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**, pelo exemplo de educadora, pela amizade e cujo incentivo e conhecimento científico contribuíram para a minha formação.

À professora **Olinda Tarzia** pelas sugestões, que muito contribuíram para o delineamento do projeto inicial, pela análise da versão preliminar desta tese, por dividir comigo seu conhecimento na área de halitose e pelo incentivo à prática clínica.

Às professoras **Maria Cristina Volpato e Cíntia Pereira Machado Tabchoury** pelas sugestões apresentadas na versão preliminar desta tese.

Ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**, sempre oferecendo auxílio nos momentos difíceis, pelo bom humor e amizade constante.

À **Prof. Dra. Célia Rizzati Barbosa**, professora da área de Prótese Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela amizade e pela contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho** pelas conversas de corredor e por sempre oferecer auxílio, qualquer que seja ele.

Às alunas de iniciação científica **Patrícia de Oliveira Lima e Fernanda Bado** pelo auxílio durante a realização deste projeto.

Ao técnico do laboratório da área de Fisiologia e Biofísica, **Feliciano**, pelo auxílio, amizade e momentos de descontração não só nesse trabalho como durante todo meu estágio de iniciação científica.

À **Eliete Riguetto** e **Elisa** secretárias do departamento de Ciências Fisiológicas, **Érica** e **Raquel** da Pós-Graduação e **Eliane** e **Patrícia** pela atenção dispensada em todos os momentos.

Às minhas vó **Arminda** e vó **Maria** pela presença, amor, carinho e ensinamentos da vida.

Às amigas **Ana Paula Tanno** e **Carolina Aires** pela amizade demonstrada desde nosso primeiro contato, pelos conhecimentos de laboratório e principalmente pelo companheirismo demonstrado durante esse tempo.

Aos enormes amigos **Léo**, (hoje amigo E cunhado) e **Lu Macchion** pelas conversas, mesmo que via internet, por todo apoio, bom humor em momentos difíceis e uma amizade verdadeira e constante.

Aos colegas de Pós Graduação **Mariana Franco**, **Rose**, **Luana**, **Vanessa**, **Karla**, **Eduardo**, **Vander**, **Rafaela**, **Mariana**, **Maria Cláudia** e **Juliana** .

Aos colegas da farmacologia **Roberta**, **Cristiane**, **Rogério**, **Karina**, **Rodrigo**, **Alcides**, **Beto**, pela especial amizade em todos os momentos.

Às colegas da pediatria **Camila**, **Fernanda**, **Carol**, **Márcia** e **Flávia**, pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas de infância **Ferfur, Camila, Cecé, Cris, Ana PP, Carol M, Bia M, Bia R, Bia A, Jú, Fê B, Tatá, Ise, Tati M**, por todos os momentos alegres e por sempre estarem presentes em momentos especiais.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade e pela infraestrutura disponível para desenvolver este trabalho.

A todos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

EPIGRAFE

“O estudo dos fenômenos da doença sem livros é navegar em mar desconhecido, enquanto que o estudo em livros sem pacientes é não navegar em mar algum”

William Osler

RESUMO

Alterações emocionais têm sido relacionadas à ocorrência da halitose que é caracterizada pelo aumento na produção de compostos sulfurados voláteis (CSV) no ar bucal exalado. Além disso, oscilações hormonais do ciclo menstrual também têm sido relacionadas a alterações na homeostasia bucal. Porém, ainda não está esclarecida a relação entre halitose, alterações emocionais e ciclo menstrual. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de CSV em homens (n=17) e em mulheres (n=14) nas fases pré-menstrual, menstrual e folicular, determinadas pelo método do calendário. A ansiedade foi induzida pelo “*Video-Recorded Stroop Color-Word Test*” (VRSCWT), que consiste na leitura, em 2 min, das cores em que 100 palavras designativas de cores estão pintadas, sendo que cada palavra apresentada encontra-se em cor diferente de seu significado. Por meio do questionário “*Beck Anxiety Inventory*” (BAI), foi avaliado o nível basal de ansiedade. A concentração bucal de CSV (halímetro), pressão arterial sistólica, diastólica, frequência cardíaca, cortisol salivar, fluxo salivar e concentração total de proteínas salivares foram avaliados antes e após o VRSCWT. Os resultados foram analisados utilizando-se análise de variância ($p < 0,05$). De acordo com o BAI, os voluntários não apresentaram alterações nos níveis basais de ansiedade. Na condição basal, as concentrações de CSV foram maiores durante as fases menstrual (131 ± 14) e pré-menstrual (124 ± 15) em relação à fase folicular (123 ± 15) e homens (85 ± 15 ppb; $p < 0,05$). Mulheres na fase pré-menstrual ($0,26 \pm 0,04$) apresentaram menor fluxo salivar do que as mulheres nas fases menstrual ($0,31 \pm 0,04$), folicular ($0,33 \pm 0,05$) e homens ($0,40 \pm 0,04$ mL/min; $p < 0,05$). A concentração total de proteínas salivares foi maior em homens ($1,00 \pm 0,06$, $p < 0,05$) em comparação as fases do ciclo reprodutivo (menstrual = $0,77 \pm 0,12$; pré-menstrual = $0,70 \pm 0,06$; folicular = $0,78 \pm 0,10$ mg/mL). Em homens, a pressão sistólica (125 ± 2 ; $p < 0,05$) foi maior em relação às mulheres (pré-menstrual = 108 ± 2 ; menstrual = 110 ± 2 ; folicular = 110 ± 2 mmHg). Ao contrário, homens apresentaram menor frequência cardíaca (69 ± 1 bpm; $p < 0,05$) em relação às mulheres (pré-menstrual = 80 ± 2 ; menstrual = 77 ± 3 ; folicular = 79 ± 3 bpm). Foi observada maior concentração salivar de cortisol na fase menstrual ($1,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$) em

comparação com as fases pré-menstrual ($1,3 \pm 0,13$), folicular ($1,4 \pm 0,19$) e homens ($1,4 \pm 0,07 \mu\text{g/dL}$). Nos homens, o VRSCWT induziu aumento na concentração bucal de CSV ($97 \pm 11 \text{ ppb}$), pressão arterial sistólica ($128 \pm 2 \text{ mmHg}$) e frequência cardíaca ($74 \pm 1 \text{ bpm}$), sem alteração na pressão arterial diastólica, fluxo salivar, concentrações salivares de proteínas e de cortisol salivar. Ao contrário, nenhuma diferença nas variáveis de resposta foi observada nas mulheres, após o VRSCWT ($p > 0,05$). Os resultados demonstraram que a ansiedade pode contribuir para o aumento da produção de CSV em homens, e que o status hormonal de homens e mulheres pode participar deste processo.

Palavras-chaves: Compostos sulfurados voláteis, halitose, ansiedade, ciclo menstrual.

ABSTRACT

Psychological symptoms have been pointed out as a factor, which induces halitosis, which is characterized by the increased production of volatile sulfur compounds (VSC) presented in the oral breathing. In addition, hormonal fluctuation of the menstrual cycle has been shown to affect oral homeostasis. However, the relationship among menstrual cycle, emotional factors and halitosis is not clarified. The aim of this study was to evaluate the influence of anxiety and menstrual cycle on the production of VSC in women (n=14) and in men (n=17). After approval by the ethics committee, volunteers with good oral and general health were submitted to the Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT) used to elicit anxiety. In women, the test was performed on the pre-menstrual, menstrual and follicular phases of their regular reproductive cycles. The menstrual phases were determined by the calendar method. The baseline level of anxiety was measured through the “*Beck Anxiety Inventory*” (BAI) before the VRSCWT. The VSC (ppb-halimeter), salivary flow (mL/min), total salivary protein concentration (mg/mL), systolic and diastolic blood pressure (SBP, DBP, mmHg), heart rate (HR, bpm) and salivary cortisol (ug/dL) measurements were performed before and after the application of the VRSCWT. Data were compared by Analysis of Variance ($p < 0.05$). According to BAI, none of the volunteers presented any anxiety disorder diagnosis. During basal situation, VSC was higher during the menstrual (131 ± 14) and pre-menstrual (124 ± 15) phases when compared to men (85 ± 15) and women in follicular (123 ± 15) phase ($p < 0.05$). Salivary flow was lower during pre-menstrual phase (0.26 ± 0.04 ; $p < 0.05$) than menstrual (0.31 ± 0.04), follicular (0.33 ± 0.05) phases and also compared to men (0.40 ± 0.04). Total salivary protein concentration was higher in men (1.00 ± 0.18 , $p > 0.05$) as compared to women in any menstrual phase (menstrual = 0.77 ± 0.12 ; pre-menstrual = 0.71 ± 0.06 ; follicular = 0.78 ± 0.18). SBP was higher in men (125 ± 2) as compared to women (pre-menstrual = 108 ± 2 ; menstrual = 110 ± 2 ; follicular = 111 ± 2). Heart rate was lower in men (69 ± 1) as compared to women in any phase of the menstrual cycle (pre-menstrual = 80 ± 2 ; menstrual = 77 ± 3 ; follicular = 80 ± 3). Salivary cortisol was higher in women during menstrual phase (1.7 ± 0.2) in comparison with men (1.3 ± 0.07) and women in pre-menstrual (1.3 ± 0.13) and follicular

(1.4 ± 0.19) phases. In men, the VRSCWT induced an increase in oral concentration of VSC (97 ± 11 , $p < 0.05$) without changes in salivary flow (0.40 ± 0.03) and protein concentration (1.00 ± 0.06) ($p > 0.05$). These changes were associated with increases of SBP (128 ± 1) and heart rate (74 ± 1) ($p < 0.05$). On the contrary, in women, no differences in any parameter were observed after the VRSCWT ($p > 0.05$). The results of the present study showed that, in men, the anxiety might contribute to production of VSC. Also, the hormonal status of men and women might be involved in this process.

Key words: volatile sulfur compounds, halitosis, anxiety, menstrual cycle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	02
2. OBJETIVOS.....	06
3. CAPÍTULOS	07
3.1 CAPÍTULO 1: Qual é a origem do mau-hálito ?.....	08
3.2 CAPÍTULO 2: Influence of anxiety on the production of volatile sulfur compounds.....	24
3.3 CAPÍTULO 3: Influência da ansiedade sobre a halitose: diferenças relacionadas ao gênero e ao ciclo menstrual.....	38
4. DISCUSSÃO GERAL.....	68
5. CONCLUSÃO.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
7. ANEXO 1 (Comprovante do Comitê de ética em pesquisa).....	75
8. ANEXO 2 (Termo de consentimento livre e esclarecido).....	76
9. ANEXO 3 (VRSCWT detalhado).....	83
10. ANEXO 4 (Beck Anxiety Inventory).....	85

LISTA DE ABREVIACOES

ACTH.....	Hormônio Adrenocorticotrófico
BAI.....	Beck Anxiety Inventory
Bpm.....	Batidas por minuto
PPb.....	partes por bilhão
CRH.....	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CSV.....	Compostos sulfurados voláteis
COVP.....	Compostos orgânicos voláteis de origem putrefativa
Fase F.....	Fase Folicular
Eixo HPA.....	Eixo Hipotálamo-Pituitrio-Adrenal
Fase M.....	Fase Menstrual
Fase PM.....	Fase Pré-Menstrual
VRSCWT.....	Vídeo-Recorded Stroop Color-Word Test

1. INTRODUÇÃO

Halitose é uma alteração do hálito, caracterizada pela emanção de odores fétidos pela boca, que apresenta origem local ou sistêmica, e causa constrangimento tanto para quem a possui como para as pessoas com as quais o indivíduo convive (Rosenberg & Culloch, 1992). Os odores desagradáveis são produzidos pela ação das bactérias gram-negativas da microbiota bucal sobre aminoácidos que contêm enxofre. A degradação de tais aminoácidos produz compostos sulfurados voláteis (CSV), representados, em sua maioria, pelo sulfeto de hidrogênio (H_2S), metil mercaptana (CH_3SH), e o dimetil sulfeto (CH_3SCH_3) (Springfield *et al.*, 2001), sendo as concentrações desses gases usadas como indicadores da severidade da halitose (Rosenberg *et al.*, 1991; Rosenberg & McCulloch, 1992).

A mensuração destes compostos pode ser realizada por meio de avaliação organoléptica do ar emanado da cavidade oral (Rosenberg *et al.*, 1992), por cromatografia gasosa (Rosenberg & McCulloch, 1992) ou por meio de um monitor de sulfeto (Rosenberg, 1990). As pequenas dimensões e simplicidade desses monitores facilitam o seu uso na rotina clínica e em pesquisas sobre halitose (Shimura *et al.*, 1996). Nos últimos anos um dos monitores desenvolvidos foi o halímetro, que contém um sensor voltamétrico sensível a sulfeto. O ar expirado é levado ao interior do aparelho através de uma cânula, por sucção. Este ar passa através do sensor, onde ocorre a contagem das moléculas de CSV presentes na amostra, e o valor é expresso em ppb em um visor digital. As vantagens do seu uso são o baixo custo, o fato de ser portátil e a rápida obtenção das medidas (Rosenberg *et al.*, 1991).

Estudos sobre a etiologia do mau hálito mostram que 56 a 85% dos casos são causados por condições orais originadas de má higiene bucal, placa dental, próteses não higienizadas, periodontite, saburra lingual ou consumo de alimentos condimentados (Attia & Marshal, 1982). Além disso, a halitose pode também estar relacionada a desordens do trato respiratório, diabetes, doenças hepáticas, gastrointestinais e renais (Attia & Marshal, 1982).

Muitas vezes, porém, o cirurgião-dentista se depara com o paciente que apresenta queixa de mau-hálito e surpreendentemente, durante a anamnese e exame clínico, não

encontra nenhum sinal ou causa orgânica para o sintoma. Com o passar do tempo esse mau odor não desaparece, e às vezes até se intensifica, gerando problemas para o profissional que, além de não solucionar o problema, não encontra na literatura explicações objetivas para o fenômeno. Diante disso, alterações emocionais e o estresse têm sido relacionados ao aparecimento da halitose, embora haja poucos estudos sobre essa relação (Eli *et al.*, 1996; Queiroz *et al.*, 2002; Kurihara & Marcondes, 2002).

A ansiedade é uma forma de inibição comportamental que ocorre em resposta a eventos ambientais que representem novidade e/ou sejam punitivos (Rang *et al.*, 1995), e apresenta sintomas como alteração do humor, alterações comportamentais e fisiológicas, tais como palpitações, hipervigilância e sudorese (Pratt, 1992). Além disso, a ansiedade também pode ser definida como uma resposta de alerta eficaz contra uma ameaça ou um estímulo estressante (Pratt, 1992), e pode contribuir para o desempenho em tarefas cognitivas (Graeff *et al.*, 1997). O termo estresse, introduzido por Walter Cannon, se refere à reação fisiológica causada pela percepção de situações aversivas ou de ameaça, que possam alterar a homeostasia do organismo (Carlson, 1998). O estresse envolve a ativação da secreção de catecolaminas e glicocorticóides, de outros hormônios e neurotransmissores, cujos efeitos também podem desencadear alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes àquelas desencadeadas por estímulos ansiogênicos. Portanto, não é clara a diferença entre a ansiedade e estresse, sendo inclusive que esta discussão ainda é um tema sem consenso na literatura científica.

Fisiologicamente, é a reação de estresse que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos aos inúmeros estímulos ambientais, nocivos ou não, a que estão constantemente expostos. Porém, quando esse estímulo é mantido por muito tempo ou é muito intenso, o processo de adaptação pode não ocorrer. Neste momento, desenvolve-se a fase de exaustão da reação de estresse em que o organismo se torna susceptível a distúrbios e patologias (Selye, 1936). No campo da Odontologia essa fase, e também situações que geram ansiedade, podem se manifestar na forma de reações alérgicas e inflamações bucais, úlcera aftosa recorrente (Fabián & Fabián, 2000), doenças periodontais e halitose (Queiroz *et al.*, 2002). Neste contexto, foi relatado aumento na produção de CSV em indivíduos saudáveis submetidos a um exame acadêmico, e esta alteração foi acompanhada de

diminuição do fluxo salivar, em relação aos valores observados uma semana antes do exame (Queiroz *et al.*, 2002). Apesar de haver evidências sobre a participação da hipossalivação e da diminuição da atividade imunológica, 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.

Um método que tem se mostrado bastante eficaz para medir o estresse e a ansiedade, é a quantificação da concentração salivar de cortisol (Castro & Moreira, 2003). Sabe-se que o estado de ansiedade e o estresse estimulam a secreção do hormônio esteróide cortisol, pelo córtex da glândula supra-renal. Como há uma relação direta entre as concentrações sanguíneas e salivares de hormônios e medicamentos, em vários estudos a dosagem salivar de cortisol tem sido utilizada devido à simplicidade na coleta da amostra e sensibilidade do método. Ao contrário, a coleta de sangue requer profissionais especializados e gera maior estresse devido à apreensão gerada pelo medo da agulha (Akyuz *et al.*, 1996). McCartan *et al.* (1996) encontraram correlação positiva entre ansiedade e a concentração de cortisol salivar. Além disso, Miller *et al.* (1995) demonstraram que o estresse, avaliado pelos níveis plasmáticos de cortisol, associado à extração dentária, em adultos, foi maior do que o relacionado com os demais procedimentos odontológicos.

Na clínica odontológica, é muito difícil a determinação das causas que induzem ansiedade e estresse, já que fatores sociais, econômicos e familiares não podem ser excluídos, e somam-se àqueles diretamente relacionados ao tratamento dental. Assim, é evidente a importância do desenvolvimento de protocolos experimentais que permitam a padronização da qualidade e intensidade do estímulo ansiogênico, assim como o seu papel no desenvolvimento de sintomas psicopatológicos e manifestações bucais. Em 1999, Leite *et al.* verificaram a eficiência do *Video Recorded Stroop Color Word Test* (VRSCWT) como um modelo experimental para indução de ansiedade em humanos. Foi observado que o VRSCWT foi efetivo em aumentar o estado de ansiedade em indivíduos normais, e que este efeito foi bloqueado pela administração do agente ansiolítico Diazepam.

Várias características do indivíduo, tais como o sexo, o ciclo reprodutivo, as características genéticas e a idade podem influenciar a reação de estresse e o estado de

ansiedade (Bánky *et al.*, 1994; Horan, 2000). No sexo feminino, a influência do ciclo menstrual sobre variáveis fisiológicas e comportamentais é cada vez mais reconhecida e estudada, principalmente em mulheres que relatam alterações na fase pré-menstrual. Neste período, ocorrem significativas alterações na secreção de esteróides sexuais, em particular da progesterona, e essas flutuações hormonais combinadas com tensões emocionais (estresse e ansiedade) podem exacerbar sintomas de irritabilidade, fadiga, confusão mental, depressão e ansiedade. A progesterona, secretada pelo corpo lúteo sob estimulação do hormônio luteinizante (LH), atravessa prontamente a barreira hemato-encefálica (Majewska, 1987), e é convertida, dentre outros metabólitos, à alopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-one). Tem sido mostrado que esse 3 α -hidroxi-esteróide tem ação ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa/hipnótica e anestésica, através de sua interação com sítios alostéricos do receptor GABA_A de ácido gama - aminobutírico (Brot *et al.*, 1997). Assim, sintomas da síndrome pré-menstrual, tais como ansiedade e depressão, parecem estar associados a rápidos declínios dos níveis de alopregnanolona no encéfalo (Smith, 1998).

Com relação à Odontologia, as oscilações hormonais características do ciclo menstrual e a síndrome pré-menstrual afetam a homeostasia bucal e o tratamento odontológico. Nas décadas de 60 e 70, alguns autores sugeriram que as oscilações na secreção de estrógeno e progesterona poderiam estar relacionadas às alterações de sensibilidade dos tecidos gengivais, aumento de exudato gengival, descamação de células epiteliais da cavidade oral e também ao aparecimento da halitose (Loe & Silness 1963; Egelberg, 1964; Lindhe & Attstrom 1967; Main & Ritchie 1967; Lindhe *et al.*, 1969; Tonzetich *et al.*, 1978). Entretanto, curiosamente, nos 20 anos seguintes há poucos artigos sobre uma possível relação entre ciclo menstrual e halitose. Em 2002, Queiroz *et al.* relataram que, durante o período pré-menstrual, mulheres com síndrome pré-menstrual apresentaram um aumento na produção bucal de CSV, em relação a mulheres não portadoras desta síndrome. Além disso, também foi observado que a incidência de herpes simples, estomatite herpética recorrente e úlceras aftosas, apertamento ou ranger dos dentes se torna maior neste período (Cureton, 1986).

Assim, embora possamos considerar que, em mulheres, as flutuações hormonais e alterações emocionais possam influenciar a homeostasia bucal, ainda não há trabalhos científicos suficientes que permitam esclarecer a relação entre o desenvolvimento de halitose, situações estressantes e ansiogênicas e o ciclo menstrual. E, é nesse contexto que o presente estudo foi desenvolvido.

2. OBJETIVOS

Estudar a influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis, avaliando a relação entre as fases do ciclo menstrual, a concentração bucal de compostos sulfurados voláteis, o fluxo salivar, os níveis de cortisol salivar e a concentração total de proteínas salivares.

3. CAPÍTULOS

Esta tese será apresentada na forma de três capítulos, que correspondem aos artigos resultantes da revisão bibliográfica (capítulo 1), e da análise dos dados experimentais (capítulos 2 e 3), durante o desenvolvimento deste estudo.

O Capítulo 1 trata de um artigo de revisão intitulado “Qual é a origem do mau hálito?”, aceito para publicação.

O Capítulo 2 apresenta um artigo publicado, que corresponde a dados parciais obtidos neste estudo, sob o título “Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds”.

E o Capítulo 3 se refere a um artigo em fase de redação, sob o título “Influência da ansiedade sobre a halitose: diferenças relacionadas ao gênero e ao ciclo menstrual”, correspondente à análise dos dados totais obtidos neste estudo.

Antes do início da seleção dos voluntários e da coleta de dados, o projeto referente a esta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (CEP – FOP), sob o protocolo 163/2003. A cópia do certificado de aprovação, emitido pelo CEP – FOP, está apresentada no Anexo 1. O modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que foi fornecido e assinado por todos os voluntários, está apresentado no Anexo 2.

3.1 CAPÍTULO 1

Calil CM, Tarzia O, Marcondes FK. Qual é a origem do mau-hálito? *Revista de Odontologia da Unesp*, no prelo, 2006.

O presente artigo refere-se à parte da revisão bibliográfica realizada para o desenvolvimento deste estudo, e foi aceito para publicação em agosto de 2006, conforme comprovante apresentado na página seguinte.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins curriculares que o artigo de CALIL, Caroline Morini; TARZIA, Olinda; MARCONDES, Fernanda Klein - Qual é a origem do mau-hálito - protocolo número 24/06-4, foi aceito para publicação na Revista de Odontologia da UNESP.

O mesmo será publicado na Revista de Odontologia da UNESP, volume 35, número 3, jul./set. 2006.

Araraquara, 30 de agosto de 2006.

Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni
Assistente Editorial
Revista de Odontologia da UNESP

Qual é a origem do mau-hálito?
Calil CM, Tarzia O, Marcondes FK

RESUMO

O termo “malodor oral” ou “halitose” é usado para descrever um odor desagradável, que emana da cavidade bucal e é motivo, atrás somente da cárie e doença periodontal, de visitas aos dentistas. Surpreendentemente, um problema de tal magnitude, com tamanha prioridade para o público, tem sido tradicionalmente negligenciado pelos cirurgiões-dentistas. A maioria dos casos de halitose origina-se na boca, como resultado do metabolismo microbiano, no qual compostos sulfurados voláteis são produzidos por bactérias gram-negativas anaeróbias. A halitose também tem sido relacionada à presença e severidade da doença periodontal e à quantidade de saburra lingual além de desordens sistêmicas. Entretanto, a ocorrência de mau hálito, na ausência de alterações bucais ou doenças sistêmicas, tem representado um desafio para o profissional de saúde e nesse contexto, sintomas psicopatológicos têm sido apontados como fatores indutores de halitose. Esse artigo discute os diferentes tipos de halitose e tem como objetivo auxiliar os cirurgiões-dentistas no manejo de pacientes sob essa condição além de informar os profissionais de saúde em geral.

Palavras chaves: halitose, saburra lingual, ansiedade, compostos sulfurados voláteis e doença periodontal.

What causes bad breath?

ABSTRACT

The term "oral malodor" or "halitosis" is used to describe a foul or offensive odor emanating from the oral cavity and may rank only behind dental caries and periodontal disease as the cause of patient's visit to the dentist. Surprisingly, a problem of this magnitude, with such high priority to the public has traditionally been neglected by the dental profession. Most oral malodor originates within the oral cavity itself, primarily as a result of microbial metabolism, in which volatile sulfur compounds (VSC) are produced by many oral bacteria, especially gram-negative anaerobic species. Halitosis has also been correlated with the presence and severity of periodontal disease and by the amount of coating on the tongue, in addition to systemic disorders. Since many patients complain about halitosis without clinical evidences, however, psychological symptoms have been pointed out as a factor inducing oral malodor. This article discusses the different types of halitosis and it is the authors' goal to inform health professionals in general, and help dental clinicians achieve better management of patients with this condition.

Key words: halitosis, tongue coating, anxiety, volatile sulfur compounds and periodontal disease

Introdução

A halitose constitui um problema de saúde pública devido ao grande número de pessoas atingidas, e à dificuldade de diagnóstico devido a suas causas multifatoriais. Por outro lado, no Brasil, é grande o número de profissionais que têm utilizado um monitor de sulfetos como instrumento único de diagnóstico do mau-hálito, ignorando a complexidade e os conhecimentos científicos obtidos, de forma sistematizada, sobre o tema. Vale ressaltar que o número de trabalhos publicados em português, nesta área, é restrito, e que a informação e atualização do cirurgião – dentista são imprescindíveis para um correto diagnóstico e, conseqüentemente um eficiente tratamento dos pacientes portadores de mau hálito. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi reunir o conhecimento atual sobre a halitose a fim de propiciar uma ferramenta útil tanto para profissionais da área clínica quanto para profissionais de pesquisa nas diversas áreas de saúde.

Discussão

O mau hálito ou halitose é um odor desagradável que emana da cavidade bucal e, na maioria dos casos, é resultado do metabolismo da microbiota bucal¹. Como a halitose pode provocar um desconforto tanto para o indivíduo que a possui, quanto para as pessoas de seu convívio, e interferir nas relações sociais, o mau hálito deveria ser considerado um problema de interesse público². Os odores desagradáveis emanados da cavidade oral resultam da produção de *compostos sulfurados voláteis* (CSV) e *compostos orgânicos voláteis de origem putrefativa*(COVP), por ação das bactérias gram-negativas anaeróbias da microbiota bucal sobre aminoácidos que contêm enxofre. Os CSV são representados, em sua maioria, pelo sulfeto de hidrogênio (H₂S), metilmercaptana (CH₃SH), e o dimetilsulfeto (CH₃SCH₃) e os COVP, pelo fenol, indol, escatol, putrescina, cadaverina, aminas e metano³.

Pela manhã, ao acordar, é normal que muitos indivíduos apresentem algum grau de mau hálito. Essa alteração é conhecida como halitose matinal e é atribuída a causas

fisiológicas relacionadas ao despertar matutino. A halitose pela manhã provavelmente ocorre devido à diminuição do fluxo salivar durante o sono e conseqüente acúmulo e putrefação de células epiteliais descamadas e alimento⁴. O epitélio bucal descamado e os restos alimentares são normalmente removidos pela ação da língua e ação detergente da saliva durante a mastigação normal, a deglutição e a fala. O ato de comer ou escovar os dentes pela manhã remove a halitose decorrente destes fatores⁵⁻⁶. Enquanto essa halitose matinal e passageira é facilmente controlada, a halitose persistente pode indicar desordens orais tais como doença periodontal, inflamação gengival, saburra lingual, ou desordens sistêmicas tais como úlceras gastrintestinais, hemorragia interna, hérnia de hiato, *diabetes mellitus*, cirrose hepática, leucemia, uremia, e condições idiopáticas não características⁷. A halitose, nessas situações é mais intensa, apresenta características específicas de cada patologia e requer conhecimento para ser tratada. Nestes casos, a sua presença não deve ser subestimada, pois pode ser o sinal indicativo de sintomas patológicos subjacentes.

Existem pelo menos três meios de se mensurar as concentrações de CSV. A avaliação organoléptica consiste em avaliar, através do olfato humano, o ar emanado da cavidade oral⁸. Apesar de ser considerado um método de referência por simular as situações do dia a dia, ele apresenta algumas desvantagens. Devido à inalação direta do ar emanado, os juizes podem sofrer riscos de contaminação e infecção cruzada. Além disso, os receptores olfativos humanos apresentam rápida adaptação, o que pode dificultar repetições de medidas e mensurações em larga escala².

Tonzetich *et al.*⁹⁻¹⁰ desenvolveram métodos de análise de mau odor bucal através da cromatografia gasosa. Como essa metodologia permite a separação e quantificação dos gases, esses autores propuseram que dentre os gases que contêm enxofre, o sulfeto de hidrogênio e a metilmercaptana eram os principais componentes responsáveis pelo mau odor oral. Embora possa ser considerado um método preciso, por permitir a mensuração de concentrações extremamente baixas dos gases, as suas desvantagens incluem o alto custo de instalação, a necessidade de treinamento de pessoal qualificado, a falta de um aparelho portátil e necessidade de tempo prolongado para realização das medidas. Estas características também inviabilizam o seu uso na prática clínica².

Nas duas últimas décadas do século XX, foi desenvolvido um monitor de sulfeto para a mensuração dos gases associados com o mau odor⁸. Estudos iniciais demonstraram associações significativas entre as avaliações organolépticas e aquelas realizadas com este novo equipamento⁸. Além disso, as mensurações realizadas com o monitor apresentaram melhor reprodutibilidade quando comparadas às avaliações organolépticas⁸. As suas pequenas dimensões e simplicidade de operação facilitaram o seu uso na rotina clínica e em pesquisas sobre halitose¹¹. Um dos monitores desenvolvidos foi o halímetro, aparelho no qual o ar expirado por sucção é levado através de uma cânula, até um sensor voltamétrico sensível a sulfeto, onde ocorre a contagem das moléculas de CSV presentes na amostra. O valor é expresso em ppb em um visor digital. Apesar de não permitir a diferenciação entre os CSV, as vantagens do seu uso incluem o baixo custo, o fato de ser portátil e a rápida obtenção das medidas⁸.

O diagnóstico da halitose é baseado principalmente na *história clínica* do paciente, a qual deve servir de base para o exame físico e a solicitação de exames complementares⁴. Assim é importante a realização de três exames de rotina: halimetria da boca, sialometria e teste BANA. A halimetria é a medida do hálito realizada através do monitor de sulfeto, que mede compostos de enxofre, de qualquer origem. Os valores de referência normais são no máximo 100 ppb para a medida do terço posterior da boca (valores obtidos durante a expiração, com inspiração suspensa) e entre 40 e 60 ppb para as medidas tomadas das narinas. Valores superiores aos mencionados indicam contaminação por microrganismos presentes na saburra e/ou no muco nasal¹². A sialometria é a avaliação do fluxo salivar e o teste BANA identifica a presença dos *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*¹³, que são os principais microrganismos produtores de CSV.

Estudos sobre a etiologia da halitose mostraram que, na maioria dos casos, ela pode resultar de alterações na cavidade bucal tais como doença periodontal, má higiene, impacção alimentar e principalmente saburra lingual². São dois os principais reservatórios de microrganismos responsáveis pela produção de CSV, na cavidade oral: o dorso da língua e o ambiente subgingival.

Desde a antigüidade¹⁴⁻¹⁵, sabe-se que indivíduos portadores de doença periodontal apresentam odores bucais em maior intensidade do que indivíduos sem doença periodontal. Além disso, Tonzetich¹⁶ e Fukushima¹⁷ mostraram que concentrações de CSV aumentam com a severidade da doença periodontal. Yaegaki & Sanada,¹⁸ utilizando a cromatografia gasosa, observaram que a concentração de CSV e principalmente de metilmercaptana (CH₃SH), em pacientes com doença periodontal, isto é, com profundidade à sondagem maior ou igual a 4 mm, eram superiores àquelas verificadas em indivíduos considerados saudáveis, ou seja, aqueles com profundidades à sondagem menores que 4 mm. Nesse mesmo trabalho, a fim de comparar as concentrações de CSV e a extensão da doença periodontal, avaliada através de um índice de sangramento, os autores observaram correlação positiva entre o percentual de sítios sangrantes e sítios examinados, a concentração de CSV e a razão entre CH₃SH / H₂S. Estudos recentes realizados em Israel¹⁹, Japão¹⁸ e EUA²⁰, também indicam associação entre doença periodontal e parâmetros de halitose.

Porém é importante ressaltar que, embora existam associações significativas entre doença periodontal e halitose, nem sempre há uma relação de causa e efeito entre essas desordens. Como foi evidenciado por Rosenberg em 2001⁸ “a relação entre mau odor e doença periodontal é confusa”. Muitos pacientes com queixa principal de mau odor têm algum nível de patologia gengival e/ou periodontal suficiente para explicar o surgimento da halitose. Este paradigma da periodontite é uma extensão lógica do reconhecimento de que a putrefação dos restos alimentares e a degradação de proteínas da bolsa periodontal ocorrem pela ação da microbiota oral e microrganismos associados à periodontite. Associações de higiene oral muito pobre (ou ausente) e lesões orais necrosantes em pessoas com halitose têm perpetuado a idéia de que sempre há etiologia periodontal. Entretanto a doença periodontal nem sempre é um pré-requisito para a produção do mau odor.

Embora muitas evidências indiquem que a doença periodontal pode causar ou aumentar a severidade da halitose, nem todos os pacientes com gengivite / periodontite apresentam mau hálito e vice-versa²¹. Uma possível explicação é o fato da saburra lingual também estar relacionada à origem do mau odor bucal^{22,23}.

A saburra lingual é uma massa esbranquiçada e viscosa, que se adere ao dorso da língua, em maior proporção na região do terço posterior²⁴. As fissuras e criptas linguais apresentam grandes quantidades de células epiteliais descamadas, bactérias e restos alimentares²⁵. Essa região representa, portanto, um local de acúmulo de bactérias e restos alimentares que são substratos para o metabolismo de organismos que geram compostos odoríferos. Embora atualmente haja evidências de que a maior causa bucal de halitose seja a saburra lingual^{4,23}, este fator ainda não recebe a atenção que merece dos profissionais, porque muitos cirurgiões-dentistas (CD) ainda se preocupam apenas com os dentes e, às vezes, com os tecidos periodontais, ignorando que toda a cavidade bucal é território que o CD deveria obrigatoriamente conhecer.

Além do papel dos gases H₂S e CH₃SH na geração da halitose, várias evidências sugerem que eles também tenham uma importância patológica. Estudos de cultura tonsilar mononuclear e de células fibroblásticas gengivais, através de mucosa não queratinizada, mostraram que compostos tiol voláteis, especialmente o CH₃SH, induzem significativos efeitos adversos na estrutura e no metabolismo dos tecidos orais²⁶. Estudos *in vitro* de permeabilidade²⁷, conduzidos em mucosa oral não queratinizada, mostraram que o CH₃SH pode penetrar nas três camadas teciduais da mucosa (epitélio, membrana basal e tecido conjuntivo) e aumentar a sua permeabilidade às moléculas de prostaglandina E₂ e, em extensão menor, aos lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), conseqüentemente iniciando um processo inflamatório. Assim, sugere-se que o CH₃SH pode ser um fator de contribuição para eventos enzimáticos e imunológicos que conduzem à degeneração tecidual na doença periodontal. Dessa forma, um diagnóstico precoce dos sintomas da halitose, por meio da mensuração da concentração bucal de CSV, poderia impedir a progressão da doença periodontal evitando a potencial perda de dentes²⁸.

Além das halitoses de origem bucal, existem ainda as halitoses que derivam da presença de compostos orgânicos voláteis de origem putrefativa e de CSV nas vias aéreas superiores e seios nasais. Em casos de sinusites dos seios nasais e paranasais, a retenção e decomposição putrefativa de material orgânico na rinofaringe pode ser uma das causas de mau hálito de origem não bucal^{29,4}. Além disso, a produção excessiva de muco, ou

alterações de suas características, associada à secreção nasal posterior pode provocar estase e putrefação local contribuindo para a formação do mau cheiro⁴.

Embora na maioria das vezes o mau odor tenha origem na cavidade oral, a halitose também pode ter origem sistêmica e estar relacionada à ocorrência de diabetes, doenças hepáticas, gastrintestinais e renais⁷. Em raros casos de regurgitações e eructações gástricas, o estômago pode provocar a volta de material orgânico semidecomposto à boca. Entre as alterações funcionais podem ser citadas as dispepsias com odor bucal característico de ácido clorídrico. Normalmente a válvula cárdia impede a volta do material e do odor, não sendo comum o mau hálito de origem estomacal. Em alguns pacientes há também o aumento do antiperistaltismo, com freqüente formação de saburra lingual, geralmente acompanhado de queimação na língua. Este achado é mais comum em pacientes sob estresse e, nestes casos, as alterações do estômago costumam ser a expressão da ansiedade e das tensões emocionais presentes.^{4,30} Além disso, diversos medicamentos, como antibióticos, sulfas, vitaminas do complexo B podem resultar em odores no hálito, qualquer que seja sua via de aplicação⁵.

A síndrome da boca seca é também um dos fatores que contribuem para a ocorrência da halitose³¹. A redução do fluxo salivar enfraquece os mecanismos de limpeza mecânica da cavidade bucal e predispõe a flora bucal ao crescimento e proliferação de microorganismos gram-negativos responsáveis pelo mau odor³². Nesse sentido, Shinjiro *et al.*³¹ demonstraram não haver correlação significativa entre as concentrações de CH₃SH e H₂S e o fluxo salivar em indivíduos saudáveis. Porém, em indivíduos com fluxo salivar abaixo de 0,1 mL/min, taxa indicativa de hipossalivação severa, foi observado aumento nas concentrações bucais de CH₃SH e H₂S em comparação àquelas encontradas em indivíduos com fluxo salivar acima de 0,1mL/min. Os autores sugeriram que a redução extrema da secreção salivar pode ser um dos fatores de risco para a geração de mau hálito. Porém, a redução do fluxo salivar, dentro dos padrões de normalidade, não parece influenciar significativamente a intensidade do mau odor.

As oscilações hormonais características do ciclo menstrual e a síndrome pré-menstrual também podem afetar a homeostasia bucal e o tratamento odontológico, sendo que as oscilações na secreção de estrógeno e progesterona poderiam estar relacionadas às

alterações de sensibilidade dos tecidos gengivais, aumento de exudato gengival, descamação de células epiteliais da cavidade bucal e também ao aparecimento da halitose^{33-34-35-36-37-38,16}. Além disso, sintomas psicopatológicos e o estresse também têm sido relacionados ao aparecimento do mau-hálito, embora haja poucos estudos sobre essa relação³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰.

Modelos experimentais em animais de laboratório, têm sido muito utilizados para o estudo da relação entre sintomas psicopatológicos e o desenvolvimento de doenças, uma vez que possibilitam o controle de variáveis envolvidas na reação de estresse não passíveis de controle em humanos. Kurihara & Marcondes⁴⁰ mostraram que o estresse agudo, por natação ou imobilização, induziu aumento significativo nas concentrações bucais de CSV, em ratos de laboratório.

Queiroz *et al.*³⁸ observaram que, no dia da aplicação de uma avaliação acadêmica, alunos de graduação apresentaram aumento nas concentrações bucais de CSV e redução do fluxo salivar, em relação aos valores obtidos uma semana antes e uma semana após a avaliação. Estes efeitos foram relacionados à ansiedade dos alunos frente ao exame acadêmico.

Recentemente, também observamos aumento na concentração bucal de CSV após a apresentação de uma situação experimental ansiogênica⁴¹. Nesse trabalho, um grupo de homens saudáveis sistêmica e oralmente, foi submetido a um teste laboratorial de indução de ansiedade denominado “Video Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT)”⁴². Além de aumento nas concentrações bucais de CSV, em relação aos valores obtidos antes da aplicação do VRSCWT, houve aumento de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica que são indicadores da ativação simpática, confirmando que o teste utilizado representava uma situação estressante. Por outro lado, não houve alteração do fluxo salivar, sugerindo que alterações bioquímicas, ainda não esclarecidas, e possivelmente causadas pela indução de ansiedade poderiam explicar o aumento na produção de CSV. Segundo Bosch *et al.*⁴³, o aumento na atividade simpática induzido pelo estresse aumenta a produção de mucina salivar, substância responsável pela aderência de células descamadas e de microorganismos sobre o dorso da língua. Esse aumento de substrato poderia então estar relacionado ao

aumento de CSV encontrado após uma situação estressante, uma vez que CSV são produtos do metabolismo bacteriano.

Considerando os estudos envolvendo situações de estresse e ansiedade, o aumento nas concentrações bucais de CSV parece confirmar que o mau hálito pode ser causado por fatores emocionais, e poderia ocorrer mesmo em indivíduos que apresentam condições periodontais relativamente favoráveis, ausência de cárie e de saburra lingual. Além disso, quando nesses pacientes não é encontrado nenhum sinal clínico que possa explicar a formação de malodor, é freqüente o diagnóstico de halitofobia, antes mesmo de se especular sobre a possível influência de períodos de estresse ou de ansiedade. O falso diagnóstico de halitofobia pode acarretar problemas psicológicos futuros decorrentes do constante desconforto que a presença de halitose causa.

Considerações finais

O mau hálito é um problema que por muitos anos foi considerado um tabu mesmo nas sociedades modernas, porém estudos recentes revelam um avanço do conhecimento nessa área, e o profissional de saúde, principalmente o cirurgião-dentista deve estar preparado e atualizado, para atuar corretamente no manejo de pacientes sob essa condição. Neste sentido, apesar da relação entre doença periodontal, saburra lingual e má higiene oral com o mau hálito estar bem definida na literatura e na clínica odontológica, os profissionais de saúde ligados à odontologia devem estar conscientes de que o estresse e a ansiedade também podem induzir alterações na cavidade bucal e contribuir para a ocorrência da halitose.

Agradecimento

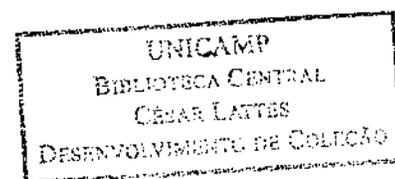
Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio pesquisa concedido à FKM (Processo 04/06298-2), e bolsa concedida à CMC (Processo 03/11592-4).

Referências

1. Tonzetich J, Ng SK. Reduction of malodor by oral cleansing procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976; 42 (2): 172-81.
2. Rosenberg M, McCulloch CA. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol.* 1992; 63 (9): 776-782.
3. 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): 1441-1444.
4. Tarzia O. Halitose: Um desafio que tem cura. São Paulo: Editora de publicações biomédicas; 2003.
5. Costa IM. Patologia das halitoses. *Odontólogo Moderno* 1987; 14(6):7-16.
6. Tonzetich J. Chromatographic separation of methionine, methionine sulphoxide, methionine sulphone, and their products of oral microbial metabolism. *Anal Biochem.* 1976; 73 (2): 290-300.
7. Attia EL, Marshal KG. Halitosis. *Can Med Assoc J.* 1882; 126: 128-135.
8. 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): 1436-1440.
9. Tonzetich J. Oral Malodor: An indicator of health status and oral cleanliness. *Int. Dent. J* 1977; 28: 309-319.
10. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor: A review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol.* 1977; 48: 13-20.
11. Shimura M, Watanabe S, Iwakura M, Oshikiri Y, Kusumoto M, Ikawa K, Sakamoto S. Correlation between measurements using a new halitosis monitor and organoleptic assessment. *J Periodontol.* 1997; 68 (12): 1182-5.
12. Shaw M. Instruction Manual – RH-17 Series Halimeter. California: Interscan Corporation, 1999.
13. Loesche WJ. Rationale for the use of antimicrobial agents in periodontal disease. *Int J Tech Assess in Health care.* 1990; 6: 403-17.
14. Eourdet PM. Soins faciles pour la propete de la bouche. Paris; 1771.

15. Geist H. Vom Foete ex ore in der Antique. *Zahnarztliche Praxis*. 1956; 7:12-13.
16. Tonzetich J. Oral malodour: an indicator of health status and oral cleanliness. *Int Dent J*. 1978; 28 (3): 309-19.
17. Fukushima K. A fundamental and clinical study on the ingredients of bad breath in various oral conditions. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986; 32: 84-104.
18. Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects with and without periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1992; 21: 434-439.
19. Kozlovsky A, Gordon D, Galernter I, Loesche WJ, Rosenberg M. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. *J. Dent. Res*. 1994; 73: 1036-1042.
20. De Boever EH, De Uzeda M, Loesche WJ. Relationship between Volatile Sulfur Compounds, BANA-Hydrolysing bacteria and gingival health in patients with and without complaints of oral malodor. *J. Clin. Dent*. 1994; 4: 114-119.
21. Bony A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. *J. Periodontol*. 1994; 6: 37-46.
22. Coil JM, Tonzetich J. Characterization of volatile sulphur compounds production at individual gingival crevicular sites in humans. *J Clin Dent*. 1992; 3: 97-103.
23. Calil, CM. Influência da doença periodontal e dos níveis de saburra lingual na halitose. [Monografia de Especialização]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia, Unicamp: 2005.
24. Quirynen M, Avontroodt P, Soers C, Zhao H, Pauwels M, van Steenberghe D. Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *J Clin Periodontol*. 2004 Jul; 31(7): 506-10.
25. De Boever EH, Loesche WJ. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Microbiol*. 1996; 34: 537-542.
26. Tonzetich J, Yaegaki K, Coil JM. Collagen metabolism by fibroblasts cultures in presence of methyl mercaptan. *J Dental Res*. 1986; 64: 786.
27. Ng W, Tonzetich J. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J. Dental Res*. 1984; 63: 994-997.

28. Kleinberg G, Westbay G. Salivary and Metabolic factors involved in oral malodor formation. *J. Periodontal Res.* 1992; 63: 768-775.
29. Bogdasarian RS. *Otolaryngologic. Clinics of North America* 1986; 19(1): 101-17.
30. Grein NJ. *Estomatologia para o clínico – halitose: diagnóstico e tratamento. Odontólogo Moderno* 1982; 9(6): 40-5.
31. Shinjiro K, Shuji A, Kenjiro G, Eriko Kurihara, Toshihiro A, Tadamichi T. Low salivary flow and volatile sulfur compounds in mouth air. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 38-41.
32. Messadi DV. Oral and nonoral sources of halitosis. *J Calif Dent Assoc.* 1997; 25: 127-31.
33. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand.* 1963; 21: 533.
34. Egelberg J. Gingival exudate measurements for evaluation of inflammatory changes of the gingivae. *Odonotologisk Revy.* 1964; 15: 381.
35. Lindhe J, Attstrom R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res.* 1967; 2: 194.
36. Main DMG, Ritchie GM. Cyclic changes in oral smears from young menstruating women. *Br J Dermatol.* 1967; 79: 20-30.
37. Lindhe J, Attstrom R, Bjorn AS. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycle. *J. Periodontal Res.* 1969; 4: 97.
38. Queiroz CS, Hayacibara MF, Tabchoury CPM, Marcondes FK, Cury JA. Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 337-340.
39. Eli I, Bath R, Kozlowsky A, Rosenberg M. The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. *Psychosom Med.* 1996; 58 (2): 156-159.
40. Kurihara E, Marcondes FK. Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress.* 2002; 5(4): 295-298.
41. Calil MC, Marcondes FK. Influence of anxiety on the production of oral volatile compounds. *Life Sci.* 2006; 79: 660-664.



42. Silva FT, Prado GB, Ribeiro LCG, Leite JR. The anxiogenic video-recorded Stroop color-word test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. *Physiol and Behav.* 2004; 82(2-3): 215-230.
43. Bosch JA, De Geus EE, Ring C, Nieuw Amerongen AV, Stowell JR. Academic examinations and immunity: academic stress or examination stress? *Psychosom Med.* 2004; 66 (4): 625-626.

3.2 CAPÍTULO 2

Calil CM & Marcondes FK. Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds. *Life Sciences*, v.79, p. 660-664, 2006.

O presente artigo refere-se a dados parciais obtidos no presente estudo, e foi publicado em julho de 2006. A autorização para inclusão deste artigo, nesta tese, consta na descrição dos direitos autorais, cuja cópia está apresentada na página 36.



Influence of anxiety on the production of oral volatile sulfur compounds

Caroline Morini Calil, Fernanda Klein Marcondes *

Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

Received 22 November 2005; accepted 10 February 2006

Abstract

Since many patients complain about halitosis without there being any clinical evidence of its cause, psychological symptoms have been pointed out as halitosis-inducing factors. The aim of this study was to evaluate the influence of anxiety on the production of volatile sulfur compounds (VSC). Seventeen undergraduate men in good oral and general health participated in this study, after approval by the ethics committee. The volunteers were requested to refrain from toothbrushing, using mouth rinse and eating on the experimental day. Before presenting the anxiogenic condition, the volunteer was asked to fill out the Beck Anxiety Inventory questionnaire, to check whether he had been exposed to stressors during the previous week. The Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT) was used to elicit anxiety. The VSC (hallimeter), blood pressure, heart rate and salivary flow measurements were taken before and after the VRSCWT. The volunteers presented a minimal or slight level of anxiety before the test. There was an increase in the oral concentration of VSC, Systolic Blood Pressure and of heart rate ($p < 0.05$) after the VRSCWT, and no changes in the salivary flow. The results of the present study showed that the anxiogenic condition (VRSCWT) induced increases in VSC concentration, which might contribute to halitosis.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Volatile sulfur compounds; Anxiety; Halitosis; Blood pressure; Salivary flow rate

INTRODUCTION

Halitosis is a general term used to describe an unpleasant or offensive odor emanating from the oral cavity. Oral malodor can be attributed to a variety of products arising from bacterial metabolism of amino acids (Ratcliff & Johnson, 1999). These metabolites include many compounds, such as indole, skatole and volatile sulfur compounds (VSC). Hydrogen sulfide, methyl mercaptan and dimethyl sulfide constitute the VSC observed in higher concentrations in the oral breath and are the main components of bad breath originating from the oral cavity (Tonzetich, 1971).

Around 90% of all bad breath odors originate in the mouth itself and more specifically, it has been reported that around 40% originated in the dorso-posterior

region of the tongue (Springfield *et al.*, 2001). Gingivitis and periodontitis have also been related as the possible causes of halitosis (Yaegaki & Sanada, 1992). Moreover non-oral pathological conditions, including infection of the upper and lower respiratory tracts, the gastrointestinal tract and some metabolic diseases have also been identified as a halitosis-inducing factors (Manolis 1983; Kurihara & Marcondes, 2002; Queiroz *et al.*, 2002).

However, many patients complain about halitosis without any clinical evidence, such as periodontal disease, gingival bleeding and tongue coating. In addition, clinical observations suggest that elevated concentrations of VSC frequently occur in mouth air from stressed patients without oral disease, but only a few studies have directly addressed the issue of emotional disorders and development of halitosis (Kurihara & Marcondes, 2002; Queiroz *et al.*, 2002).

Academic examinations are one of the most frequently used manipulations in stress and anxiety research, but the results are sometimes difficult to compare, and findings are frequently conflicting. For example, secretory immunoglobulin A may be increased or decreased depending on whether the saliva sample for examination is collected within minutes of the beginning or at some other time of the day (Bosch *et al.*, 2004). Thus, laboratory stressors are useful because it is possible to have better control of experimental variables. A rational manner is the use of a laboratory procedure that elicits clinically relevant anxiety symptoms in normal volunteers (experimentally induced anxiety methods) for the initial screening evaluation of anxiolytic drugs. The induction of anxiety can be elicited in the following ways: (a) laboratory procedures, e.g. simulated public speaking; (b) real life situations, e.g. dental surgery; (c) drug administration, e.g. caffeine (Pilliard *et al.*, 1978). These laboratory procedures have some relative advantages in clinical trials: the volunteers are easily recruited; they are quickly performed; greater control and homogeneity of induced anxiety; clearer drug side-effects profile (McNair *et al.*, 1982). Mental test task (mental arithmetical test, Stroop color-word test, etc.) and simulated public speaking are the most frequent experimentally- induced methods used. The Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT) (Leite *et al.*, 1999) requires mental effort

and is notable for its simplicity and the fact that it satisfies the ethical principles of research with human beings (Leite *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004).

Since the VRSCWT has been validated as an experimental procedure for inducing anxiety, and the relationship between halitosis and psychological factors is not clear, the purpose of this study was to investigate the effect of an anxiogenic situation induced by the VRSCWT on VSC production in healthy volunteers.

MATERIAL AND METHODS

Participants

Seventeen male, non-smoking, university undergraduates (mean age 21) volunteered to participate in this study. Participants gave written informed consent to the aim and procedures of the study. All the procedures were approved by the University Ethical Committee (protocol n° 163/2003). The volunteers filled out a questionnaire about their general health including questions changes on hepatic, gastric, respiratory among other functions and medication undergoing. Also an oral clinical examination was done. Only those volunteers in good oral and systemic health were included in the study.

Procedures

Measurements were recorded between 7:00 and 8:00 am. The volunteers were requested to comply with the following criteria: 1) to avoid using any oral rinse or breath freshener up to one week before the experiment day; 2) to avoid eating spicy foods or those containing onion or garlic 24 before the experiment; 3) to abstain from eating and drinking at least 8 hours before the experiment, although they were allowed to drink water up to 3 hours before the experiments; 4) to avoid from carrying out their normal oral hygiene practices and from using scented cosmetics or after-shave lotions on the morning of the experiment day (Tarzia, 2003).

When the participants arrived at the test laboratory, the experimental procedures were explained to them. Next they filled out the *Beck Anxiety Inventory* questionnaire to

check whether the volunteer had been exposed to stressors during the previous week. Subsequently blood pressure and heart rate were measured and saliva was collected. The VSC measurements were made using a Halimeter according to Queiroz *et al.* (2002). These data were labeled as the “baseline” experimental situation. Then the volunteer were submitted to the anxiogenic situation induced by the Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT), for 2 minutes. Immediately after the VRSCWT, blood pressure, heart rate and VSC concentration were measured and saliva was collected again. This final set of data was labeled as the “anxiety” experimental situation.

Beck Anxiety Inventory (BAI; Beck & Steer., 1990) and Cardiovascular Parameters

The BAI is a 21-item self-report questionnaire that lists the symptoms of anxiety. The respondent is asked to rate how much each symptom has bothered him in the past week. The symptoms are rated on a four-point scale, ranging from “not at all” to “severely”. The instrument has valid internal consistency ($\alpha=0.92$) and high-retest reliability ($r=0.75$), (Beck & Steer., 1990). Its brevity and simplicity make it an ideal tool for use as a pre-screen for presence of an anxiety disorder. Before and immediately after the VRSCWT, systolic, diastolic blood pressure and heart rate were recorded using a Digital Blood Pressure Monitor (Pro Check).

Saliva Collection

Saliva was collected by means of the “spitting-method”, in accordance with the directions given by Tarzia (2003). The collection trial started with the instruction to void the mouth of saliva by swallowing. Subsequently, saliva was allowed to accumulate in the floor of the mouth, without stimulation of saliva secretion by means of orofacial movements. Saliva was collected for 5 minutes. The total volume was measured and the salivary flow rate was expressed in mL/min.

Volatile sulfur compound measurements

The VSC measurements were made using a portable industrial monitor (Halimeter; Interscan Corp., Chatsworth, CA, USA) as previously described (Rosenberg *et*

al.,1991; Queiroz *et al.*, 2002). Subjects were asked to refrain from talking for 1 minute prior to measurements. A plastic straw was inserted and positioned above the posterior part of the dorsum of the tongue, not touching the oral mucosa or the tongue. The subject was not allowed to breathe during each sampling, kept his mouth open by approximately 1.5 cm, and the peak VSC value was recorded. Measurements were made in duplicate and the mean value was calculated (Monteiro *et al.*, 2004).

Anxiogenic Condition

The VRSCWT (Leite *et al.*, 1999) was used to elicit anxiety in the volunteers. In short, this test consists of presenting the participant with a board containing 100 of the color-naming words blue, yellow, red, green and violet organized randomly in a 10 x 10 matrix. Each word is printed in a color differing from its meaning, for example, the word “red” is printed in yellow ink. The participant was instructed to say the colors in which the words were printed, as quickly as possible in the sequence presented, and this was tape recorded. The tasks had to be performed in 2 min (maximum) and any errors were signaled by a bell. The whole test was recorded and presented to the participant on a TV screen during the test (Silva *et al.*, 2004).

Statistical analysis

A paired Student’s t test was applied to compare VSC concentration, blood pressure, heart rate and salivary flow before and after the anxiogenic situation, at a level of significance of 5%.

RESULTS

The data of the Beck Anxiety Inventory revealed the following: fifteen volunteers (88.2%) presented level “minimum” of anxiety and only 2 (11.7%) presented level “slightly”, which means any basal anxiety disorder diagnosis.

There was an increase in the oral concentration of VSC immediately after the anxiogenic situation, without changes in the salivary flow rate. Systolic blood pressure was

also higher after the anxiogenic situation than before it, but the diastolic blood pressure remained unchanged (Table 1).

Table 1. Concentration of Volatile sulfur compounds (VSC), salivary flow and cardiovascular parameters of volunteers submitted to anxiogenic experimental situation

<i>Selected Parameters</i>	<i>Baseline^a</i>	<i>Anxiety^a</i>	<i>p values^b</i>
VSC Concentration (ppb)	83 ± 14	94 ± 15 *	0.0385
Salivary flow (mL/min)	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.3778
Systolic Blood Pressure (mmHg)	127 ± 3	132 ± 2 *	0.0167
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	79 ± 3	77 ± 3	0.5058
Heart rate (bpm)	69 ± 2	74 ± 2 *	0.0308

^aMeans ± SEM. ^bPaired Student t test. *Statistically different from baseline values. N = 17. bpm = beats per minute.

DISCUSSION

The results of the present study showed that an induced anxiogenic situation increases VSC oral concentration. The data of the Beck Anxiety Inventory obtained during the baseline experimental situation showed that most of the volunteers presented the “minimum” level of anxiety. This result showed that they had not been exposed to stressors during the previous week. Thus, the volunteers did not show considerable anxiety levels that could interfere in the baseline analysis.

At the end of the VRSCWT, the volunteers presented the following physiological changes: increased blood pressure and heart rate, which could be considered characteristics of a fear and anxiety situation (Silva *et al.*, 2004). These alterations may be explained as the classical “fight or flight” response to stress, with involvement of sympathetic stimulation. These physiological changes are related to the fact that the volunteers believed

that their performance was being evaluated, since the anxiogenic effect of the situation depended on the fact that they saw their performance during the task as a threat to their self-esteem (Leite *et al.*, 1999). The blood pressure and heart rate increases presented by the volunteers confirm that the VRSCWT was an anxiogenic protocol. Therefore was a laboratory procedure available to evaluate the relationship between emotional factors and halitosis.

The association between stress and heightened susceptibility to oral disease has been demonstrated in both human and animal studies (Breivik *et al.*, 1996; McCartan *et al.*, 1996). Recently, Kurihara & Marcondes, 2002 reported that rats submitted to swimming stress showed an increase in oral VSC concentration. Also, Queiroz *et al.*, (2002) demonstrated that healthy undergraduate students presented higher oral VSC concentration before an academic examination in comparison to one week after it.

The increases in the VSC concentrations observed in this study were not due to other stressors. One might argue that the effects may be due to alterations in the volunteers' daily life. However, all details that could interfere in their morning emotional state, such as academic exams, laboratory activities in which they would be evaluated, were borne in mind, and during these days, all the experiments were canceled. Since cardiovascular responses observed in the present study were in accordance with a state of anxiety (Leite *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2000), the present study data show that the anxiety induced by VRSCWT enhanced the oral VSC concentration. The pathway by which this emotional change affects VSC production in such a short period, however, remains a subject for further studies, and might help to explain the development of halitosis in stressed and anxious patients.

It's worth to note that halitosis may in some cases also involve compounds other than VSC, but the conclusions in the present study relate to orally produced VSC only. This was found acceptable, as VSC levels are acknowledged as the dominant component of halitosis (Tonzetich, 1971), and the halimeter has been extensively used in related studies (Rosenberg *et al.*, 1991; Waler, 1997) showing reproducible values of VSC.

In comparison to clinical studies, the VSC scores presented here were low, presumably because the test population consisted of subjects without complaints of halitosis and excellent oral health. This can be explained by the fact that our volunteers were all undergraduate dental students. One can argue that it is a limitation of the present study. In fact this is not a regular condition observed in the clinical practice. On the other hand it is a useful baseline condition in order to study the effect of stress or emotional states on the oral homeostasis.

The present data also showed lower oral VSC values in comparison to Queiroz *et al.* (2002), although the Queiroz population had the same characteristics, i.e., the volunteers were undergraduate dental students with good oral health too, in the same University. Queiroz *et al.* (2002) evaluated the effect of an academic examination in students without considering their gender. In the present study the volunteers were constituted just of men. Since it has been demonstrated that there is an increase in the oral VSC production in women during the menstrual period (Tonzetich, 1978; Queiroz *et al.*, 2002), this variable (gender) was controlled and no women were included in the present study sample. Therefore low oral VSC scores were observed. Moreover, the fact that the differences between the stressful and non stressful situation was around 40 and 49 ppb, while in the present study it was just 11 ppb could be explained because Queiroz *et al.* (2002) used men and the women together in the same group.

In addition, while performing the VRSCWT, the volunteers have to say the words out loud. This situation contributed to the exchange between intra- and extraoral breath, decreasing the concentration of the VSC produced in the oral cavity during the VRSCWT. This was a limitation of the anxiogenic test used. If ones uses a modified version (Bakke *et al.*, 2004) of the VRSCWT, which the volunteer performs the test in front of computer, without saying the words out loud, probably, the increase of oral VSC concentration would probably be higher. However the present study has been conducted before the new version of VRSCWT was developed. However this did not compromise the validity of the present study data. On the contrary higher VSC levels would probably have been obtained if the modified version of the VRSCWT had been used.

Even considering these limitations, the present study data confirm the influence of emotional states in the oral VSC production and represent an important contribution to the understanding of the relation between anxiety and halitosis.

Although the salivary flow reduction induced by stress and anxiety might be a common explanation for increases in oral VSC concentration, this was not observed in the present study. Most laboratory studies in psychoneuroimmunology make use of stressors that require mental effort and that are characterized by their potential to evoke a classic fight-flight cardiovascular response pattern e.g., Mental arithmetic, Stroop task, and Reaction tasks (Carroll *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2003). In response to the activation of the sympathetic system, noradrenaline and epinephrine are secreted, acting in the vascular tissue associated with glandular tissue. This reaction causes vasoconstriction and thus the salivary flow decreases. However it may have been overlooked that there is a body of literature showing that many stressful situations do not necessarily elicit a substantial salivary flow reduction (Bosch *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2003). Although the inhibitory effects of anxiety on salivation may appear to be common knowledge, the various authors reviewing this topic were unanimously puzzled by the fact that salivary volume is found to decrease in some studies and to increase in others, depending on the type of stimulus (Queiroz *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2003). Therefore, the present study data confirm this lack of consensus in the literature and the relationship between halitosis and salivary flow reduction still remains a matter of debate.

Moreover, little is known about how, or even if, stress affects the process involved in salivary composition (Bosch *et al.*, 2000). For instance, it is not possible to eliminate the hypothesis of the anxiogenic situation created by the VRSCWT being capable of inducing biochemical changes with an effect on salivary secretion and subsequently on oral VSC concentration. In the present study the composition was not evaluated, but it should be done in a future protocol. There are many non-specific substances in saliva such as mucin, agglutinins, lysozymes, lactoferrin and salivary peroxidases (Breivik *et al.*, 1996), which might have their composition or even their quantity modulated by stress (Bosch *et al.*, 2003). These proteins might have been used as a substratum for bacteria, probably inducing increases in VSC concentration.

The increases in oral VSC concentration induced by the anxiogenic situation of the VRSCWT would appear to confirm that breath malodor may be caused by stress and anxiety and could occur in individuals that demonstrated relatively favorable periodontal conditions without tooth decay and tongue coating. Furthermore, it is frequently speculated that such patients might be diagnosed as having delusional halitosis, such as halitophobia (Ansai and Takehara., 2005), if the presence of stress is not confirmed. It is generally recognized that breath malodor can be sufficiently treated by treating periodontal diseases and tongue coating. However, dentists should also be aware that stress and anxiety may induce changes in the oral microbiota and saliva production that could be related to breath malodor development.

Acknowledgements

We thank the volunteers for their dedication and FAPESP for its support (proc. 04/06298-2). CMC was recipient of FAPESP fellowship (proc. 03/11592-4). The authors thank Margery Galbraith for editing the English of the manuscript.

REFERENCES

- Ansai, T., Takehara, T., 2005. Tonsillolith as a halitosis-inducing factor. *British Dental Journal* 198 (5), 263-264.
- Bakke, M., Tuxen, A., Thomsen, C.E., Bardow, A., Alkjaer, T., Jensen, B.R., 2004. Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology* 50 (6), 383-392.
- Beck, A.T., Steer, R.A., 1990. *Manual for the Beck Anxiety Inventory*. San Antonio, TX: Psychological Corporation.
- Bosch, J.A., De Geus, E.E., Ring, C., Nieuw Amerongen, A.V., Stowell, J.R., 2004. Academic examinations and immunity: academic stress or examination stress? *Psychosomatic Medicine* 66 (4), 625-626.

- Bosch, J.A., de Geus, E.J., Ligtenberg, T.J., Nazmi, K., Veerman, E.C., Hoogstraten, J., Amerongen, A.V., 2000. Salivary MUC5B-mediated adherence (ex vivo) of *Helicobacter pylori* during acute stress. *Psychosomatic Medicine* 62 (1), 40-49.
- Bosch, J.A., Turkenburg, M., Nazmi, K., Veerman, E.C., de Geus, E.J., Nieuw Amerongen, A.V., 2003. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosomatic Medicine* 65 (2), 245-258.
- Breivik, T., Thrane, P.S., Murison, R., Gjermo, P., 1996. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *European Journal of Oral Science* 104 (4 Pt 1), 327-334.
- Carroll, D., Ring, C., Shrimpton, J., Evans, P., Willemsen, G., Hucklebridge, F., 1996. Secretory immunoglobulin A and cardiovascular responses to acute psychological challenge. *International Journal of Behavioral Medicine* 3 (3), 266-279.
- Kurihara, E., Marcondes, F.K., 2002. Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress* 5 (4), 295-298.
- Leite, J.R., Seabra, M.L., Sartory, V.A., Andreatini, R., 1999. The video-recorded Stroop Color-Word Test as a new model of experimentally-induced anxiety. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 23(5), 809-822.
- Manolis, A., 1983. The diagnostic potential of breath analysis. *Clinical Chemistry* 29 (1), 5-15.
- McCartan, B.E., Lamey, P.J., Wallace, A.M., 1996. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 25 (7), 357- 9.
- McNair, D.M., Frankenthaler, L.M., Czerlinsky, T., White, T.W., Sasson, S., Fisher, S., 1982. Simulated public speaking as a model of clinical anxiety. *Psychopharmacology* 77 (1), 7-10.
- Monteiro, A.M.F., Chinellato, L.E.M., Tárzia, O., Rezende, M.L.R., 2004. Evaluation of oral and nasal odor in patients with and without cleft lip and palate: preliminary report. *Cleft Palate Craniofacial Journal* 41(6), 661-663.

- Piliard, R.C., Fisher, S., 1978. Normal humans as models for psychopharmacologytherapy. In: *Psychopharmacology: A generation of progress*, M.A. Lipton; A. Dimascio; K.F. Killam. New York, Raven Press 783-790.
- Queiroz, C.S., Hayacibara, M.F., Tabchoury, C.P.M., Marcondes, F.K., Cury, J.A., 2002. Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *European Journal of Oral Science* 110 (5), 337-340.
- Ratcliff, P.A., Johnson, P.W., 1999. The relationship between oral malodor, gingivitis, and periodontitis. A review. *Journal of Periodontology* 70 (5), 485-489.
- Rosenberg, M., Kulkarni, G.V., Bosy, A., McCulloch, C.A.G., 1991. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *Journal of Dental Research* 70 (11), 1436-1440.
- Silva, F.T., Prado, G.B., Ribeiro, L.C.G., Leite, J.R., 2004. The anxiogenic vídeo-recorded Stroop Color-Word test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. *Physiology and Behavior* 82 (2-3), 215-230.
- Springfield, J., Suarez, F.L., Majerus, G.J., Lenton, P.A., Furne, J.K., Levitt, M.D., 2001. Spontaneous Fluctuations in the Concentrations of Oral Sulfur-containing Gases. *Journal of Dental Research* 80 (5), 1441-1444.
- Tarzia, O., 2003. *Halitosis: The challenge of the cure*. Second ed. Biomedical, São Paulo.
- Tonzetich, J., 1971. Direct gas chromatographic analysis of sulfur compounds in mouth air in man. *Archives of Oral Biology* 16(6), 587-597.
- Waler, S.M., 1997. The effect of metal ions on volatile sulfur-containing compounds originating from the oral cavity. *Acta Odontologica Scandinavica* 55 (4), 261-264.
- Yaegaki, K., Sanada, K., 1992. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects with periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 27 (4 Pt 1), 233-238.



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

WHAT RIGHTS DO I RETAIN AS AN AUTHOR?

As an author, you retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. These include:

- the right to make copies of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- the right to post a pre-print version of the article on Internet web sites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites (see also our information on [electronic preprints](#) for a more detailed discussion on these points.);
- the right to post a revised personal version of the text of the final article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on the author's personal or institutional web site or server, with a link to the journal home page (on [elsevier.com](#));
- the right to present the article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article;
- **the right to include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially);**
- the right to use the article or any part in a printed compilation of works of the author, such as collected writings or lecture notes (subsequent citation of the article in the journal).

RELATED LINKS

FAQs

- [other FAQs in this category](#)

Your question not found here?

- [Submit question](#)
- [Specific contacts](#)

CAPÍTULO 3

Calil, CM, Bernardes CF, Marcondes, FK. Influência da ansiedade sobre a halitose: diferenças relacionadas ao gênero e ao ciclo menstrual.

Este artigo encontra-se em fase de redação e deverá ser submetido para publicação no periódico *Stress - The International Journal on the Biology of Stress*, após as sugestões da banca examinadora. Como a tese será disponibilizada na Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, optamos por apresentar o artigo redigido em português, para facilitar a sua consulta por estudantes e possíveis leitores em fase inicial em atividades de pesquisa.

Influência da ansiedade sobre a halitose:
diferenças relacionadas ao gênero e ao ciclo menstrual.

Calil, CM, Bernardes CF, Marcondes, FK.

RESUMO – apresentado na página 1

ABSTRACT – apresentado na página 3

INTRODUÇÃO

Halitose é uma condição anormal do hálito na qual este se altera de forma desagradável tanto para o paciente como para as pessoas com as quais ele convive (Tárzia, 2003). Devido ao grande número de pessoas atingidas, tem sido considerado um problema de saúde pública (Myazaki *et al.*, 1995; Calil *et al.*, 2006).

A halitose está relacionada à produção de compostos que contêm enxofre, produzidos por bactérias encontradas principalmente no dorso da língua (De Boever *et al.*, 1994) e também no biofilme subgengival (Hinode *et al.*, 2003). Sulfeto de hidrogênio (H₂S), metil mercaptana (CH₃SH) e dimetil sulfeto [(CH₃)₂S] são os principais compostos sulfurados voláteis (CSV) causadores do mau-hálito (Rosenberg, 1990; Rosenberg *et al.*, 1991). A quantidade de substrato presente na língua, que contribui para a formação da saburra lingual, tem um papel significativo na formação do mau-hálito, uma vez que promove o crescimento bacteriano (Coli and Tonzetich, 1992; Calil *et al.*, 2006).

Ratcliff and Johnson (1999) demonstraram a importância dos CSV na transição dos tecidos periodontais saudáveis para uma condição de gengivite e posteriormente de periodontite, fatores frequentemente associados à ocorrência de mau hálito (Rosenberg *et al.*, 1991). Porém, existem pacientes portadores de halitose, sem evidências clínicas de patologias bucais ou presença de saburra lingual e o seu tratamento representa um desafio para o cirurgião dentista. Nesse contexto, tem sido proposto que as alterações emocionais e as oscilações características do ciclo menstrual podem ser fatores coadjuvantes no desenvolvimento da halitose, porém os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não estão esclarecidos.

Neste contexto, Queiroz *et al.* (2002) demonstraram que a concentração de CSV no dia de um exame acadêmico, em alunos de graduação em Odontologia, apresentava-se aumentada quando comparada com as concentrações obtidas uma semana antes e uma semana após o exame. Kurihara e Marcondes (2002) mostraram que o estresse por imobilização aumentou a concentração de CSV em animais de laboratório. Ambos os estudos demonstraram a influência de uma situação estressante na produção de CSV. Além disso, também há evidências da influência do ciclo menstrual e da tensão pré-menstrual sobre a produção de CSV, em mulheres (Tonzetich *et al.*, 1978; Queiroz *et al.*, 2002).

A homeostasia da cavidade oral envolve relações multifatoriais complexas, nas quais o sistema endócrino também tem participação importante. (Mariotti, 1994). Cada vez mais se evidenciam ações dos esteróides sexuais não diretamente relacionada à reprodução e entre essas incluem ações na cavidade bucal (Güncü *et al.*, 2005). Acredita-se que os esteróides sexuais podem oferecer risco à saúde do periodonto à medida que influenciam a proliferação de microorganismos e/ou afetam a resposta imunológica do hospedeiro (Mealey *et al.*, 2003). Por outro lado, Koreeda *et al.*, 2005 reportam que manifestações periodontais ocorrem somente quando há um desequilíbrio tanto da cavidade oral quanto dos hormônios sexuais.

Diferenças sexuais na regulação da resposta de estresse também têm sido descritas em várias espécies, incluindo o camundongo, o rato e o homem. Estudos têm sugerido que esteróides gonadais interagem com o sistema nervoso autônomo (Magiakou *et al.*, 1997). Em vista disso, se faz necessária uma maior atenção para o gênero como uma importante variável na expressão da resposta de estresse (Silva *et al.*, 2004).

Estudos de indução experimental de ansiedade têm sido utilizados extensamente (Stoney *et al.*, 1990; Kudielka and Kirschbaum, 2003; Kirschbaum *et al.*, 2005) para avaliação das respostas de estresse em humanos. Segundo Griez (1984) para que um modelo experimental de ansiedade seja validado, ele precisa: eliciar sintomas similares aos da condição natural, apresentar os mesmos mecanismos neurobiológicos mediados da condição natural, induzir um estado reversível, ser simples, quantificável e reproduzível (Leite *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 2004).

Dentre os modelos que atendem a essas características destaca-se o Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (Seabra, 1987; Andreatini, 1999; Leite *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004), baseado no conflito entre o processamento simultâneo de dois estímulos visuais distintos: uma palavra descrevendo uma cor, escrita em cor diferente de seu significado.

Considerando que o VRSCWT é um modelo experimental de ansiedade, uma vez que inclui tanto a antecipação de uma possível falha como uma tarefa mental e não viola os princípios éticos de experimentação em seres humanos e que a relação entre halitose, ciclo menstrual e ansiedade merece ser elucidada, o objetivo desse trabalho foi estudar a influência do ciclo menstrual e da ansiedade induzida pelo VRSCWT sobre a produção dos CSV em indivíduos saudáveis, e os fatores potencialmente relacionados à esta produção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Voluntários

Após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, fizeram parte deste estudo um grupo de homens (17) e de mulheres (14), estudantes de graduação não fumantes, isentos de doença periodontal, cáries, língua saburrosa, próteses, aftas e/ou ulcerações, alterações sistêmicas e/ou naso-faríngeas e respiração bucal. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da FOP – UNICAMP (Protocolo nº 163/2003).

Particularmente para o grupo das mulheres, foram selecionadas aquelas que apresentaram regularidade no ciclo menstrual, após análise de seis meses pelo método do calendário (Tedford *et al.*, 1977; Hapidou and DeCatanzaro, 1988; Giamberardino *et al.*, 1997). Os procedimentos foram realizados em três fases do ciclo reprodutivo: pré-menstrual, menstrual e folicular. A confirmação da fase pré-menstrual foi realizada através do relato da data da menstruação, pela voluntária, após a realização dos procedimentos experimentais (Riley *et al.*, 1999). Como as mulheres foram submetidas a três avaliações, propostas nesse estudo, correspondentes às três fases do ciclo menstrual, os homens também foram submetidos a três análises, com um intervalo mínimo de 30 dias entre elas.

2.2. Procedimentos

Todos os experimentos foram realizados entre 7:00 e 7:30h da manhã. Foi solicitado aos voluntários: 1- evitar o uso de enxaguatórios bucais durante a semana anterior ao experimento, 2- evitar a ingestão de alimentos condimentados e outras substâncias contendo alho ou cebola 24 horas antes do experimento, 3- não beber ou comer por pelo menos 8 horas antes do experimento, 4- omitir a higiene bucal e evitar perfumes, shampoos, loções de banho na manhã do experimento (Tárzia, 2003).

Quando o (a) voluntário (a) compareceu ao laboratório no dia e hora pré-marcados, os procedimentos experimentais foram explicados a ele (a). Inicialmente, ele (a) preencheu o questionário *Beck Anxiety Inventory* (Anexo 4) que teve o objetivo de verificar se ele (a) foi exposto (a) a eventos estressores na última semana. Em seguida foi feita a determinação da pressão arterial e da frequência cardíaca através de um monitor digital. Após essas medidas o voluntário foi instruído a coletar saliva em um copo de plástico durante cinco minutos. Terminada a coleta de saliva, a mensuração dos CSV foi realizada através do halímetro de acordo com Queiroz *et al.*, 2002 e Tárzia, 2003. Esses procedimentos foram caracterizados como a situação “antes”. Em seguida, o voluntário foi submetido ao Vídeo-Recorded Stroop Color-Word Test. Imediatamente após a realização do teste eliciador de ansiedade, as mensurações de pressão arterial, frequência cardíaca, concentração de CSV e a coleta de saliva foram realizadas novamente e esses procedimentos foram caracterizados como a situação “após”.

2.3. Beck Anxiety Inventory (BAI; Beck and Steer, 1990) e parâmetros cardiovasculares

Beck Anxiety Inventory, um instrumento de auto-relato composto de 21 sintomas, foi utilizado para avaliação da intensidade dos sintomas de ansiedade antes da aplicação do VRSCWT. Em uma escala de 0 (“absolutamente não”) a 4 (“gravemente”), foi solicitado aos voluntários que indicassem a intensidade com que cada sintoma havia sido sentido na última semana.

A determinação da pressão arterial e frequência cardíaca foi feita utilizando-se um monitor digital (Digital Blood Pressure Monitor, *Pro Check*).

2.4. Coleta de saliva e determinação do fluxo salivar

Foi realizada 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. Parte da saliva coletada foi centrifugada, e o sobrenadante obtido foi armazenado à -20°C para posterior dosagem da concentração de cortisol salivar e determinação da concentração total de proteínas salivares.

2.5. Dosagens Bioquímicas

O cortisol salivar dos voluntários foi dosado por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o Kit DSL ACTIVE® (Castro e Moreira, 2003).

A concentração total de proteínas na saliva foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o kit comercial produzido pela empresa Bio-Rad®.

2.6 Mensuração dos Compostos Sulfurados Voláteis

A mensuração dos CSV foi realizada utilizando-se um halímetro (Halímetro-Interscan Co), de acordo com o protocolo descrito por Queiroz *et al.* (2002) e Tárzia (2003). Primeiramente foi solicitado ao sujeito permanecer com a boca fechada por um minuto. Em seguida, uma cânula de plástico foi introduzida na cavidade bucal e assim o voluntário permaneceu com a boca entreaberta (aproximadamente 1,5 cm), tendo previamente recebido orientações para não mover a língua e os lábios durante a coleta a fim de evitar que os mesmos tocassem a cânula e interrompessem a sucção do ar bucal pelo aparelho. Também foi solicitado ao voluntário que interrompesse a respiração durante a mensuração dos compostos (halimetria com respiração suspensa), porém se ele sentisse algum desconforto poderia expirar lentamente. O valor obtido foi expresso em ppb através de um monitor digital. Foram anotados os dois valores mais altos e posteriormente foi feita uma média.

2.7. Condição ansiogênica

A situação eliciadora de ansiedade consistiu em apresentar ao voluntário uma prancha contendo 100 palavras designativas de cores (azul, amarelo, vermelho, verde e violeta), dispostas em uma matriz 10x10 (Anexo 3). Cada palavra foi pintada de uma cor diferente de seu significado e apresentada em ordem aleatória. O sujeito foi orientado a ler, em 2 minutos, na seqüência apresentada, as cores visualizadas sem se importar com a palavra escrita. 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 realiza a tarefa (Silva *et al.*, 2004).

2.8. Análise estatística

Como no grupo dos homens não houve diferença significativa, para nenhuma das variáveis, entre as três etapas realizadas, os valores foram agrupados e foi feita uma média das três etapas, para as comparações com os dados correspondentes às voluntárias, nas diferentes fases do ciclo menstrual. Os dados foram analisados por análise de variância com o modelo apropriado para experimentos inteiramente casualizados, considerando-se o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Foi aplicado a todos os voluntários um questionário da escala Beck (Beck Anxiety Inventory) para avaliar se eles haviam sido expostos a situações prévias estressantes que pudessem influenciar as medidas durante a condição “basal”. Os resultados dessa avaliação estão expostos na Tabela 1. De acordo com o *Beck Anxiety Inventory* e com a classificação obtida por cada voluntário ou voluntária (Beck *et al.*, 1996) não foram detectadas alterações nos níveis basais de ansiedade nos indivíduos, já que todos apresentavam grau mínimo ou leve.

TABELA 1. Classificação dos voluntários (em porcentagem) em relação ao grau de ansiedade de acordo com o *Beck Anxiety Inventory* na situação basal.

<i>Graus de ansiedade</i>	<i>Fase Pré-menstrual</i>	<i>Fase menstrual</i>	<i>Fase Folicular</i>	<i>Homens</i>
Mínimo	100%	83,4%	91,7%	82,3%
Leve	0	16,6%	8,3%	17,7%
Moderado	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0

A concentração bucal de CSV obtida antes da aplicação do VRSCWT foi maior em mulheres nas fases pré-menstrual (PM), e menstrual (M) em comparação com mulheres na fase folicular (F) e com homens (H) (Figura 1A; PM= 124 ± 15; M=131 ± 14; F=123 ± 15; H=85 ± 15 ppb; p<0,05).

Homens submetidos ao VRSCWT apresentaram aumento na concentração de CSV (97±11ppb) em relação às medidas obtidas antes do teste (Figura 1B; p<0,05). Entretanto a aplicação do VRSCWT não causou alterações significativas na concentração bucal de CSV nas mulheres em nenhuma das fases do ciclo menstrual (Figura 1B; PM= 127 ± 17; M=142 ± 18; F=130 ± 24 ppb; p>0,05).

O fluxo salivar foi menor (p<0,05) em mulheres na fase pré-menstrual comparado com as fases menstrual, folicular e homens, antes da aplicação do VRSCWT (Figura 2A). Não houve diferença significativa nos valores de fluxo salivar entre as fases menstrual, folicular e homens (p>0,05); (PM=0,26 ± 0,04; M=0,31 ± 0,04; F=0,33 ± 0,05; H=0,40 ± 0,04 mL/min).

Após a realização do VRSCWT não houve alteração de fluxo salivar em homens e em mulheres em nenhuma das fases do ciclo menstrual (p>0,05); Figura 2B (PM=0,29 ± 0,04; M=0,31 ± 0,04; F=0,36 ± 0,06 mL/min).

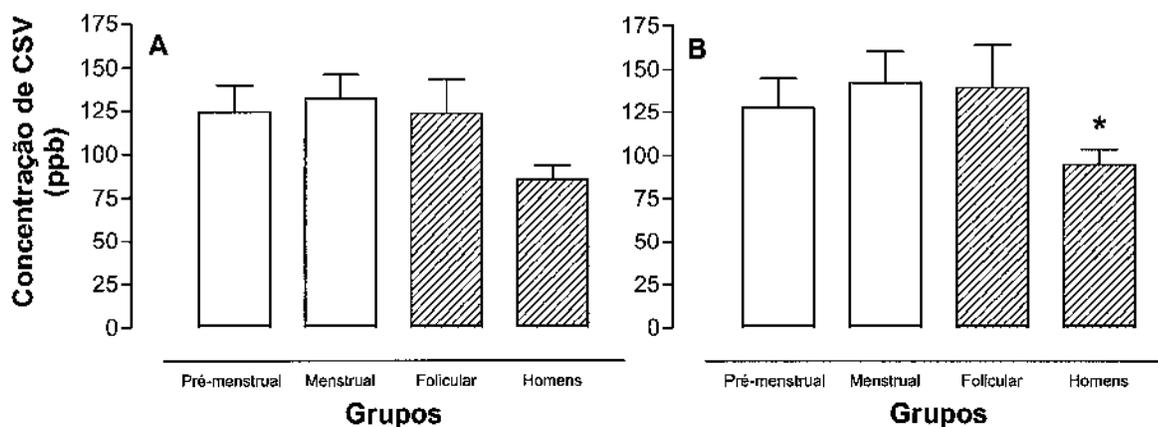


Figura 1. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e de homens, antes (A) e após (B) a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT). Barras com padrões diferentes indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada situação: antes (A) ou após (B) a aplicação do VRSCWT. *Diferença estatística em relação aos valores observados, no mesmo grupo experimental, antes do VRSCWT ($p < 0,05$). N= 17-Homens e 14 mulheres.

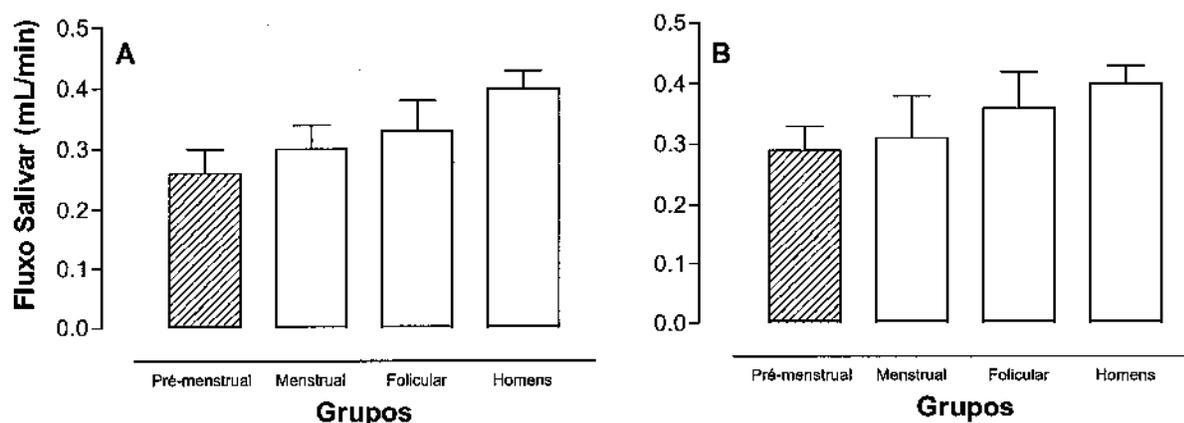


Figura 2. Fluxo salivar de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e de homens, antes (A) e após (B) a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT). Barras com padrões diferentes indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada situação: antes (A) ou após (B) a aplicação do VRSCWT. N= 17-Homens e 14 mulheres.

A concentração total de proteínas salivares foi maior nos homens em comparação com as mulheres nas três fases do ciclo menstrual ($p < 0,05$) antes da aplicação do VRSCWT (Figura 3A). A mesma não diferiu entre as fases do ciclo menstrual ($p > 0,05$); (PM=0,70 \pm 0,05; M=0,77 \pm 0,12; F=0,78 \pm 0,10; H=1,00 \pm 0,06 mg/mL).

A concentração total de proteínas não foi alterada significativamente após a aplicação do VRSCWT tanto em homens, como em mulheres nas três fases do ciclo menstrual ($p > 0,05$), Figura 3B (PM=0,71 \pm 0,06; M=0,76 \pm 0,05; F=0,71 \pm 0,06; H=1,00 \pm 0,06 mg/mL).

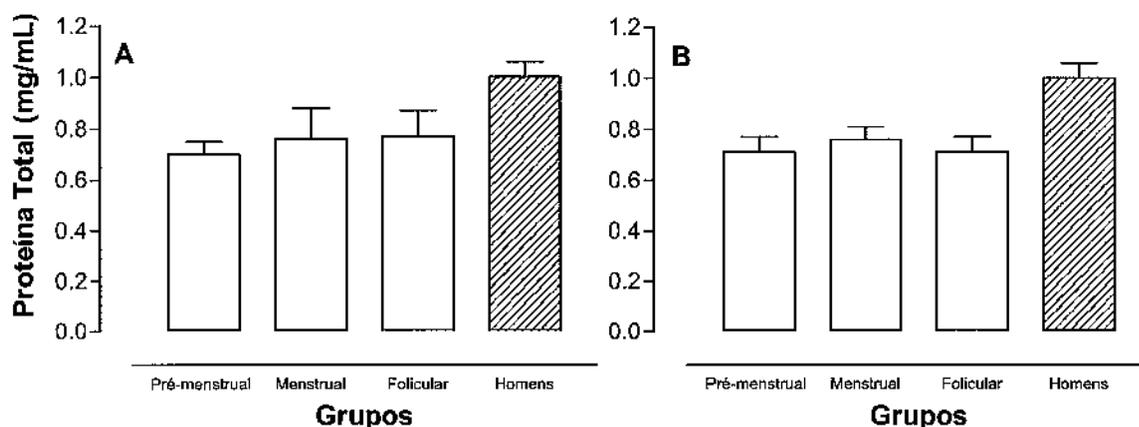


Figura 3. Concentração total de proteínas salivares de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e de homens, antes (A) e após (B) a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT). Barras com padrões diferentes indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada situação: antes (A) ou após (B) a aplicação do VRSCWT. N= 17-Homens e 14 mulheres.

Os resultados referentes às variáveis de resposta relacionadas aos padrões cardiovasculares estão expressos na tabela 2.

Na situação basal homens apresentaram valores significativamente mais altos de pressão arterial sistólica e diastólica quando comparados com mulheres nas três diferentes fases do ciclo menstrual ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos valores de pressão arterial sistólica e diastólica entre as fases do ciclo menstrual ($p > 0,05$).

Os valores de frequência cardíaca, antes da aplicação do VRSCWT, foram significativamente mais baixos em homens quando comparados com mulheres nas três diferentes fases do ciclo menstrual ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos valores dessa variável entre as fases do ciclo menstrual ($p > 0,05$).

Com relação ao efeito da situação ansiogênica, o VRSCWT induziu um aumento nos valores de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca, em relação às respectivas

medidas obtidas antes do teste ($p=0,007$) somente em homens. A aplicação do teste VRSCWT não alterou a pressão arterial sistólica, e frequência cardíaca nas mulheres em nenhuma das fases do ciclo menstrual. (tabela 2, $p>0,05$)

O VRSCWT não alterou os valores de pressão arterial diastólica, em relação às respectivas medidas obtidas antes do teste tanto em homens quanto nas mulheres em nenhuma das fases do ciclo menstrual. ($p>0,05$).

Tabela 2. Parâmetros cardiovasculares de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e de homens, antes e após a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT).

Parâmetros Cardiovasculares	Fase pré-menstrual	Fase menstrual	Fase folicular	Homens	
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	Antes	108 ± 2	110 ± 2	111 ± 2	125 ± 2 [#]
	Após	109 ± 3	111 ± 2	114 ± 5	128 ± 1 ^{**}
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	Antes	73 ± 1	72 ± 1	72 ± 1	78 ± 1 [#]
	Após	72 ± 2	72 ± 1	73 ± 2	78 ± 1 [#]
Frequência Cardíaca (bpm)	Antes	80 ± 2	77 ± 3	80 ± 3	69 ± 1 [#]
	Após	80 ± 3	78 ± 4	80 ± 3	74 ± 1 ^{**}

Médias ± EPM. # Diferença significativa em relação aos outros grupos, antes ou após o VRSCWT.

*Diferença significativa, no mesmo grupo experimental, em relação aos valores observados antes do VRSCWT. bpm = batimentos por minuto. N= 17-Homens e 14 mulheres.

Antes da aplicação do VRSCWT, mulheres na fase menstrual apresentaram níveis de cortisol salivar estatisticamente mais altos quando comparadas com as fases pré-menstrual, folicular e homens ($p<0,05$), (Figura 4A). Não houve diferença significativa nos valores de cortisol salivar entre as fases pré-menstrual, folicular e homens ($p>0,05$); (PM=1,3 ± 0,13; M=1,7 ± 0,2; F=1,5 ± 0,19; H=1,4 ± 0,07 µg/dL).

O VRSCWT não alterou significativamente os níveis de cortisol salivar em relação às respectivas medidas obtidas antes do teste tanto em homens quanto nas mulheres

em nenhuma das fases do ciclo menstrual. ($p>0,05$), Figura 4B (PM= $1,3 \pm 0,15$; M= $1,6 \pm 0,2$; F= $1,4 \pm 0,20$; H= $1,4 \pm 0,07$ $\mu\text{g/dL}$).

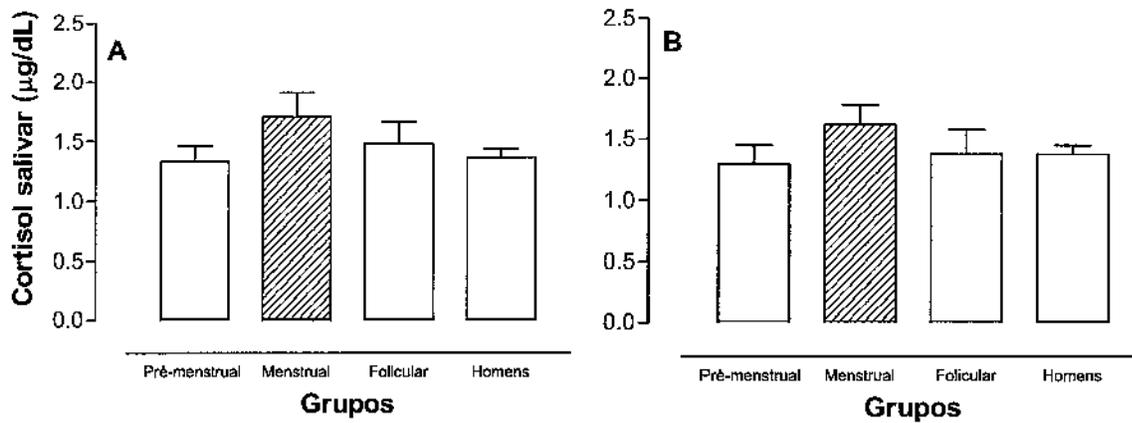


Figura 4. Cortisol salivar de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e de homens, antes (A) e após (B) a aplicação do Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT). Barras com padrões diferentes indicam diferença estatística entre os grupos dentro de cada situação: antes (A) ou após (B) a aplicação do VRSCWT. N= 17-Homens e 14 mulheres.

4. DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos, o presente estudo evidencia as diferenças sexuais presentes na condição oral dos voluntários com relação à concentração de CSV, fluxo salivar e concentração total de proteínas salivares, bem como o dimorfismo sexual existente frente a uma situação eliciadora de ansiedade.

Durante a situação basal, os níveis elevados de CSV obtidos em mulheres nas fases menstrual e pré-menstrual quando comparadas com homens e mulheres na fase folicular está de acordo com Tonzetich *et al.* (1978) e Queiroz *et al.* (2002), e poderiam estar relacionadas à progesterona.

Ao longo do ciclo menstrual, os níveis de progesterona aumentam por aproximadamente 10 dias (a partir da segunda semana do ciclo reprodutivo) e diminuem abruptamente antes do início do fluxo menstrual (Laufer *et al.*, 1982). As ações da progesterona na cavidade oral têm sido relacionadas ao aumento da permeabilidade microvascular, inibindo a taxa e o padrão de produção de colágeno no tecido gengival, aumentando o metabolismo esfoliativo, estimulando a produção de prostaglandinas e

promovendo a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (Güncü *et al.*, 2005). Além disso, o aumento nos níveis de esteróides sexuais induz um aumento no número de bactérias anaeróbicas, tal como *Prevotella intermedia* (Kornman and Loesche, 1980; Jensen *et al.*, 1981; Raber *et al.*, 1994), podendo ter um efeito no desenvolvimento e progressão da doença periodontal devido também à diminuição da capacidade fagocitária de leucócitos polimorfonucleares e concomitante diminuição da liberação de interleucina 1- β (Koreeda *et al.*, 2005).

Considerando que a produção de compostos sulfurados voláteis é devida ao metabolismo bacteriano sobre células descamadas e alimentos decompostos depositados na cavidade bucal, essas alterações bucais supracitadas poderiam estar relacionadas às variações nas concentrações dos CSV nas fases pré-menstrual e menstrual das mulheres no presente trabalho.

Embora no primeiro dia da menstruação os níveis de progesterona diminuam consideravelmente, as alterações causadas na cavidade bucal durante a fase pré-menstrual (período no qual os níveis de progesterona ainda estão altos) provavelmente se perpetuam por alguns dias, devido ao efeito residual deste esteróide já que seu principal mecanismo de ação envolve a modulação da síntese protéica, e requer horas ou dias para ser evidenciado. Vale ressaltar ainda que um aumento gradual do fluido gengival foi observado por Koreeda *et al.* (2005) em mulheres durante a fase menstrual. Esta pode ser uma das explicações pela qual o sangramento, inchaço dos tecidos gengivais e um pequeno aumento de mobilidade dental também têm sido demonstrados durante essa fase (Tilakaratne *et al.*, 2000; Machtei *et al.*, 2004).

O aumento da produção de CSV durante as fases PM e M ressalta a importância do reforço da higiene bucal nesses períodos. Lembramos que o grupo de mulheres que fizeram parte de nossa amostra possuía, como foi constatado no exame clínico, excelente condição bucal que pode ser traduzida por ausência de saburra lingual, pontos sangrantes, terceiros molares em erupção, próteses, dispositivos ortodônticos, além de um índice de placa cuja média não ultrapassou 10%. Portanto, se mesmo dentro dessas condições foi observado um aumento significativo de CSV durante as fases PM e M, as alterações bucais supracitadas associadas a processos inflamatórios pré-existentes poderiam elevar ainda

mais as concentrações de CSV. Essa pode ser uma das explicações para as queixas de mau-hálito, em determinados períodos, em pacientes do sexo feminino, mesmo na ausência de quaisquer sinais clínicos aparentes de inflamação gengival (Tonzetich *et al.*, 1978).

Os dados aqui apresentados também evidenciaram uma diminuição de fluxo salivar durante o período pré-menstrual, o que pode ter contribuído para o aumento de CSV. Nesse período ocorrem grandes alterações na relação entre as concentrações de estrógeno e progesterona e essas flutuações hormonais, combinadas com tensões emocionais (estresse e ansiedade), poderiam exacerbar sintomas de irritabilidade, mesmo em pacientes não portadoras de síndrome pré-menstrual. E devido a esse efeito, mesmo que transitório, o fluxo salivar das mulheres na fase pré-menstrual sem síndrome poderia diminuir, contribuindo para os aumentos de CSV observados. Provavelmente em mulheres portadoras de síndrome pré-menstrual essas diferenças possam ser até maiores como demonstrado por Queiroz *et al.* (2002), cujo estudo mostrou que o grupo de mulheres com síndrome pré-menstrual apresentou valores mais altos de CSV acompanhados de diminuição de fluxo salivar.

Ainda com relação aos esteróides sexuais, tem sido demonstrado que receptores de testosterona podem ser encontrados nos tecidos periodontais (Sooriyamoorthy and Gower, 1989) e que o número desses receptores tende a aumentar nos tecidos gengivais inflamados ou hiperplásicos, especificamente em fibroblastos, onde a testosterona age induzindo aumento da síntese de matriz de colágeno. Também está claro na literatura que a testosterona tem um efeito inibitório sobre a ciclooxigenase, via metabolismo do ácido aracdônico nos tecidos gengivais, inibindo a secreção de prostaglandinas. Esses resultados sugerem que a testosterona provavelmente tem um efeito antiinflamatório no periodonto (Güncü *et al.*, 2005). Assim, embora nossos voluntários não apresentassem nenhum sinal clínico de inflamação gengival, é provável que a testosterona através de mecanismos ainda não esclarecidos, possa ter contribuído, em parte, para os menores valores de CSV nos indivíduos homens quando comparado com os níveis de CSV em mulheres nas fases menstrual e pré-menstrual.

Além disso, foi observado no presente estudo, que os homens apresentaram concentração total de proteínas maior quando comparado com as mulheres, independente

da fase do ciclo reprodutivo. O papel fisiológico clássico das glândulas salivares é produzir uma secreção exócrina, a saliva, a qual é responsável pela primeira linha de defesa do trato gastrointestinal superior do indivíduo. Além de água e eletrólitos, a saliva contém muitas proteínas (mucinas, cistatinas, histatinas e lactoferrina) que previnem infecções, inflamações e doenças à medida que prejudicam o crescimento bacteriano e fúngico (Nieuw Amerongen *et al.*, 1998).

Os dados obtidos, antes da aplicação do estímulo ansiogênico, no presente estudo, sugerem que a maior concentração total de proteínas salivares encontrada no grupo dos homens poderia estar associada ao equilíbrio das condições bucais, diminuindo a produção de CSV, em relação às mulheres. Porém como em nosso trabalho não foi realizada uma análise diferencial das proteínas salivares, não é possível discutir a relação entre a produção de CSV e as funções das proteínas salivares na manutenção da homeostasia bucal.

Ainda com relação à situação basal, também foram observadas alterações sistêmicas entre as fases do ciclo menstrual e entre os gêneros, em nossos voluntários. No presente estudo as concentrações basais de cortisol salivar foram maiores em mulheres na fase menstrual quando comparadas com as fases pré-menstrual e folicular e homens. Em 2003, um estudo realizado por Kudielka e Kirschbaum utilizou também alunos de graduação, na mesma faixa etária de nossa amostra. Os autores também não encontraram diferenças significativas na concentração de cortisol salivar entre os homens e mulheres nas fases lútea e folicular. Porém, como os autores não realizaram a mensuração do cortisol na fase menstrual, a conclusão do trabalho de Kudielka e Kirschbaum foi de que não houve influência do ciclo menstrual nas concentrações basais de cortisol salivar.

Porém, quando consideramos que, no presente estudo, foram observados níveis de cortisol salivar aumentados durante a fase menstrual, constatamos que houve influência do ciclo menstrual nesse parâmetro. Portanto, apesar da literatura (Stoney *et al.*, 1990; Kirschbaum *et al.*, 1999) sobre dimorfismo sexual na atividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), situações como esta explicam parcialmente os resultados contraditórios encontrados frequentemente.

Além disso, Kudielka e Kirchbaum (2003) descrevem outros fatores que podem influenciar as concentrações de cortisol encontradas na saliva. De acordo com esses

autores, as concentrações de cortisol na saliva coletada às 9:30h da manhã são maiores em indivíduos que acordaram às 9:00h em comparação com os indivíduos que acordaram às 7:30h, ou seja, o horário do despertar dos indivíduos parece ter influência no padrão circadiano de secreção de cortisol.

Vale ressaltar que, no presente estudo, esse fator foi controlado, uma vez que todos os experimentos foram realizados no mesmo horário, pela manhã. Além disso, foi verificado que os voluntários do presente estudo, acordaram entre 6:30 e 7:00h da manhã (dados não apresentados) para estarem presentes no laboratório de pesquisa no horário pré-agendado. Os voluntários que haviam sido previamente selecionados, porém que residiam fora de Piracicaba foram dispensados dos experimentos, pelo fato do seu horário de acordar diferir dos demais voluntários. Assim, padronizou-se o horário do despertar e da coleta de saliva, para posterior dosagem de cortisol salivar.

Além disso, esta padronização do horário para os experimentos, também permitiu padronizar as medidas de CSV, que foi realizada em jejum, uma vez que atividades como beber e comer tendem a reduzir a quantidade de bactérias produtoras de CSV momentaneamente, através da limpeza mecânica da boca, estimulação do fluxo salivar e aumento do pH oral, inibindo assim o malodor oral (McNamara *et al.*, 1972; Quirynen *et al.*, 2004).

Com relação aos parâmetros cardiovasculares, foi observado que a pressão arterial sistólica e diastólica basais foram significativamente maiores no grupo de homens quando comparado com mulheres. Esses resultados estão de acordo com Christou *et al.* (2005). Como a amostra é composta de voluntários saudáveis e também normotensos essa diferença se deve provavelmente a maior massa muscular, massa corporal e volemia freqüentemente observada no sexo masculino. Por outro lado, como nas mulheres normalmente a cavidade ventricular é menor e conseqüentemente há também um menor débito sistólico, a freqüência cardíaca encontra-se aumentada devido à necessidade de ejeção por minuto de um volume sanguíneo maior (Christou *et al.*, 2005).

Embora possamos considerar que, em mulheres, as flutuações hormonais acompanhadas de estresse e ansiedade possam alterar a homeostasia bucal e com relação à halitose, aumentar a concentração de CSV, ainda não há trabalhos suficientes sobre a

relação entre esteróides sexuais, ansiedade e halitose. Diante disso, também foi nosso objetivo avaliar a influência do estado de ansiedade na produção de compostos sulfurados voláteis em mulheres nas diferentes fases do ciclo menstrual.

Com relação ao efeito da ansiedade sobre fatores relacionados à halitose, observamos que homens submetidos ao VRSCWT apresentaram aumento na concentração de CSV, na frequência cardíaca e pressão arterial sistólica, em relação às respectivas medidas obtidas antes do teste. A aplicação do teste VRSCWT não alterou a pressão arterial diastólica, o fluxo, cortisol e concentração total de proteínas salivares nestes voluntários.

O aumento da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca caracterizam os sinais de excitação simpática, em situações de estresse e ansiedade como aquela desencadeada pela realização da tarefa imposta pelo VRSCWT (Leite *et al.*, 1999). Tradicionalmente, as manifestações da ansiedade costumam ser divididas em dois tipos: manifestações subjetivas ou psíquicas e manifestações objetivas, passíveis de observação direta – sintomas de excitação autonômica (Edelmann, 1992; Bernik, 1999). Provavelmente o efeito ansiogênico foi decorrente da percepção pelo sujeito de seu desempenho no teste como uma ameaça ao seu autoconceito, à imagem que ele tem de si e a que imagina que outras pessoas (no caso os examinadores) façam dele (Seabra, 1987; Silva *et al.*, 2004). É importante ressaltar que a caracterização do VRSCWT como situação ansiogênica baseia-se no fato do indivíduo ter sido informado de que sua performance intelectual seria avaliada.

Embora não tenha sido dosada em nosso trabalho sabemos que a adrenalina é uma monoamina implicada em respostas de defesa e ansiedade e, na reação de estresse. Por exemplo, a administração de adrenalina a sujeitos saudáveis resulta em aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e uma sensação subjetiva de ansiedade (Bremner *et al.*, 1996). Após o teste nossos voluntários relataram que estavam sentindo palpitações e uma sensação desagradável, provavelmente referente ao aumento de pressão arterial e de frequência cardíaca o que confirma o VRSCWT como modelo válido de indução experimental de ansiedade.

O rápido aumento dos parâmetros hemodinâmicos (1-2 minutos) está de acordo com a ativação das vias catecolaminérgicas neuronais na resposta cardiovascular ao

estresse mental (Falaschi *et al.*, 2003). Porém, o VRSCWT não foi capaz de afetar a atividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA).

A ativação do sistema cardiovascular e a liberação de glicocorticóides são respostas primárias do sistema de estresse agudo. A íntima relação entre a medula e o córtex suprarenais reflete uma relação funcional fundamental entre o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-pituitário-suprarenal. Entretanto, Falaschi *et al.* (2003) demonstraram que, em cadetes, o VRSCWT induziu aumento de variáveis cardiovasculares, sem aumento na concentração salivar de cortisol, o que está de acordo com o presente estudo. É relevante lembrar que as respostas cardiovasculares a estímulos estressores ocorrem mais rapidamente quando comparadas com as reações de cortisol (Roy *et al.*, 1998). Talvez um estímulo estressor mais intenso ou mais longo seja necessário para aumentar a secreção deste glicocorticóide (Morris *et al.*, 1990).

Ainda, é importante ressaltar que a exposição aos diferentes tipos de estressores pode resultar em respostas fisiológicas diferentes, por exemplo, algumas podem ser caracterizadas por intensa estimulação do eixo HPA, enquanto outras podem ativar somente o sistema nervoso simpático (Kudielka and Kirschbaum, 2005).

Por outro lado, nossos dados contrastam com Sgoutas-Ench *et al.* (1994) que observaram elevação da concentração plasmática de cortisol em resposta a um teste aritmético, no qual os voluntários de melhor performance recebiam uma compensação financeira. Porém, nestes estudos, o sangue foi obtido por punção venosa e esse procedimento pode ter alterado as respostas aos testes psicossociais uma vez que, para alguns indivíduos, o medo da agulha pode ter um efeito ansiogênico.

Outra possível explicação para a ausência de aumento na secreção de cortisol após VRSCWT poderia ser a existência de uma resposta antecipatória, ou seja, a expectativa pode ter sido um estressor, *per se*, estimulando o sistema de estresse. Após a aplicação do teste indutor de ansiedade, esta resposta estaria diminuída, e por feedback negativo, os níveis de cortisol já teriam retornado ao estado basal. De fato, foi observado em nossos voluntários no primeiro dia do teste uma curiosidade com relação ao teste eliciador de ansiedade e um certo receio ao medir a concentração de CSV através do halímetro, principalmente do grupo composto pelos homens.

Além disso, o fato de nossa amostra ter sido composta somente de indivíduos com ausência de traços ansiosos pode ser uma das explicações da não ativação do eixo HPA. Kirschbaum *et al.* (1999) observaram que o estresse provocado por um exame acadêmico somente provocou aumento de cortisol ou de ACTH em indivíduos que apresentavam traços ansiosos significativos, de acordo com os questionários aplicados anteriormente ao teste. E, segundo Peteers *et al.* (2003) é possível que as respostas do eixo HPA ao estresse psicológico possam ser diferente em populações de pacientes que sofrem de transtornos de ansiedade com relação a populações constituídas de voluntários saudáveis. Os mesmos autores reportam evidências de que as respostas de cortisol salivar frente a eventos negativos foram maiores em pacientes que sofriam de transtornos psicológicos quando comparados com o grupo controle. No presente estudo, em nenhum dos voluntários foi diagnosticado níveis significativos de ansiedade, de acordo com a avaliação do Beck Anxiety Inventory, realizado minutos antes do VRSCWT, sugerindo que apesar do cotidiano de nossa amostra ser intenso, com muitas atividades acadêmicas, os alunos apresentam capacidade positiva de lidar com as situações estressantes e isso pode ter influenciado a resposta hormonal de estresse.

No presente estudo, a ansiedade gerada pelo VRSCWT aumentou a concentração de CSV em indivíduos homens saudáveis, em relação aos valores basais, sem entretanto, alterar o fluxo salivar. Estes dados confirmam trabalhos anteriores em que foi observado aumento de CSV após a apresentação de estímulos estressores em humanos (Queiroz *et al.* 2002) e em animais de laboratório (Kurihara and Marcondes, 2002). Porém ao contrário do que foi observado por Queiroz *et al.* (2002), no presente estudo, não houve diminuição do fluxo salivar.

Embora a saliva possa ser um fator influenciador da formação do mau odor oral (Tonzetich., 1977) os efeitos individuais dos componentes salivares sobre o mau hálito ainda não são totalmente compreendidos. O fluxo salivar pode ser considerado um dos fatores que pode influenciar a formação do mau odor bucal, uma vez que sua diminuição provoca uma maior retenção de células epiteliais, restos alimentares e acúmulo de microorganismos (Kojima, 1985). A redução do fluxo salivar também enfraquece os mecanismos de limpeza mecânica da cavidade oral e predispõe a microbiota bucal ao

crescimento e proliferação de microorganismos gram-negativos responsáveis pelo mau odor (Messadi, 1997). Ao contrário do que se esperava, nossos resultados mostraram que a ansiedade induzida pelo VRSCWT não alterou o fluxo salivar de nossos voluntários. Porém, segundo Shinjiro *et al.* (2003), o fluxo salivar pode não influenciar significativamente a intensidade de mau odor, se sua taxa estiver dentro dos padrões de normalidade.

Além disso, embora sejam conhecidos os 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. No teste de indução de ansiedade aplicado nesse trabalho, o fluxo salivar permaneceu inalterado após o teste, mesmo com o aumento da concentração de CSV encontrado, sugerindo que alterações bioquímicas, ainda não conhecidas, e que possivelmente foram causadas pela indução de ansiedade possam estar influenciando a formação do mau hálito bucal.

O estresse provoca alterações no equilíbrio neurovegetativo, aumentando a produção de mucina na saliva, responsável pela aderência de células epiteliais descamadas e de microorganismos sobre o dorso da língua (Bosch *et al.*, 2000). Esse aumento de substrato poderia então estar relacionado ao aumento de CSV encontrado após uma situação estressante, uma vez que CSV são produtos do metabolismo bacteriano. Isto poderia explicar o aumento de CSV observado após a aplicação do VRSCWT em voluntários homens.

Antes que a explicação acima se pareça contraditória com as explicações fornecidas na análise da concentração protéica salivar no estado basal, é necessário abordar o estudo de Levine (1993), que descreveu um complexo mecanismo para a compreensão de como as proteínas salivares funcionam como reguladoras da saúde oral: o conceito de “anfifuncionalidade” (Levine, 1993; Bosch *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2003). Esse termo é usado para denotar a observação de que proteínas salivares exibem propriedades paradoxais. Algumas dessas propriedades podem inibir a colonização microbiana, enquanto outras podem promovê-la, contribuindo assim, para a defesa do hospedeiro ou para o potencial patogênico de outros microorganismos. E esse mecanismo depende de vários

fatores, tais como o tipo específico de proteína bem como o microrganismo estudado. Por exemplo: a mucina e a lactoferrina podem ter propriedades antimicrobianas, porém, um tipo específico de mucina, a MUC5B, secretada em situações de estresse psicossocial (Bosch *et al.*, 2003), pode favorecer a colonização do *Helicobacter pylori*, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais.

Entretanto, ainda não há estudos na literatura demonstrando a associação entre alterações emocionais, secreção de proteínas que funcionem como substrato ou mesmo promovam o metabolismo bacteriano e produção de CSV. Nossos dados demonstram que a concentração total de proteínas não diferiu entre as condições antes e após a aplicação do VRSCWT, apesar dos aumentos de CSV no grupo dos homens. É possível que alterações na secreção salivar possam ter ocorrido diferencialmente nas glândulas parótidas, submaxilares e sublinguais, e tenham sido mascaradas. Diante disso, a alteração no padrão de secreção salivar mediante situações de estresse e ansiedade em indivíduos saudáveis merece ser melhor elucidada.

Com relação às mulheres, nossos resultados demonstram surpreendentemente que o VRSCWT não parece ter representado uma situação ansiogênica para o sexo feminino, independentemente da fase do ciclo menstrual, o que discorda dos resultados de Silva *et al.* (2004). Estes autores selecionaram somente a fase folicular das voluntárias para o dia do teste. No presente estudo as voluntárias realizaram o VRSCWT em três diferentes fases do ciclo menstrual. Ainda não está claro na literatura se a realização desse teste por três vezes, na mesma voluntária, poderia interferir nos resultados. É importante notar que nos voluntários homens, esses procedimentos foram repetidos também por três vezes e nossos resultados demonstram que não houve influência da repetição do VRSCWT sobre as variáveis estudadas.

Diferenças no padrão de resposta ao estresse entre homens e mulheres também poderiam explicar os diferentes efeitos do VRSCWT observados no presente estudo. Um cuidadoso estudo conduzido com 15 mulheres, que foram submetidas a estímulos estressores envolvendo discurso em público, operações aritméticas e exercícios isométricos, nas fases menstrual, folicular e lútea, não evidenciou qualquer relação entre as fases do ciclo menstrual, as respostas cardiovasculares e concentrações plasmáticas e urinárias de

catecolaminas (Stoney *et al.*, 1990). Sita e Miller (1996) também demonstraram a ausência de diferenças em parâmetros cardiovasculares, frente ao estresse, durante as fases lútea e folicular em 30 mulheres submetidas a testes que envolviam discurso em público e competições em vídeo game.

Apesar de não ter sido observado aumentos de cortisol salivar em nenhum dos grupos analisados no presente estudo, devido ao tipo de situação experimental por nós utilizado, vale ressaltar que Matthews *et al.* (2001) sugerem que as diferenças sexuais são dependentes da natureza do estressor utilizado. Por exemplo, um estudo com voluntários entre 17 e 23 anos, incluindo 26 mulheres nas fases lútea e folicular e 24 homens, mostrou que os homens exibiram uma resposta de cortisol salivar mais alta frente a desafios como matemática e testes verbais enquanto as mulheres, tanto nas fases lútea como nas fases folicular, responderam mais intensamente aos testes que envolviam a ameaça de rejeição social (Stroud *et al.*, 2002).

Considerando que o tipo de situação ansiogênica por nós utilizada é caracterizada também por um envolvimento psicossocial, já que o voluntário acredita que sua performance intelectual está sendo avaliada, seria insuficiente uma explicação exclusivamente biológica para nossos achados. Diante disso, diferenças nas variáveis psicológicas podem ser consideradas responsáveis pelos aumentos de pressão sistólica e frequência cardíaca encontrado somente no grupo de homens do presente estudo. Em outras palavras, diferenças no processamento cognitivo e emocional de um estímulo psicossocial podem alterar a atividade do sistema cardiovascular e causar diferenças nos padrões de resposta entre os sexos.

É importante notar, no presente estudo, que o teste foi aplicado por uma mulher. Assim, também existe a possibilidade de que os homens tenham tido uma tendência de interpretar o confronto mental como uma situação mais estressante pois poderiam se sentir constrangidos ou mesmo desafiados frente a uma pessoa do sexo oposto, como sugerem alguns estudos. 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 sexo oposto. Os autores sugeriram que provavelmente essa estratégia foi usada

pelos voluntários como uma tentativa de impressionar o examinador do sexo oposto. Na literatura uma série de artigos (Levine and De Simone, 1991; Robinson and Wise, 2003; Sanford *et al.*, 2003) relatam que a cultura da sociedade ocidental influenciou a determinação de comportamentos característicos para cada sexo com relação à dor. Assim o papel do homem é agir como um ser forte, pretendendo impressionar a mulher com sua habilidade em tolerar a dor enquanto que se espera da mulher uma sensibilidade aumentada que visa evocar um comportamento protetor no homem. Porém, em estudos de indução experimental de estresse e ansiedade em humanos, essa relação ainda não foi esclarecida. Segundo Stoney *et al.* (1990), já é conhecido que homens usam estratégias emocionais e cognitivas distintas das mulheres para lidar com determinadas situações aversivas. A possibilidade de que essas reações sejam dependentes do gênero do examinador, e consequentemente responsáveis por uma das explicações da diferença sexual na resposta de estresse e ansiedade, merece ser ainda melhor elucidada.

Assim, está claro que de um ponto de vista metodológico, é de suma importância considerar a determinação das fases do ciclo menstrual nos delineamentos experimentais de estudos envolvendo voluntários de ambos os sexos. A ausência da determinação das fases do ciclo reprodutivo em alguns trabalhos pode explicar porque alguns estudos não mostraram diferenças na resposta de estresse e ansiedade de acordo com o sexo (Owens *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 2001; Kajantie and Phillips, 2006).

Outra observação relevante de nosso trabalho é que nossos resultados indicam que nem sempre as oscilações hormonais características do ciclo menstrual são responsáveis pelas alterações de comportamento popularmente comentadas e encontradas nas mulheres. Deve ser considerado que a amostra desse estudo foi constituída de alunas de graduação, de uma universidade pública, onde a maioria de nossas voluntárias tem como preocupação maior os compromissos acadêmicos. Dessa forma, sugerimos que não é o ciclo menstrual isolado que propicia alterações de humor e ou desordens sistêmicas na maioria das vezes. Provavelmente é um conjunto de alterações aliadas a, por exemplo, um problema familiar, outro no trabalho, a morte de um ente querido, a perda de um emprego que desencadeiam reações de estresse que ao longo do tempo poderiam ser potencialmente deletérias para o

organismo. Assim, o ciclo menstrual parece determinar a diferença na sensibilidade a situações estressantes.

Concluindo, nossos dados sugerem que as condições hormonais distintas entre homens e mulheres parecem estar envolvidas na produção de CSV e que esse processo poderia estar associado a alterações na secreção diferencial das proteínas salivares, mas não ao fluxo salivar, e que o efeito de estímulos ansiogênicos na produção de CSV é dependente do gênero.

Agradecimentos - As autoras agradecem aos voluntários, à Patrícia de Oliveira Lima e Fernanda Bado pelo auxílio técnico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio pesquisa concedido à FKM (Processo 04/06298-2), e a bolsa concedida à CMC (Processo 03/11592-4).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreatini, R.O. (1999) Teste de cor-palavra de Stroop filmado como modelo de ansiedade induzida experimentalmente. *PhD Thesis*, São Paulo: 122p. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia – UNIFESP-EPM, 1999.
- Beck, A.T., Steer, R.A. (1990). Manual for the Beck Anxiety Inventory (1990). First ed. *Psychological Corporation, San Antonio*. 1ªEd. Chapter 1.
- Bernik, M.A. (1999) Ansiedade normal e patológica. In: *Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência (São Paulo)*, pp 59-67.
- Bosch, J.A., de Geus EJ, Ligtenberg TJ, Nazmi K, Veerman EC, Hoogstraten J, Amerongen AV. (2000) Salivary MUC5B-mediated adherence (ex vivo) of *Helicobacter pylori* during acute stress. *Psychosom Med.* 62(1), 40-9.
- Bosch, J.A., Turkenburg, M., Nazmi, K., Veerman, E.C., de Geus, E.J., Nieuw Amerongen, A.V. (2003) Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that

- evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom Med.* 65(2), 245-58.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Bremner, J.D., Krystal, J.H., Southwick, S.M., Charney, D.S. (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: Clinical studies. *Synapses.* 23, 39-51.
- Calil, M.C., Marcondes, F.K. (2006) Influence of anxiety on the production of oral volatile compounds. *Life Sci.* 79, 660-664.
- Calil, M.C., Tárzia, O. Marcondes, F.K. (2006) Qual é a origem do mau hálito? *Revista de Odontologia da Unesp*, aceito para publicação.
- Castro, M., Moreira, A.C. (2003) Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo hipófise adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 47(4), 358-367.
- Christou, D.D., Jones, P.P, Jordan, J., Diedrich, A., Robertson, D., Seals, D.R. (2005) Women have lower tonic autonomic support of arterial blood pressure and less effective baroreflex buffering than men. *Circulation.* 1, 111(4): 494-8.
- Coli, J.M., Tonzetich, J. (1992) Characterization of volatile sulphur compounds production at individual gingival crevicular sites in humans. *J Clin Dent.* 3, 97-103.
- De Boever, E.H., De Uzeda, M., Loesche, W.J. (1994) Relationship between Volatile Sulfur Compounds, BANA-Hydrolysing bacteria and gingival health in patients with and without complaints of oral malodor. *J. Clin. Dent.* 4, 114-119.
- Edelmann, R.J. (1992) Anxiety: theory, research and intervention in clinical and health psychology. *West Sussex* pp 349.
- Falaschi, P., Proietti, A., De Angelis, C., Martocchia, A., Giarrizzo, C., Biselli, R., D'Urso, R., D'Amelio, R. (2003) Effects of mental stress on cardiovascular and endocrine response in Air Force Academy cadets. *Neuro Endocrinol Lett.* 24(3-4), 197-202.
- Giamberardino, M.A., Berkley, K.J., Iezzi, S., de Bigontina, P., Vecchiet, L. (1997) Pain threshold variations in somatic wall tissues as a function of menstrual cycle,

- segmental site and tissue depth in non-dysmenorrheic women, dysmenorrheic women and men. *Pain*. 71(2), 187-97.
- Griez, E. (1984) Experimental models of anxiety: problems and perspectives. *Acta psychiatr.* 84, 511-532.
- Güncü, G.N., Tözüm, T.F., Çağlayan, F. (2005) Effects of endogenous sex hormones on the periodontium-Review of literature. *Australian Dental Journal* 50(3), 138-145.
- Hapidou, E.G., De Catanzaro, D. (1988) Sensitivity to cold pressor pain in dysmenorrheic and non-dysmenorrheic women as a function of menstrual cycle phase. *Pain*. 34(3), 277-83.
- Hinode, D., Fukui, M., Yokoyama, N., Yokoyama, M., Yoshioka, M., Nakamura, R. (2003) Relationship between tongue coating and secretory-immunoglobulin A level in saliva obtained from patients complaining of oral malodor. *J Clin Periodontol*. 30(12), 1017-23.
- Jensen, J., Liljemark, W., Bloomquist, C (1981). The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol* 52, 599-602.
- Kajantie, E., Phillips, D.I. (2006) The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 31(2):151-78.
- Kallai, I., Barke, A., Voss, U. (2004) The effects of experimenter characteristics on pain reports in women and men. *Pain*. 112 (1-2): 142-7.
- Kirschbaum, C., Kudielka, B.M., Gaab, J., Schommer, N.C., Hellhammer, D.H. (1999) Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med*. 61(2), 154-62.
- Kirschbaum, C., Wolf, O., Hellhammer, D. (2005) Adrenocortical responsiveness to psychosocial stress in humans: sources of interindividual differences. In: Krantz DS, Baum A. (Eds.), *Technology and Methods in Behavioral medicine (New Jersey)*, pp. 29-45.
- Kojima, K. (1985) Clinical studies on the coated tongue. *Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 31, 1659-1676.

- Koreeda, N., Iwano, Y., Kishida, M., Otsuka, A., Kawamoto, A., Sugano, N., Ito, K. (2005). Periodic exacerbation of gingival inflammation during the menstrual cycle. *J Oral Sci* 47 (3), 159-164.
- Kornman, K.S., Loesche, W.J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res.* 15(2), 111-22.
- Kudielka, B.M., Kirschbaum, C. (2003) Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology.* 28(1), 35-47.
- Kudielka, B.M., Kirschbaum, C. (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol.* 69(1), 113-32.
- Kurihara, E., Marcondes, F.K. (2002) Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress.* 5(4), 295-298.
- Laufer, N., Navot, D., Schenker, J.G. (1982) The pattern of luteal phase plasma progesterone and estradiol in fertile cycles. *Am J Obstet Gynecol.* 1;143(7), 808-13.
- Levine, M.J. (1993) Salivary macromolecules: a structure/function synopsis. *Ann N Y Acad Sci* 694, 11-6.
- Leite, J.R., Seabra, M.L.V., Sartori, V.A., Andreatini, R. (1999) The video recorded stroop color-word test as a new model of experimentally-induced anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiat.* 23, 809-822.
- Liu, X.N., Shinada, K., Chen, X.C., Zhang, B.X., Yaegaki, K., Kawaguchi, Y. (2006) Oral malodor-related parameters in the Chinese general population. *J Clin Periodontol.* 33(1), 31-6.
- Machtei, E.E., Mahler, D., Sanduri, H., Peled, M. (2004) The effect of menstrual cycle on periodontal health. *J Periodontol.* 75(3), 408-12.
- Magiakou, M.D., Mastorakos, G., Webster, E., Chrousos, G.P. (1997). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann. N. Y. acad. Sci* 816, 42-56.
- Marinari, K.T., Leshner, A.I., Doyle, M.P. (1976) Menstrual cycle status and adrenocortical reactivity to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology.* 1(3), 213-8.

- Mariotti, A. (1994) Sex steroids hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 5, 27-53.
- Matthews, K.A., Gump, B.B., Owens, J.F. (2001) Chronic stress influences cardiovascular and neuroendocrine responses during acute stress and recovery, especially in men. *Health Psychol.* 20(6), 403-10.
- McNamara, T.F., Alexander, J.F., Lee, M. (1972) The role of microorganisms in the production of oral malodor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 34(1), 41-8.
- Mealey, B.L., Moritz, A.J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroids hormones on the periodontium. *Periodontol 2000.* 32, 59-81.
- Messadi, D.V. (1997) Oral and nonoral sources of halitosis. *J Calif Dent Assoc.* 25. 127-31.
- Morris, M., Salmon, P., Steinberg, H., Sykes, E.A, Bouloux, P., Newbould, E., McLoughlin, L., Besser, G.M., Grossman, A. (1990) Endogenous opioids modulate the cardiovascular response to mental stress. *Psychoneuroendocrinology.* 15(3), 185-92.
- Nieuw Amerongen, A.V., Bolscher, J.G., Bloemena, E., Veerman, E.C. (1998) Sulfomucins in the human body. *Biol Chem.* 379(1), 1-18.
- Owens, J.F., Stoney, C.M., Matthews, K.A. (1993) Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. *Circulation.* 88(6), 2794-802.
- Peeters, F., Nicholson, N.A., Berkhof, J. (2003) Cortisol responses to daily events in major depressive disorder. *Psychosom Med.* 65(5), 836-41.
- Queiroz, C.S., Hayacibara, M.F., Tabchoury, C.P.M., Marcondes, F.K., Cury, J.A. (2002) Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *Eur J Oral Sci.* 110, 337-340.
- Quirynen, M., Avontroodt, P., Soers, C., Zhao, H., Pauwels, M., van Steenberghe, D. (2004) Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *J Clin Periodontol.* 31(7), 506-10.
- Raber-Durlacher, J.E., van Steenberghe, T.J.M., van der Velden, U., de Graaff, J., Abraham-Inpijn, L. (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-

- partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol* 21, 549-558.
- Ratcliff, P.A., Johnson, P.W., 1999 The relationship between oral malodor, gingivitis, and periodontitis. A review. *Journal of Periodontol* 70 (5), 485-489.
- Rosenberg, M. (1990) Bad breath, diagnosis and treatment. *Univ Tor Dent J.* 3(2), 7-11.
- Rosenberg, M., Kulkarni, G.V., Bosy, A., McCulloch, C.A.G. (1991) Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *J Dent Res.* 70 (11), 1436-1440.
- Robinson, M.E., Wise, E.A. (2003) Gender bias in the observation of experimental pain. *Pain.* 104 (1-2): 259-64.
- Roy, M.P., Kirschbaum, C., Steptoe, A. (2001) Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology* 26, 375-391.
- Riley, J.L., Robinson, M.E., Wise, E.A., Price, D.D. (1999) A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain.* 81(3), 225-35.
- Sanford, S.D., Kersh, B.C., Thorn, B.E., Rich, M.A., Ward, L.C. (2002) Psychosocial mediators of sex differences in pain responsivity. *J Pain.* 3 (1): 58-64.
- Seabra, M.L.V. Avaliação da resposta de ansiedade induzida em sujeito submetido ao “Stroop Color-Word Test”: Influência da instrução e da limitação de tempo para a realização da tarefa. (1987) *Master Thesis* (São Paulo) pp 44.
- Sgoutas-Emch, S.A., Cacioppo, J.T., Uchino, B.N., Malarkey, W., Pearl, D., Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R. (1994) The effects of an acute psychological stressor on cardiovascular, endocrine, and cellular immune response: a prospective study of individuals high and low in heart rate reactivity. *Psychophysiology.* 31(3), 264-71.
- Shinjiro, K., Shuji, A., Kenjiro, G., Eriko Kurihara, Toshihiro, A., Tadamichi, T. (2003) Low salivary flow and volatile sulfur compounds in mouth air. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 96, 38-41.

- Silva, F.T., Prado, G.B., Ribeiro, L.C.G., Leite, J.R. (2004) The anxiogenic video-recorded Stroop color-word test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. *Physiol and Behav.* 82(2-3), 215-230.
- Sita, A., Miller, S.B. (1996) Estradiol, progesterone and cardiovascular response to stress. *Psychoneuroendocrinology.* 21(3), 339-46.
- Sooriyamoorthy, M., Gower, D.B. (1989) Hormonal influences on gingival tissues: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 16, 201-208.
- Stoney, C.M, Owens, J.F., Matthews, K.A., Davis, M.C., Caggiula, A.(1990) Influences of the normal menstrual cycle on physiologic functioning during behavioral stress. *Psychophysiology.* 27(2), 125-35.
- Stroud, L.R., Salovey, P., Epel, E.S. (2002) Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry.* 15;52(4), 318-27.
- Tarzia, O. (2003) *Halitose: Um desafio que tem cura.* São Paulo: Editora de publicações biomédicas, pp 228.
- Tedford, W.H. Jr., Bergquist, S.L., Flynn, W.E. (1977). The size-color illusion. *J Gen Psychol.* 97(1st Half), 145-9.
- Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A.W., Corea, S.M., Ekanayake, S.L., de Silva, M. (2000) Effects of hormonal contraceptives on the periodontium, in a population of rural Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol.* 27(10), 753-7.
- Tonzetich, J. (1977) Oral Malodor: An indicator of health status and oral cleanliness. *Int. Dent. J.* 28, 309-319.
- Tonzetich, J., Preti, G., Huggins, G.R. (1978) Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cycle. *J Int Med Res.* 6(3), 245-254.

DISCUSSÃO GERAL

A halitose ou mau hálito é um problema que tem atravessado a história e atinge diferentes culturas, sendo conhecidos relatos que remontam à história antiga, na Grécia e Roma (Morris & Read, 1949; Geist, 1956; Eourdet, 1971). Dentre suas inúmeras denominações na literatura destacam-se:

- Halitose da manhã
- Halitose pela ingestão de certos alimentos
- Halitose por língua saburrosa
- Halitose por doença periodontal
- Halitose por medicamentos
- Halitose por tabagismo
- Halitose por alterações sistêmicas

Na grande maioria dos casos, a halitose origina-se por desequilíbrios na cavidade bucal, que resultam na produção de três compostos principais: sulfidreto, metilmercaptana e dimetil sulfeto, denominados genericamente de compostos sulfurados voláteis (CSV), e que são responsáveis pelo mau hálito (Tonzetich, 1977; Rosenberg, 1990; Miyazaki *et al.*, 1995). Porém, como as denominações acima indicam, há outras causas de origem não bucal (Attia & Marshal, 1982; Preti *et al.*, 1992; Tárzia, 2003).

No capítulo 1 desta tese foram abordadas as diferentes causas envolvidas no desenvolvimento da halitose, incluindo as situações em que o paciente relata o desconforto de apresentar mau hálito, sem porém que o cirurgião-dentista encontre evidências clínicas que possam justificá-lo. Neste contexto, nos capítulos 1 e 2, discutimos evidências científicas, obtidas em animais de laboratório (Kurihara & Marcondes, 2002) e em humanos (Queiroz *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006), que têm sugerido uma possível relação entre estresse ou alterações emocionais e a produção de compostos sulfurados voláteis.

No campo da odontologia, é importante considerar que a ansiedade do tratamento dental, juntamente com as várias reações de fobia e alguns casos de pânico, constituem o estresse odontológico agudo (Fábián & Fábián, 2000). É relevante nessa discussão abordar

que o avanço das sociedades modernas tem sido um dos fatores responsáveis pelo aumento no número de diagnósticos de indivíduos com transtornos psicossociais, sendo que o estresse crônico pode resultar em disfunções temporomandibulares, desordens gustatórias, dor facial crônica, ulcerações ou inflamações recorrentes, síndrome da boca ardente e bruxismo (McCartan *et al.*, 1996; Breivik *et al.*, 1996), e halitose, tema do presente trabalho.

Para tentar elucidar melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças associadas a alterações emocionais, têm sido desenvolvidas situações experimentais de indução de estresse e ansiedade, que mimetizam condições de desafio do cotidiano. Dentre estas, pode ser citado o Vídeo Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), que foi utilizado no presente estudo (capítulos 2 e 3) com o objetivo de avaliarmos a influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual na produção de CSV. Os resultados obtidos mostraram que os homens apresentaram aumento nas concentrações de CSV após indução de ansiedade, entretanto esse aumento não foi relacionado com diminuição do fluxo salivar e alteração na concentração total de proteínas salivares. Por outro lado, em mulheres o VRSCWT surpreendentemente não induziu um estado de ansiedade. Porém, na situação basal, durante as fases menstrual e pré-menstrual houve um aumento de CSV em relação à fase folicular e homens, sem alteração no fluxo salivar e concentração total de proteínas salivares, demonstrando a influência do ciclo menstrual na produção de CSV.

É importante ressaltar que o aumento nas concentrações de CSV não parece ter ocorrido devido a outros estressores, como por exemplo, alterações no cotidiano dos voluntários. Os diferentes fatores que poderiam interferir no seu estado emocional basal dos voluntários, tais como atividades de clínica ou laboratório e provas, foram considerados, e nesses dias, os experimentos foram cancelados. Além disso, a condição bucal também foi controlada através dos exames clínicos e como explicitado anteriormente foram selecionados apenas os voluntários com excelente condição oral. Portanto, diferentemente dos estudos clínicos, essa foi uma amostra com características especiais, o que, se por um lado não reflete a realidade da prática clínica, por outro é uma condição basal ideal para avaliar os efeitos de uma situação ansiogênica bem como os efeitos das oscilações dos

esteróides sexuais na homeostasia da cavidade oral. Como, mesmo nessas condições, foram evidenciados aumentos significativos de CSV, sugerimos que provavelmente, na clínica odontológica, a associação das alterações bucais somadas a desequilíbrios hormonais e/ou alterações emocionais poderiam contribuir para um aumento ainda maior da produção de CSV.

E assim conclui-se que é necessário que o cirurgião-dentista esteja consciente da influência das alterações emocionais e do ciclo menstrual sobre a fisiologia oral, e de suas possíveis interferências no diagnóstico de alterações bucais e no tratamento odontológico.

CONCLUSÕES

- O ciclo menstrual pode influenciar a produção de compostos sulfurados voláteis.
- A ansiedade é um fator que contribui para o aumento da produção de compostos sulfurados voláteis, em homens.
- O VRSCWT não representou uma situação ansiogênica para as mulheres em nenhuma das fases do ciclo menstrual avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Andreatini R. O teste de cor-palavra de Stroop filmado como modelo de ansiedade induzida experimentalmente.[Tese]. São Paulo UNIFESP-EPM; 1999.
- Akyuz S, Pince S, Hekim N. Children's stress during a restorative dental treatment: assessment using salivary cortisol measurements. *Pediatr Dent*. 1996; 20(3): 219- 23.
- Attia EL, Marshal KG. Halitosis. *Can Med Assoc J*. 1982; 126: 128-135.
- 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.
- Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emocional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104(4): 327-334.
- Brot MD, Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT. The ansiolytic-like effects on the neurosteroid alloprenanolone: interactions with GABA_A receptors. *Eur. J. Pharmacol* . 1997; 325: 1-7.
- Carlson, NR. Anxiety disorders, autistic disorders, and stress disorders. Needham Heights: Allyn and Bacon, 1998. In: *Physiology of Behavior*.
- Castro M, Moreira AC. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo hipófise adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003; 47(4), 358-367.
- Cureton SL. Premenstrual syndrome and dentistry. *Gen Dent*. 1986; 34(5): 364-366.
- Eli I, Baht R, Kozłowsky A, Rosenberg M. The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. *Psychosom. Med*. 1996; 58(2): 156-159.
- Eourdet PM. Soins faciles pour la propete de la bouche. Paris; 1971; 104-116.
- Fábian TK and Fábíán G. Dental stress. In: FINK, G. (Ed.) *Encyclopedia of stress*. 2000; 1: 657-659.

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

- Geist H. Vom Foete ex ore in der Antiquae. *Zahnärztliche Praxis*. 1956; 7:12-13.
- Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997 Nov;21(6):791-9.
- Kurihara E, Marcondes FK. Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress*. 2002; 5(4): 295-298.
- Leite JR, Seabra MLV, Sartori VA, Andreatini R. The video recorded stroop color-word test as a new model of experimentally-induced anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiat*, 1999; 23: 809-822.
- Lindhe J, Attstrom R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res*. 1967; 2: 194, 1967.
- Lindhe J, Attstrom R, Bjorn AS. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycle. *J. Periodontal Res*. 1969; 4: 97.
- Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol. Scand*. 1963; 21: 533.
- Main DMG, Ritche GM. Cyclic changes in oral smears from young menstruating women. *Br. J. Dermatol* 1967; 79: 20-30.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Braker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of GABA receptor. *Science* 1986; 232: 1004-1007.
- McCartan BE, Lamey PJ, Wallace AM. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25: 357- 9.
- Miyazaki H, Sakao S, Katoh Y, Takehara T. Correlation between volatile sulfur compounds and certain oral health measurements in the general population. *J Periodontol*. 1995; 66(8): 679-684.
- Miller CS, Dembo JB, Falace DA, Kaplan AL,. Salivary cortisol response to dental treatment of varying stress. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79(4): 436-41.
- Morris PP, Read RR. Halitosis: variations in mouth and total breath odor intensity resulting from prophylaxis and antisepts. *J Dent Res*. 1949; 28: 324-333.
- Pratt, JA. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*. 1992; 55(2): 149-81.

- Preti G, Clark L, Cowart BJ, Feldman RS, Lowry LD, Weber E, Young IM. Non-oral etiologies of oral malodor and altered chemosensation. *J Periodontol* 1992; 63(9): 790-796.
- Queiroz CS, Hayacibara MF, Tabachoury COM, Marcondes FK, Cury JA. Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 337-340.
- Rang, HP, Dale, M M, Ritter, J M. *Pharmacology*. 3ed. Person Professional Ltd, 1995.
- Rosenberg M. Bad breath: diagnosis and treatment. *Univ Tor Dent J.* 1990; 3(2): 7-11.
- Rosenberg M, Gelemter I, Barki M, Bar-Ness R. Day-long reduction of oral malodor by a two-phase oil:water mouthrinse as compared to chlorhexidine and placebo rinses. *J Periodontol.* 1992; 63(1):39-43.
- Rosenberg M, McCulloch CA. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol.* 1992; 63(9): 776-782.
- 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): 1436-1440.
- Seyle H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature.* 1936; 138(1): 32.
- Shimura M, Yasuno Y, Iwakura M, Shimada Y, Sakai S, Suzuki K, Sakamoto S. A new monitor with a zinc-oxide thin film semiconductor sensor for the measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. *J Periodontol.* 1996; 67(4): 396-402.
- Smith SS, Gong, QH, Hsu F, Markowitz RS, French-Mullen JMH, Li X. GABA_A receptor α 4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature.* 1998; 392: 926-929.
- Sprinfeld 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): 1441-1444.
- Stroop JR. Interference in serial verbal reactions. *J. Exp. Psychol* 1935; 18: 643-661.
- Tonzetich J. Production and origin of oral malodor. *J Periodontol* 1977; 48(1): 13-20.
- Tonzetich J, Preti G, Huggins GR. Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cycle. *J Int Med Res.* 1978; 6(3): 245-254.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO

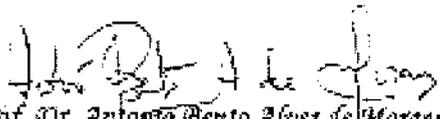


Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis", sob o protocolo nº 163/2003, da Pesquisadora **Caroline Morini Cali**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Fernanda Klein Marcondes**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP.

Piracicaba, 19 de dezembro de 2003

We certify that the research project with title "Influence of the state anxiety and menstrual cycle on volatile sulphur compounds in health subjects", protocol nº 163/2003, by Researcher **Caroline Morini Cali**, responsibility by Prof. Dr. **Fernanda Klein Marcondes**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health (Health Department - BR) and was approved by the Ethical Committee in Research of the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, December 19 2003


 Prof. Dr. Antonio Bento Aloes de Moraes
 Coordenador
 CEP/FCO/UNICAMP

ANEXO I

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações contidas neste documento têm por objetivo informá-lo (a) sobre a pesquisa intitulada “Influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis”, a ser desenvolvida pela Cirurgiã-Dentista Caroline Morini Calil, mestranda do curso de Pós - Graduação em Odontologia - área de Fisiologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), sob orientação da Prof^a Dr^a Fernanda Klein Marcondes. 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: “Influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis”.

2. Responsáveis pela Pesquisa: Cirurgiã-Dentista Caroline Morini Calil, RG 29394701-6, CPF 282188648-90, e Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, RG 4727436-2, CPF 127 890 398-44.

3. Local da pesquisa: Faculdade de odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Av. Limeira, 901, Vila Areião, CEP: 13414-900, Piracicaba - SP.

4. 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 de 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.

5. Objetivo: Estudar a influência do ciclo menstrual e da ansiedade sobre a produção bucal 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 os responsáveis pelo mau hálito.

6. Procedimentos: Serão selecionados alunos do 2º e 3º ano do curso de Graduação em Odontologia da FOP - UNICAMP. Todos os que se dispuserem a participar do trabalho serão submetidos a uma anamnese e exame clínico intra-oral. Os voluntários selecionados, um grupo de 20 mulheres e outro grupo de 20 homens, 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 esses fatores poderiam alterar a produção dos CSV. Particularmente para as mulheres o período de seleção terá início seis meses antes do experimento para a determinação da duração ciclo menstrual e de suas fases. Serão selecionadas aquelas que apresentarem regularidade no ciclo, sem a administração de qualquer anticoncepcional oral ou injetável. Primeiramente será distribuído para cada voluntária um calendário. Durante este período de seis meses, será solicitado que elas anotem mensalmente o primeiro e último dia de fluxo menstrual. Após esses seis meses serão selecionadas aquelas que apresentarem regularidade no ciclo menstrual. Em ciclos regulares, tendo-se o primeiro dia e a duração da menstruação será possível determinar a duração das fases do ciclo de cada voluntária. Assim, com base na duração média do ciclo menstrual de cada voluntária, e do relato mensal do primeiro dia de fluxo menstrual, as fases do ciclo de cada voluntária serão determinadas contando-se os dias a seguir. O experimento será realizado uma vez ao mês por um período de 3 meses, em diferentes fases do ciclo: pré-menstrual, menstrual e folicular. O período de 3 meses é justificado no fato de que o teste para indução de ansiedade (VRWST) só pode ser repetido em um intervalo de pelo menos 30 dias. Para confirmarmos a fase exata em que se encontrava a voluntária no dia do experimento, será marcado, e confirmado por ela, o dia de sua próxima menstruação.

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 esses fatores podem favorecer a produção dos CSV no hálito.

Antes e após a indução de ansiedade serão feitos dois procedimentos: coleta de saliva e medida da pressão arterial. Com as amostras de saliva nós teremos dois indicativos: fluxo e cortisol

salivar. Com isso, queremos verificar se após a indução de ansiedade e leitura dos CSV, houve alterações fisiológicas.

Inicialmente será feita a determinação da pressão arterial, por esfigmomanometria (Silverthorn, 2003), utilizando-se um estetoscópio e um esfigmomanômetro. Esta avaliação será feita 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 do coração. Em seguida, será coletado o fluxo salivar da seguinte maneira: O voluntário deglutirá a saliva nos primeiros 30 segundos e em seguida depositará a saliva produzida durante 5 minutos no recipiente. Após esses dois procedimentos, os pesquisadores irão medir a quantidade de CSV, presente na cavidade bucal antes do teste de indução de ansiedade utilizando-se um monitor de sulfeto, o hali metro. 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. A respiração será mantida inspirando-se o ar através do nariz e expirando-o pela boca. 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. São anotados os dois valores mais altos durante um minuto.

Após esses três procedimentos os voluntários responderão ao *Beck Anxiety Inventory*, um questionário amplamente validado, para avaliação do nível basal de ansiedade. É um instrumento de auto-relato, que mede a intensidade dos sintomas de ansiedade. 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. As instruções e a aplicação do questionário será feita sob supervisão de um psicólogo – Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes – Departamento de Odontologia Social da FOP/Unicamp. Posteriormente os voluntários farão o teste de indução de ansiedade. A situação eliciadora de ansiedade 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. 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 o toque de uma

campanha. 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.

Imediatamente após o teste será feita nova coleta de saliva, nova mensuração dos CSV e avaliação da pressão arterial, conforme descrição acima. A saliva coletada, tanto antes do experimento como após serão armazenadas em freezer a -70°C , até que a mensuração do hormônio e o cultivo de microorganismos sejam realizados. O cortisol salivar será dosado através de um método com enzimas.

Lembramos que nesse termo estamos fazendo uma descrição detalhada de todos os procedimentos, para que o voluntário tenha conhecimento de todos os detalhes. Porém, apesar de numerosos os procedimentos são bem simples, de duração total e máxima de 25 minutos, de fácil aplicação e durante os quais, o voluntário poderá estar fazendo qualquer tipo de pergunta que considerar relevante. Após o experimento, oferecido um café da manhã completo nas dependências do departamento de Ciências Fisiológicas.

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. Descrição apropriada dos benefícios esperados: Ele será informado da importância de sua contribuição para o aumento do conhecimento na área da halitose, e 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. Para as voluntárias, a determinação da duração do ciclo menstrual e de suas fases representará uma oportunidade para obtenção do auto-conhecimento sobre seu ciclo reprodutivo. E, para aqueles voluntários em que sejam diagnosticadas alterações bucais, durante a fase de seleção, o benefício será que os mesmos serão encaminhados para tratamento odontológico, conforme descrito no item 10, a seguir.

9. 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 VRSWCT 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 compostos por cromatografia gasosa. O método escolhido para este estudo foi o uso do halímetro porque já dispomos deste equipamento em nosso laboratório de pesquisa.

10. Indicação da forma de acompanhamento e assistência e seus responsáveis: Após a realização do exame clínico, durante a seleção dos voluntários, aqueles que apresentarem qualquer alteração bucal que requeira tratamento, serão encaminhados ao tratamento. Como os voluntários serão selecionados entre alunos de graduação da FOP - UNICAMP, estes serão informados de que como alunos da UNICAMP têm direito a tratamento odontológico gratuito no CECOM - UNICAMP, em

Campinas - SP. O telefone deste serviço lhes será informado para agendamento da consulta. E, caso no primeiro semestre de 2004, 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.

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 o tema halitose, durante o estudo, ainda que isto possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando do mesmo.

12. Informação sobre a possibilidade de inclusão de um grupo controle ou placebo: Neste estudo não estão previstos grupos controle ou placebo, no sentido de haver diferença no procedimento experimental. O próprio voluntário será controle dele mesmo, já que as análises propostas serão realizadas antes e após a aplicação do teste para indução da ansiedade. O grupo de voluntários do sexo masculino será um grupo controle, no sentido em que não apresenta variações cíclicas hormonais mensais. Porém os procedimentos a que serão submetidos não diferem daqueles a que serão submetidas as mulheres participantes do estudo, com exceção da determinação da fase do ciclo menstrual.

13. 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 ao seu cuidado.

14. 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 asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

15. 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 após a coleta de dados, será fornecido a cada voluntário, um café da manhã gratuito (café, leite, pão, queijo, presunto e requeijão), o que será uma forma de ressarcimento não em espécie. Como as avaliações serão

feitas em dias letivos, e os voluntários serão alunos da FOP, não está previsto o ressarcimento de despesas com deslocamento, já que o aluno viria normalmente à instituição para assistir as aulas.

16. Formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa: Como os procedimentos propostos não apresentam risco de danos aos voluntários, não estão previstas formas de indenização.

17. Consentimento pós-informação:

Eu, _____,
RG _____, tendo lido todas as informações acima e após receber os esclarecimento das dúvidas pela C.D. Caroline Morini Calil, de acordo com a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF, concordo em participar como voluntário da pesquisa intitulada “Influência do estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis”, e assino abaixo meu consentimento.

Piracicaba, de _____ de 200 .

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

1ª via: Voluntário 2ª via: Pesquisadoras

• Informações para contato com as pesquisadoras:

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes 3412 5380 / fklein@fop.unicamp.br.

C.D. Caroline Morini Calil 34330636 / 97360816 / carolcalil@bol.com.br

Endereço: Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) UNICAMP, Av. Limeira, 901, Vila Areião, CEP: 13414-900, 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: 13414-900, Piracicaba - SP. Telefone: 3412 5349 / cep@fop.unicamp.br

ANEXO 3

Video Recorded Word Color Stroop Test - descrição detalhada

Inicialmente o *Stroop Color Word Test* foi desenvolvido por John Ridley Stroop (1935) com o propósito de se estudar a percepção e o processamento de duas formas distintas de estímulos visuais: a palavra escrita e a cor. Essas características são capazes de eliciar conflito no examinado e o pesquisador observou que o tempo requerido para nomear a cor da tinta, na qual uma palavra era pintada, seria maior se a palavra designasse uma cor conflitante, como por exemplo a palavra azul, escrita em tinta amarela. A partir de então, esse teste passou a ser utilizado como ferramenta em outros estudos envolvendo o significado de palavras e organização de idéias.

Em 1978, Nakano *et al.* Propuseram pela primeira vez, o uso do efeito Stroop para induzir ansiedade em voluntários normais a fim de avaliar a atividade ansiolítica de fármacos. Com base nisso, Andreatini (1999) acrescentou ao SCWT a sinalização de erros, limitação de tempo e a gravação da situação em vídeo com apresentação simultânea da imagem em um aparelho de TV, denominando essa nova versão de *Video-Recorded Stroop Color-Word Test (VRSCWT)*.

O efeito ansiogênico da situação é decorrente da percepção pelo sujeito de seu desempenho no teste como uma ameaça ao seu autoconceito, à imagem que ele tem de si e a que imagina que outras pessoas façam dele, uma vez que ele acredita estar sendo avaliado (Silva *et al.*, 2004).

A situação eliciadora de ansiedade consiste em 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. O sujeito deve mencionar, na seqüência apresentada, a cor visualizada sem se importar com a palavra escrita. O tempo para a realização da tarefa é 2 minutos, e cada erro é sinalizado com o toque de uma campainha. Toda a situação do teste é monitorada por uma câmera de vídeo e apresentada simultaneamente ao sujeito, em um monitor de TV, enquanto ele realiza a tarefa.

As seguintes instruções para o teste foram reproduzidas em uma fita cassete e apresentadas ao voluntário no momento do teste: “*Vamos lhe apresentar uma lista com 5 diferentes estímulos de cor : vermelho, verde, violeta, amarelo e azul. (A sua frente você tem uma amostra destas cores.). Esta lista é constituída de uma matriz 10x10 contendo 100 palavras contidas nestas*

cores básicas. Nesta tarefa você terá que recitar somente as cores na seqüência em que são apresentadas da esquerda para direita – não leia as palavras! Cada erro cometido será sinalizado pelo toque de uma campainha. Serão considerados erros: perda de seqüência de cores, hesitação ao pronunciar a cor, e troca de cor por palavra. Toda tarefa deverá ser realizada dentro de um intervalo máximo de dois minutos. O cronômetro em frente a você indicará a passagem do tempo. Este estudo avalia a sua acuidade mental, e sua percepção de cores. Na sala ao lado, um grupo de 2 profissionais está lhe observando através do vídeo a fim de avaliar o seu desempenho. Velocidade e precisão são de fundamental importância!”

Cartão 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.

ANEXO 4 – 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 Foi muito desagradável mas pude suportar	Gravemente Difícilmente pude 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 avermelhado.				
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.

