

EDUARDO KURIHARA

***DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL PARA O
ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE E HALITOSE***

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do grau de Mestre
em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.

Piracicaba-SP

2001

i
UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CRIAÇÃO CIRCULANTE

EDUARDO KURIHARA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL PARA O
ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE E HALITOSE**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 04/02/2002

Fernanda Klein Marcondes.

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do grau de Mestre
em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes- FOP-UNICAMP

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilton de Almeida Brito

Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba-SP

2001

UNIDADE	02
Nº CHAMADA/UNICAMP	K965d
V	
TOME	48249
PAGE	16.837102
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/04/02
Nº CPD	

CM00166105-1

BIB ID 236763

Ficha Catalográfica

~~K966d~~
K965d

Kurihara, Eduardo.
Desenvolvimento de um modelo animal para o estudo da relação entre estresse e halitose. / Eduardo Kurihara. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
viii, 79f. : il.

Orientadora : Profª Drª Fernanda Klein Marcondes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia. 2. Saliva. 3. Rato. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 11 de Dezembro de 2001, considerou o candidato EDUARDO KURIHARA aprovado.

1. Profa. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES Fernanda Klein Marcondes

2. Prof. Dr. NILTON DE ALMEIDA BRITO Nilton de Almeida Brito

3. Prof. Dr. ANTONIO BENTO ALVES DE MORAES Antonio Bento Alves de Moraes

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

João Nagamassa Kurihara e Irma Geneci Nunes Kurihara

Por tudo que fizeram por nós

Aos meus irmãos

Luciana Miyo Kurihara João Fernando Kurihara e Fábio Augusto Manzano

À minha afilhada e meu sobrinho

Marjorie Kurihara Manzano e João Francisco Kurihara Manzano.

À minha namorada

Julianne Vianna Guzzoni.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Minha Orientadora “Professora” Fernanda Klein Marcondes.

Orientadora incansável, persistente, que sempre esteve presente para tudo e todos em qualquer momento demonstrando a alma do “ser” PROFESSOR. Que além de toda sua riqueza em conhecimentos técnicos e acadêmicos me ensinou, talvez sem perceber que existem muitos caminhos, e que aquele escolhido deve ser explorado. Sua determinação influenciará meu papel. Este é o objetivo de um mestrado.

À CAPES, FAPESP e FAEP pelo apoio financeiro.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

À Universidade Estadual de Maringá

Aos Professores Jaime Aparecido Cury, Cinthia Machado Tabchoury e Maria José Costa Sampaio Moura pelas sugestões apresentadas na análise do projeto de pesquisa e da versão preliminar desta tese.

Aos Professores Marcelo Alves Pereira e Gláucia Maria Bovi Ambrosano pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Fábio José Bianchi, Carolina de Oliveira, Fernanda Ribeiro pelo auxílio na realização dos experimentos.

À Salete Gaziola pelo auxílio na aprendizagem da metodologia.

À Mitsui por ter me aconselhado no período pré mestrado

Aos amigos e irmãos de convivência em Piracicaba
Ricardo, Zavaneli, Élcio, Raphael, Mauro e Fabricio.

Aos meus amigos Professores de Maringá Marly, Pucca, Hélio, Rachel, Conrado,
Mariliani, Erivelto Goulart e Márcia Moraes Tavares (PPG-UEM).

À Lena por ter segurado as pontas todo este tempo.

À minha turma de mestrado e meus amigos
Dany, Ana, Daniela, Leonardo, Alexandre, Marcelo e Franco

À Shirley, Feliciano, Kelly e Daniele da Fisiologia

A aqueles que compreenderam e aos que por seus motivos também não
compreenderam minha ausência.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1. Halitose	07
2.2. Estresse	12
2.3. Estresse e envelhecimento	16
2.4. O estresse e a homeostasia bucal	19
2.5. Modelos animais para estudo do estresse	24
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Delineamento experimental.....	30
4.2. Animais.....	31
4.3. Estresse por natação.	32
4.4. Estresse por imobilização.....	33
4.5. Medida dos compostos sulfurados voláteis.....	34
4.6. Avaliação da secreção salivar.....	36
4.7. Avaliação do nível de ansiedade.....	37
4.8. Fármacos e reagentes	39
4.9. Análise estatística	39
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

Embora a halitose seja freqüentemente associada a condições bucais ou a doenças sistêmicas, o estresse também tem sido proposto como um agente etiológico do mau hálito. Visto que a halitose pode ser medida pela determinação dos níveis de compostos sulfurados voláteis (CSV) e que a idade influencia a resposta ao estresse, o objetivo deste estudo foi investigar as concentrações bucais de CSV em ratos de laboratório, adultos jovens e adultos, submetidos ao estresse por 15 sessões repetidas de 2 h de imobilização (n=13). Ratos adultos jovens e adultos controles também foram utilizados. Os níveis de CSV foram determinados com um halímetro, imediatamente antes, imediatamente depois, 1 h e 3 h após as sessões de imobilização no 1º, 2º, 3º, 4º, 8º, 10º, 12º e 14º dias. No 15º dia, alguns animais de cada grupo (n=5/grupo) foram anestesiados (tiopental 40 mg/Kg i.p.) para coleta de saliva. A secreção salivar foi estimulada com pilocarpina (10 mg/Kg i.p.), e o volume de saliva foi usado para determinação do fluxo salivar. O pH e concentração protéica também foram medidos. Outros ratos de cada grupo (n=7-8/grupo) foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado para medir seus níveis de ansiedade. Na primeira medida/dia, ratos adultos apresentaram concentrações mais altas de CSV comparados com os ratos jovens. Este efeito foi independente do estresse. Imediatamente e 1 h após as sessões de imobilização, ratos adultos mostraram maiores concentrações de CSV do que ratos adultos jovens estressados, sem diferenças nos grupos controles.

Ratos adultos controles apresentaram diminuição na secreção salivar, e aumento do pH salivar, sem alteração da concentração total de proteínas na saliva em relação a animais adultos jovens controle. O estresse induziu uma queda no fluxo salivar somente em animais adultos jovens, sem alteração em ratos adultos. O nível de ansiedade foi maior em adultos do que em adultos jovens, ambos ratos controle e estresse. O modelo experimental usado neste estudo poderia ser utilizado como uma ferramenta complementar aos estudos sobre a relação entre estresse e halitose realizados em humanos.

ABSTRACT

Although halitosis has been frequently associated to oral conditions or systemic diseases, stress has also been pointed out as one halitosis-inducing factor. Since halitosis may be measured by the determination of the levels of oral volatile sulfur compounds (VSC) and the host age influences the stress responses, the aim of this study was to investigate the oral concentrations of VSC in young adult and adult laboratory rats submitted to 15 sessions of 2 h-immobilization (n = 13). Control young adult and adult rats were also used (n = 12). The levels of VSC were determined with one halimeter, immediately before, immediately after, 1h and 3 h after the immobilization sessions in the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 8th, 10th, 12th and 14th days. In the 15th day, some animals from each group (n = 5/group) were anesthetized (thiopental 40 mg/Kg i.p.) for saliva collection. Salivary secretion was stimulated with pilocarpine (10 mg/Kg i.p.), and the volume of saliva was used for the determination of the salivary flow rate. The saliva pH and protein concentration were also measured. Other rats from each group (n = 7-8/group) were submitted to the elevated plus-maze test in order to measure their levels of anxiety. In the first measure/day, adult rats presented higher oral concentrations of VSC compared to the young rats. This effect was independent of stress. Immediately and 1 h after the immobilization sessions, adult rats showed higher oral concentrations of VSC than young adult stressed animals, without differences in the control groups. Stress induced an increase in the VSC at the 2nd, 4th, 12th and 14th days. Control adult rats presented a decrease in the salivary flow rate and

an increase in the salivary pH, without changes on the total protein concentration compared to the control adult young animals. Stress induced a decrease in the salivary flow only in adult young rats, without changes in adult animals. The level of anxiety was higher in adult than adult young animals, both in control and stressed rats. The results showed that the host age and stress influence the oral VSC levels from laboratory rats. This animal model could be used as a complementary tool for studies on the relationship between stress and halitosis performed in humans.

1. INTRODUÇÃO

Halitose refere-se a uma alteração do hálito de origem local ou sistêmica caracterizada pela emissão de odores fétidos da cavidade oral. Um grau de mau odor (halitose) é comum em pessoas saudáveis, principalmente após o sono (SCULLY *et al.* 1994). Entretanto muitas pessoas relatam que apresentam halitose de maneira contínua e que a mesma interfere na sua autoconfiança, na sua vida social e no desempenho de suas atividades profissionais (BOGDASARIAN, 1986; ELI *et al.*, 1996). 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), os quais representam os principais componentes do odor desagradável oral e podem ser medidos por meio de monitores de sulfetos (MIYAZAKI *et al.*, 1995; WALER, 1997a, b).

A halitose é causada por condições originadas de má higiene oral, placa dental, saburra lingual, doenças periodontais ou das características dos alimentos consumidos (TONZETICH, 1977; ATTIA & MARSHALL, 1982; KLEINBERG & WESTBAY, 1992; ELI *et al.*, 1996, AMIR *et al.*, 1999) ou doenças sistêmicas (PRETI *et al.*, 1992). Sintomas psicopatológicos e o estresse também têm sido propostos como fatores que induzem o aparecimento da halitose (ELI *et al.*, 1996).

Estresse é a resposta do organismo a estímulos aversivos ambientais, físicos, psicológicos e sociais, ou a situações desconhecidas que possam

ameaçar a sua homeostasia (SELYE, 1936; PICKERING, 1981; GRIFFIN, 1989; CHROUSOS & GOLD, 1992). Várias características do indivíduo, tais como o sexo, ciclo reprodutivo, características genéticas e a idade podem influenciar a reação de estresse (RIEGLE, 1973; BÁNKY *et al.*, 1994; HORAN, 2000). Com relação à idade, ainda não está claro se os estressores aceleram o processo de envelhecimento, ou se o envelhecimento é que afeta a resposta aos estressores.

O estresse permite a adaptação do indivíduo à nova condição (SAPOLSKY, 1990). Porém, se a reação de estresse é mantida por muito tempo e/ou se a adaptação do organismo ao estímulo estressor não ocorre, há diminuição na atividade do sistema imunológico e sintomas patológicos podem ser observados (GRIFFIN, 1989).

Neste contexto, vários estudos mostram que o estresse e a ansiedade podem alterar a homeostasia bucal, induzindo alterações (McCARTAN *et al.*, 1996; BREIVIK *et al.*, 1996) que podem propiciar o aumento na concentração dos CSV na cavidade oral.

Nossa proposta neste trabalho foi avaliar a relação entre estresse e halitose em ratos de laboratório. E como a idade é um importante fator que influencia a reação de estresse, também avaliamos sua influência sobre a produção de CSV em animais submetidos a estresse por imobilização.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HALITOSE

Halitose é um termo geral que denota um odor desagradável proveniente de causas fisiológicas e patológicas de fontes bucais ou sistêmicas (TONZETICH,1977). Também denominada de mau odor bucal, ou *fetor ex ore*, é uma queixa comum que pode periodicamente afetar a maioria da população adulta embora algumas crianças também apresentem mau-hálito (AMIR *et al.*, 1999).

Na grande maioria dos casos o mau odor bucal se origina da cavidade oral como resultado do metabolismo microbiano (ROSENBERG, *et al.*, 1992; TONZETICH & CARPENTER,1971), principalmente no dorso posterior da língua e no periodonto (YAEGAKY & SANADA, 1992). As bactérias gram-negativas da microbiota bucal agem sobre aminoácidos que contêm enxofre, produzindo compostos sulfurados voláteis (CSV), os quais representam os principais componentes do odor desagradável oral (MIYAZAKI *et al.*, 1995; WALER, 1997a, b).

A halitose pode surgir por várias condições bucais (TONZETICH,1977; ROSENBERG,1995) e não bucais (GREENMAN, 1999), tornando-se acentuada quando processos inflamatórios e degenerativos estão presentes. Em 56 a 85% dos casos, a halitose é causada por condições orais originadas de má higiene oral, placa dental, saburra lingual, doenças periodontais e de características dos

alimentos consumidos (TONZETICH, 1977; ATTIA & MARSHALL, 1982; KLEINBERG & WESTBAY, 1992; ELI *et al.*, 1996, AMIR *et al.*, 1999).

As etiologias não bucais podem incluir as condições do trato respiratório superior e inferior, desordens gastrointestinais e neurológicas, o uso de certas drogas (ATTIA & MARSHALL, 1982) e doenças sistêmicas. Entre estas podemos citar a cirrose hepática, o diabetes e as doenças renais, que podem gerar a produção sistêmica de compostos voláteis que se manifestam por meio da halitose (PRETI *et al.*, 1992). Além disso, sintomas psicopatológicos e o estresse também têm sido propostos como fatores que induzem o aparecimento da halitose (ELI *et al.*, 1996).

Entre os pacientes que procuram cuidado profissional para o tratamento da halitose, podemos encontrar indivíduos que apresentam realmente mau-hálito e aqueles que, embora apresentem produção de CSV semelhante àquela de indivíduos saudáveis, acreditam que seu hálito é ofensivo (halitose imaginária). Isto tem sido descrito como uma somatização de alguma aflição psicológica resultando na crença de que um odor fétido emana de alguma parte do corpo, usualmente da boca (RICHTER, 1996).

Estudos sobre a etiologia do mau odor bucal mostram que sulfeto de hidrogênio (H_2S), metilmercaptana (CH_3SH), e dimetilsulfeto (CH_3SCH_3), coletivamente se referem aos compostos sulfurados voláteis (VSC), principais componentes no mau-hálito (TONZETICH, 1977; RICHTER, 1996). Estes gases

são produzidas por microrganismos presentes no biofilme da língua, dentes e periodonto. A superfície do dorso posterior da língua é considerada o principal local de produção, gerando até 60-70% dos CSV (YAEGAKI & SANADA, 1992; ROSENBERG, 1995; RICHTER, 1996).

No caso das etiologias não bucais, correspondente a menos de 20% dos relatos de halitose, os CSV podem se originar da absorção dos alimentos ou de uma desordem metabólica do hospedeiro (PRETI *et al.*, 1992). Nestes casos, os compostos voláteis são produzidos pelo organismo e estão presentes no sistema circulatório antes de serem secretados na saliva ou excretados pelos pulmões (GREENMAN, 1999).

Os aminoácidos que contêm enxofre - cisteína, cistina, e metionina - favorecem a formação de pelo menos dois dos mais proeminentes gases voláteis na mistura do mau odor, o dimetilsulfeto e a metilmercaptana (KLEINBERG & WESTBAY, 1992; TONZETICH & McBRIDE, 1981). A ação de bactérias gram-negativas sobre substratos ricos em cisteína produz altos níveis de sulfeto de hidrogênio, enquanto CSV produzidos a partir da metionina são ricos em metilmercaptana (TONZETICH & McBRIDE, 1981; RICHTER, 1996).

A principal fonte de aminoácidos contendo enxofre são as células epiteliais às quais as bactérias da cavidade bucal estão aderidas, e as proteínas provenientes da hidrólise bacteriana (FOSDICK & PIEZ, 1953). Foi demonstrado que a saliva total incubada produz um odor pútrido, e que o sobrenadante da

saliva filtrada produz muito pouco CSV. O filtrado mostrou conter células epiteliais mortas, bactérias mortas e vivas, células brancas, e outros elementos do sangue, e restos alimentares, todos ricos em proteínas, peptídeos, e aminoácidos livres (TONZETICH, 1977). Os mau odores voláteis produzidos pela saliva total incubada envolvia atividade bacteriana anaeróbia sobre aminoácidos contendo enxofre derivados da degradação de proteínas derivadas do filtrado salivar. McNAMARA *et al.* (1972) observaram também que a saliva incubada de pacientes com doença periodontal produziu maiores níveis de CSV.

O pH bucal atua como um indicador na oxidação dos aminoácidos que se faz em pH um pouco acima de 5.5 (KLEINBERG & WESTBAY, 1992). McNAMARA *et al.* (1972) concluíram que a produção de mal odor na boca cessa quando o pH salivar encontra-se abaixo de 6,5.

Existe uma correlação entre a produção de CSV e doença periodontal e/ou saburra lingual. A halitose pode ser causada pela saburra lingual em jovens, ou pela saburra lingual associada a doença periodontal em grupos velhos. Porém a idade em si não é um fator determinante para a produção de CSV (MYAZAKY *et al.*, 1995).

A mensuração dos CSV pode ser realizada por meio de avaliação organoléptica do ar emanado da cavidade oral (TONZETICH, 1977; ROSENBERG *et al.*, 1992) ou por meio da análise da saliva coletada e incubada *in vitro* (TONZETICH *et al.*, 1967; KLEINBERG & WESTBAY, 1990). Os CSV podem ser

quantificados por cromatografia gasosa (TONZETICH *et al.* 1978; TONZETICH & McBRIDE, 1981) ou por meio de um monitor de sulfetos (ROSENBERG, 1990).

O método mais simples é o exame organoléptico em que o ar é expelido da boca, e avaliado diretamente pelo olfato. Este método pode ser considerado uma referência da medida do mau-hálito. Esta abordagem simula as situações do dia a dia nas quais o mau-hálito é detectado (TONZETICH, 1977). Porém, existe uma variação considerável entre os analisadores no resultado de uma mesma leitura. Influências psicológicas e/ou fisiológicas dos próprios analisadores causam dificuldades numa avaliação correta (ROSENBERG & McCULLOCH, 1992).

As principais vantagens da medida de CSV por cromatografia gasosa são a separação e quantificação individual dos gases e a capacidade de medir baixas concentrações dos mesmos. Entretanto as principais desvantagens são o custo relativamente alto, a necessidade de pessoal qualificado, a necessidade de espaço físico para instalação do equipamento e o tempo requisitado para detecção e medidas (ROSENBERG & McCULLOCH, 1992)

O pequeno tamanho e simplicidade de manuseio dos monitores de sulfeto podem capacitar seu uso na rotina e no campo de pesquisas da halitose (SHIMURA *et al.*, 1996). Nos últimos anos, alguns sensores foram desenvolvidos. Um deles tem um eletrodo com uma película de ouro (Jerome 631-X analyser, Arizona Instruments Corporation, Phoenix, Arizona, US.) que detecta

especificamente sulfeto de hidrogênio e é extremamente sensível abaixo de 1 ppb (partes por bilhão). Outro instrumento utilizando um sensor de óxido de zinco também foi desenvolvido. Um sensor amperométrico baseado em um eletrodo de carbono, modificado pela inclusão de cobalto como um eletrocatalisador, tem sido desenvolvido com a vantagem de não ser afetado pela mistura ou pela presença de moléculas que possam interferir em outros tipos de leitura (GREENMAN, 1999).

Também foi desenvolvido o halímetro que é amplamente utilizado e que usa um sensor voltamétrico sensível à sulfeto. As vantagens do uso deste monitor de sulfetos são o baixo custo, a não exigência de pessoa especializada para sua operação, o fato de ser portátil e a rápida obtenção de resultado das leituras. As principais desvantagens são a incapacidade de distinguir os sulfetos, a impossibilidade de obtenção das medidas na presença de altos níveis de etanol e óleos essenciais e a perda de sensibilidade com o tempo, necessitando de recalibração periódica (ROSENBERG & McCULLOCH, 1992)

2.2. ESTRESSE

A compreensão do termo estresse está baseada em experimentos de Hans Selye datados do início do século XX. Pesquisando os efeitos de um extrato químico, este pesquisador observou o desenvolvimento de úlceras gastrointestinais, atrofia do sistema imune e aumento das glândulas adrenais em

ratos. Para sua surpresa, entretanto, os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeção de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções. Encontrou o mesmo resultado expondo animais ao frio, a patógenos, a toxinas ou ao barulho (SELYE, 1936; SAPOLSKY, 1990). Como a resposta biológica aos diferentes estímulos parecia ser independente das características do estímulo estressor, Hans Selye enfatizou a inespecificidade da etiologia do estresse (SZABO & GLAVIN, 1990).

Muitas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização das respostas a estímulos aversivos ou desconhecidos (VAN DER KAR *et al.*, 1991). O sistema límbico, ao ser estimulado, age sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal. A resposta consiste de secreção elevada do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise, levando ao aumento na liberação dos glicocorticóides pelo córtex da adrenal (AXELROD & REISINE, 1984; VAN DER KAR *et al.* 1991; KOOB, 1999). Simultaneamente, ocorre ativação do eixo sistema nervoso simpático – medula adrenal, o que resulta em aumento dos níveis plasmáticos das catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (CANNON *et al.*, 1927; AXELROD & REISINE, 1984; NATELSON *et al.*, 1988; KOOB, 1999). Quanto às respostas metabólicas ao estresse, a persistência de um estímulo estressante causa proteólise muscular, enquanto no fígado a síntese de uma série de proteínas plasmáticas conhecidas como reagentes da fase aguda é induzida (HORAN *et al.*, 2000).

O conceito de Selye de uma reação geral e inespecífica foi modificado para refletir as diferenças nos padrões de respostas a diferentes estressores, e o papel das características do hospedeiro. MASON (1968b) mostrou que estressores como o calor, a aceleração e o exercício moderado, em certas condições, podem não provocar um aumento na atividade do córtex adrenal. Além disso, o aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina apresentam intensidades diferentes que dependem das características do estressor (MASON, 1968b).

A natureza inespecífica da reação de estresse foi então revista por diferentes autores, segundo os quais, a intensidade da resposta obtida varia com a qualidade e intensidade do agente estressante (MASON, 1968a, 1968b) e fatores individuais tais como características genéticas (MARPLE *et al.*, 1972), sexo (LESCOAT *et al.*, 1970; ANISHCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993), fase do ciclo reprodutivo (SHORS *et al.*, 1998; POPOVIC & POPOVIC, 1999) e idade (RIEGLE, 1973; BÁNKY *et al.*, 1994). Entretanto, o fator mais importante parece ser a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH, 1988; GRIFFIN, 1989).

Embora a reação de estresse possa resultar em doenças, é ela que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos frente aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos (FRASER *et al.*, 1975;

CHROUSOS & GOLD, 1992; KOOLHAAS *et al.*, 1999), e pode ser dividida em três fases: a fase de alarme ou excitação ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, e caracteriza-se por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor. Se o estímulo for mantido, a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos (fase de resistência). Quando essa adaptação não ocorre, desenvolve-se a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se susceptível a distúrbios renais, cardiovasculares, gastrointestinais e/ou imunológicos (SELYE, 1936).

CANNON (1927) elucidou os mecanismos para manutenção dos parâmetros fisiológicos dentro dos limites toleráveis apropriados e definiu o termo homeostase para descrever o estado estável mantido por esses mecanismos. A reação de estresse visa a manutenção da homeostase (KOPIN, 1995) e tem sido fundamental para a seleção natural, aumentando a capacidade de sobrevivência dos organismos (NESSE & YOUNG, 2000).

A importância da resposta ao estresse se traduz na descrição de Hans Selye “ como a síndrome geral da adaptação”. Apesar do conhecimento antigo sobre seus benefícios no meio acadêmico, a idéia do estresse na imaginação popular tende a enfatizar seus perigos. Assim o valor fundamental da utilidade da resposta ao estresse é freqüentemente esquecido. Assim como a dor, febre, vômito, tosse e inflamação, o estresse é visto mais como um problema médico, embora compreenda reações úteis que servem de proteção ao organismo (NESSE & YOUNG, 2000).

O sistema nervoso autônomo possui duas divisões. O sistema simpático, o qual é ativado como parte da resposta ao estresse aumentando a atenção, a pressão sanguínea, a frequência cardíaca, os movimentos respiratórios, e a atividade física. Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático, que é responsável pela inibição da atividade muscular, armazenamento de energia, e direcionamento do sangue para digestão e reparo corpóreo, na reação ao estresse tem sua atividade inibida (NESSE & YOUNG, 2000).

2.3. ESTRESSE E ENVELHECIMENTO.

O envelhecimento freqüentemente se refere às mudanças progressivas que ocorrem durante a vida adulta, muitas das quais são deletérias (HORAN *et al.*, 2000). E os efeitos dos estressores parecem se sobrepor às mudanças consideradas características do envelhecimento. Existe um pequeno aumento na secreção do hormônio adrenocorticotrófico e cortisol plasmático durante o envelhecimento humano. A concentração de noradrenalina, a qual é derivada dos terminais nervosos assim como da medula da adrenal, tende a aumentar enquanto que a secreção de adrenalina não se modifica. Existe também uma diminuição da secreção de hormônio do crescimento, principalmente à noite, sem alteração na secreção de prolactina e glucagon (HORAN *et al.*, 2000).

Quanto ao efeito do estresse psicológico no envelhecimento, um grande número de autores tem mensurado catecolaminas, mostrando que a noradrenalina, mas não a adrenalina, aumenta nas respostas frente a este tipo de estresse, assim como aumenta seus níveis basais. Em casais idosos, sendo um deles portador do mal de Alzheimer comparados com os casais de pessoas que não necessitavam de cuidados, foram encontrados altos níveis de noradrenalina naqueles que cuidavam de seus pares doentes. Porém não havia diferença na adrenalina e cortisol plasmáticos (HORAN *et al.*, 2000).

Estudos em animais de laboratório confirmam a complexa interação entre estresse e envelhecimento. As diferenças na responsividade adrenocortical para o estresse, entre grupos de ratos jovens e velhos evidenciaram a diminuição da atividade do sistema de retroalimentação negativa (“feedback”) para o controle da secreção de glicocorticóides em ratos velhos (RIEGLE, 1973). Também foi observado que o estresse crônico é mais efetivo em inibir a responsividade adrenocortical para um novo estressor em ratos jovens do que em ratos velhos. Animais velhos submetidos a estressores crônicos podem ainda manter altos níveis de corticosterona plasmática, do que os mais jovens recebendo estressores similares (RIEGLE, 1973).

MIZUNO & KIMURA (1997) verificaram o efeito do estresse por restrição em ratos jovens e velhos. Foram analisadas as concentrações de acetilcolina no hipocampo e de corticosterona plasmática. A restrição induziu uma elevação imediata e significativa de acetilcolina em ratos jovens, mas não em

ratos velhos. Quanto à corticosterona, a concentração basal em ratos velhos antes da restrição já apresentava níveis altos comparados aos jovens. Porém, após o estresse por restrição, os níveis mais altos foram alcançados pelos animais jovens, com retorno aos níveis basais duas horas após o estresse. Não houve mudanças significativas nos níveis de corticosterona na resposta ao estresse para o grupo de ratos velhos, ou seja, sem alteração nas concentrações durante e após o estresse.

Como, no envelhecimento, a retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal não ocorre de forma imediata, a secreção e as ações dos glicocorticóides se prolongam. Isto causa mudanças degenerativas nas regiões do cérebro que normalmente inibem a liberação de glicocorticóides quando estes estão em altas concentrações. Assim a degeneração do sistema nervoso central é causada pela exposição continuada a níveis elevados de glicocorticóides. Estes efeitos bidirecionais formam uma cascata com conseqüências patofisiológicas em indivíduos de idade avançada (SAPOLSKY *et al.*, 1986).

Gerontólogos há muito tempo têm interesse em compreender se o envelhecimento prejudica a capacidade de responder apropriadamente aos desafios estressantes e/ou se o estresse acelera o processo de envelhecimento. Também buscam esclarecer se diferenças individuais no enfrentamento do estresse contribuem para as diferenças no sucesso do envelhecimento. O que se sabe é que no cérebro os efeitos do estresse parecem estar centrados no

hipocampo. Esta região é rica em receptores para corticosteróides, que há muito tempo é reconhecido pela sua sensibilidade às ações dos glicocorticóides, que atuam no papel importante do aprendizado e memória (SAPOLSKY, 1999). O interesse dos gerontólogos nos glicocorticóides se faz pela exposição aumentada a estes de forma linear a partir da idade avançada, 20 meses para roedores e 70-80 anos para humanos (SAPOLSKY, 1999).

2.4. O ESTRESSE E A HOMEOSTASIA BUCAL.

O estresse odontológico mais comum e largamente conhecido é o estresse que o paciente sente durante o tratamento. A simples ansiedade do tratamento dental, as várias reações de fobia relacionadas com a odontologia e alguns casos de pânico formam o grupo do estresse odontológico agudo (FÁBIÁN & FÁBIÁN, 2000). O estresse crônico como uma condição psicopatológica do sistema nervoso pode resultar em disfunções temporomandibulares, dor facial crônica, desordens gustatórias, problemas de salivação, ulcerações ou inflamações recorrentes, algumas reações alérgicas bucais, síndrome da boca ardente, tique facial e bruxismo (FÁBIÁN & FÁBIÁN, 2000). Além destes dois tipos de estresse ainda existe o estresse da relação paciente - dentista, no que diz respeito a expectativa do resultado do trabalho e do próprio comportamento do profissional com o paciente (FÁBIÁN & FÁBIÁN, 2000).

Embora muitas condições bucais pareçam estar relacionadas a fenômenos psicológicos, o exato papel dos fatores psicológicos na etiologia de doenças bucais não é ainda bem conhecido (KAUFMAN, 1976).

Nas síndromes pré-menstruais ocorre um desequilíbrio na produção de hormônios durante o ciclo menstrual, em particular da progesterona. Muitos aspectos da síndrome pré-menstrual afetam o tratamento odontológico. A incidência de herpes simples, estomatite herpética recorrente e úlceras aftosas se torna maior neste período. Além disso, foi demonstrado que o apertamento ou ranger dos dentes é mais frequente nos períodos pré-menstruais, período em que também se evidenciam sinais de tensão ou irritação (CURETON, 1986).

A saliva tem importante papel na manutenção da homeostase bucal. A função normal de salivação é exigida para manter os tecidos duros e moles da boca, modular a microbiota oral, e auxiliar outras funções bucais. Adicionalmente, a saliva ajuda na digestão, gustação e deglutição e tem papel importante na lubrificação dos tecidos da boca e regulação do pH bucal. Os efeitos da perda ou diminuição da função salivar podem ser graves, tendo um maior impacto na qualidade de vida e atividades normais do indivíduo (MANDEL, 1989).

As funções neurológicas envolvidas com a salivação incluem impulsos aferentes, que convergem no núcleo salivar superior e inferior no bulbo, e impulsos eferentes, que alcançam as glândulas salivares via fibras parassimpáticas e simpáticas do sistema nervoso autonômico. Com exceção da

ação vasodilatadora da bradicinina e a estimulação do transporte de íon sódio e potássio pela aldosterona, o sistema nervoso autonômico é quase que totalmente responsável pelo controle fisiológico da secreção salivar (SCHUBERT & IZUTSU, 1987).

As glândulas salivares são inervadas tanto nas células acinares quanto nas células do ducto. Os resultados mais consistentes dos estudos detalhando os efeitos do estímulo autonômico na salivação no homem indicam que impulsos parassimpáticos causam secreção, usualmente serosa, e vasodilatação. O estímulo simpático causa constrição na vascularização da glândula salivar, produzindo somente pequenas quantidades de saliva mucosa. Geralmente impulsos parassimpáticos parecem ocorrer isoladamente, representando a principal estimulação reflexa da formação do fluido salivar, causando graus variáveis de exocitose do material secretório pré-formado, contraindo células mioepiteliais e causando dilatação dos vasos que irrigam a glândula salivar. Impulsos simpáticos aparentemente não ocorrem isoladamente e freqüentemente produzem efeitos sinérgicos quando ladeados com impulsos parassimpáticos. Tendem a modular a composição da saliva, usualmente para aumentar o conteúdo protéico. Induzem contração mioepitelial e mantêm ,ou aumentam, o tônus vascular (SCHUBERT & IZUTSU, 1987).

A gengiva e o periodonto são protegidos contra inflamação de várias maneiras. Em adição à proteção mecânica provenientes da fricção alimentar e pelo tamponamento pelo fluxo salivar, existem muitas substâncias anti-bacterianas

na saliva tais como lisozima, mucina, aglutinina, lactoferrina, peroxidases salivares, peptídeos ricos em histidina. A imunoglobulina A (IgA) pode oferecer proteção específica contra a colonização bacteriana na gengiva e bolsas periodontais (BREIVIK *et al.*, 1996). A IgA é o anticorpo de predominância na saliva e provavelmente o antibacteriano de maior importância na boca saudável sendo considerado não inflamatório e exclusivo em sua função (BREIVIK *et al.*, 1996).

Apesar da presença destes fatores antimicrobianos específicos e não específicos, desequilíbrios entre os microrganismos bucais e o hospedeiro ocorrem. Aumento da placa dental, rompimento da barreira epitelial, e/ou respostas alteradas do hospedeiro podem causar mudanças no ambiente destas bolsas gengivais. Tais mudanças favorecem o crescimento de microrganismos patogênicos.

Estudos tem demonstrado que o estresse emocional pode modular as repostas imunes (BREIVIK *et al.*, 1996). Em um estudo conduzido por GUHAD e HAU (1996), foi observado que animais adultos colocados dentro de uma mesma caixa apresentaram uma diminuição da síntese de IgA. Apesar do rato ser um animal sociável, estes apresentavam maior estresse do que outros animais que foram mantidos isolados ou em outro grupo em que havia uma fêmea para cada animal.

Um meio muito importante para determinar a concentração de IgA secretória é através do fluxo salivar. Situações de estresses geram pouca produção de IgA. Comparando jovens e adultos durante uma semana foi percebido que os jovens, do período da manhã até a tarde apresentavam queda na produção de IgA nos dias úteis e os idosos não sofreram variações durante a semana. Porém o fluxo salivar tanto na manhã quanto a tarde era menor nos idosos em comparação com os jovens. Em níveis basais pela manhã jovens possuem maior quantidade de IgA do que os adultos proporcionais ao fluxo salivar de cada um (MILETIC *et al.*, 1996).

Estudando a influência do estado emocional sobre o fluxo salivar em humanos GEMBA *et al.* (1996) observaram que o fluxo salivar da glândula parótida durante o período em que os voluntários estavam acordados era geralmente maior do que durante o sono. Baixa secreção salivar foi encontrada em um estado estressante (no qual o sistema nervoso simpático está mais ativo que o sistema nervoso parassimpático) em comparação com o estado relaxado. Isto sugere que os neurônios salivatórios que inervam uma glândula salivar estão sob o complexo controle do sistema nervoso central.

Em um outro estudo (MORSE *et al.*, 1981) analisando o nível de estresse de pacientes para endodontia, antes e depois da sessão de tratamento, verificou o volume salivar e quantidade de proteínas. Durante o tratamento o uso de meditação, diálogo com o paciente, técnicas de relaxamento, anestésicos e/ou analgésicos foram aplicados para diminuição da ansiedade,. Antes do tratamento,

foi observada, na maioria dos pacientes, a produção de saliva opaca indicando maior concentração de proteínas e redução do volume salivar. Após o tratamento, a saliva produzida apresentava-se translúcida indicando que houve diminuição da ansiedade, e retomada do fluxo salivar normal. Os autores relacionaram seus resultados à ativação do sistema nervoso simpático em situações estressantes (pré-tratamento) e sua inibição em momentos de relaxamento (durante e pós-tratamento).

2.5. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO ESTRESSE

Os modelos de estresse mais utilizados em animais de laboratório são a imobilização, a aplicação de choque nas patas ou na cauda, a natação, a manipulação, a exposição a ambientes desconhecidos e a odores (OTTENWELLER, 2000).

A imobilização é um modelo de estresse que consiste em imobilizar os quatro membros de um rato e colocar a cabeça em anéis de metal para impedir o seu movimento. A duração pode ser de 5 a 120 min ou mais. No protocolo do estresse crônico, os animais podem ser imobilizados a cada dia por muitas semanas ou meses. A imobilização é um estressor complexo que apresenta componentes físicos e psicológicos. A tentativa de escapar e a exaustão muscular associadas representam uma intensa forma de exercício físico. Além disso, o alcance limitado de movimento e exposição a áreas abertas são fontes de

estresse psicológicos para os ratos de laboratório (KVETŇASNKÝ, R. & McCARTY, 2000).

Um subtipo de imobilização é a restrição que consiste na limitação dos movimentos. Cada animal é colocado em um tubo plástico que seja pequeno o suficiente para impedir sua movimentação. A restrição tem como característica ser um estressor que é primariamente psicológico. O desconforto físico induzido é um fator que também influencia na forma de resposta ao estresse. A popularidade deste estressor se deve a seu baixo custo e poucas exigências técnicas. Tem sido aplicado nos estudos da neurociência, endocrinologia, fisiologia, farmacologia, psicologia e gastroenterologia (SERVATIUS, 2000).

A restrição pode ser usada como única fonte estressora ou associada a outros tipos de estressores. A duração do episódio pode afetar sua intensidade, ou seja, aumentando a duração de uma sessão de restrição aumenta o grau dos sintomas associados ao estresse. Porém, longas durações das sessões podem estar associadas com a diminuição da responsividade, ou seja, evidência de adaptação (SERVATIUS, 2000).

As respostas endócrinas, imunes e comportamentais aos estressores têm sido estudadas mais frequentemente em roedores nos quais os substratos neurais, endócrinos e imunes envolvidos na resposta ao estresse têm sido delineados (OTTENWELLER, 2000). Ratos submetidos à sessão única de 2 horas de imobilização apresentaram aumento de três a quatro vezes nos níveis

plasmáticos de corticosterona. Em resposta ao estresse repetido por imobilização, foram observados níveis plasmáticos duas a três vezes maiores deste hormônio em relação a animais controles no sétimo e décimo quarto dias (AL-MOHAISEN *et al.*, 2000).

Em estudos sobre a fisiologia do estresse, a avaliação do nível de ansiedade do sujeito experimental também é importante. A ansiedade é um estado emocional aversivo associado com a antecipação apreensiva de prováveis perigos futuros. Englobando sintomas somáticos e sentimentos de angústia, a ansiedade e medo ocupam lugares temporais distintos em relação aos eventos de ameaça. A ansiedade é tipicamente antecipatória, e o medo é produzido pelo estímulo da ameaça. Além disso, enquanto a ansiedade é freqüentemente imaginada, o medo é real (ÖHMAN, 2000).

Em roedores, o nível de ansiedade pode ser avaliado comportamentalmente pelo teste do labirinto em cruz elevado (LCE). O LCE apresenta uma altura de 50 cm, e dois braços abertos e opostos (50x10 cm), cruzados em um ângulo reto por dois braços de mesma dimensão fechados por paredes de 40 cm de altura, mas com a porção superior aberta. Uma borda de acrílico, com altura de 1 cm, envolve os braços abertos para evitar a queda dos animais (FIGURA 1).

O teste do labirinto em cruz elevado é um modelo de conflito para o rato ou camundongo, onde a curiosidade em explorar os braços abertos se opõe à

aversão gerada por espaços abertos (PELLOW *et al.*, 1985). O medo da área de braços abertos é motivado pela tigmotaxia, uma resposta de defesa natural do animal que o leva a permanecer próximo a superfícies verticais, evitando espaços abertos (GROSSEN & KELLEY, 1972; TREIT & FUNDYTUS, 1989), o que diminui a frequência de ataque de predadores. Devido a este repertório comportamental, ratos no labirinto em cruz elevado tendem a evitar os braços abertos, permanecendo por mais tempo nos braços fechados. Assim sendo, o tempo em que o animal permanece nos braços abertos está inversamente relacionado ao seu nível de ansiedade (DAWSON & TRICKLEBANK, 1995).

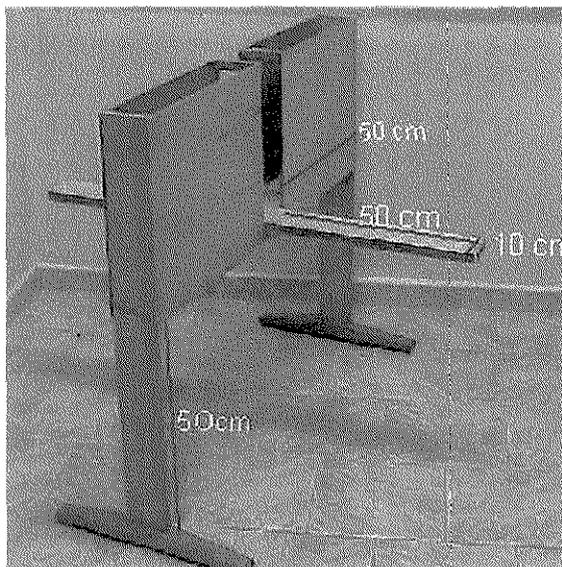


Figura 1. Foto do Labirinto em Cruz Elevado

Agentes ansiolíticos aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. Por outro lado, drogas ou estímulos ansiogênicos apresentam o efeito contrário (PELLOW *et al.*, 1985). Os comportamentos analisados no teste do labirinto em cruz elevado refletem a ansiedade e a atividade motora do animal. Estudos utilizando análise de fatores (FILE, 1992; CRUZ *et al.*, 1994) mostraram que a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos são um índice de ansiedade, enquanto o número absoluto de entradas nos braços fechados fornecem um índice da atividade locomotora do animal (CRUZ *et al.*, 1994). Outros parâmetros, como por exemplo o número absoluto de entradas nos braços abertos, fornecem índices viciados de ansiedade já que também estão significativamente relacionados com locomoção e atividade exploratória (CRUZ *et al.*, 1994).

3. OBJETIVOS

Estabelecer um modelo animal para o estudo da relação entre estresse, e halitose. Para isso nos propomos a:

- 3.1. Estudar o efeito do estresse e da idade sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em ratos de laboratório.
- 3.2. Estudar o efeito do estresse e da idade sobre o fluxo, concentração de proteínas e pH salivares em ratos de laboratório.
- 3.3. Estudar o efeito do estresse e da idade sobre o nível de ansiedade em ratos de laboratório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A nossa proposta inicial estava baseada em resultados de um estudo piloto mostrando que o estresse por natação induzia aumento na concentração bucal de CSV em ratos (QUEIROZ *et al.*, 1999). Porém o nº de observações era reduzida (n= 5). Com o objetivo de confirmar os efeitos do estresse por natação e verificar se o estresse por imobilização também induz aumento na concentração bucal de CSV em ratos, realizamos um experimento para comparar os efeitos da imobilização e da natação. Os animais foram submetidos a 3 sessões diárias consecutivas de natação (n = 9) ou imobilização(n = 10). As medidas de CSV foram realizadas antes e 3 horas após a aplicação do estresse, no 1º e 3º dia de experimento.

Para avaliação do efeito do estresse por imobilização e da idade sobre a concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (CSV), ratos adultos jovens e adultos foram submetidos a 15 sessões de imobilização. As medidas de CSV foram obtidas no 1º, 2º, 3º, 4º, 8º, 10º, 12º e 14º dias de estresse (TAB. 1). Em cada dia, quatro medidas foram obtidas: antes, imediatamente, 1h e 3h após a sessão de estresse.

Como a produção de CSV poderia estar relacionada a alterações na secreção salivar, foi realizada a coleta de saliva de alguns animais estressados e

controles após a 15ª sessão de imobilização para medida do fluxo e pH salivares e da concentração de proteínas na saliva (TAB. 1).

Como o nível de ansiedade dos animais poderia ser alterado pela idade e o estresse, e a avaliação da ansiedade em roedores pode ser feita utilizando-se o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), alguns animais foram submetidos ao teste do LCE no 15º dia (TAB. 1). Tendo em vista que o teste está baseado na novidade que o labirinto representa para o rato (CRUZ *et al.*, 1994) este teste comportamental foi aplicado somente uma vez.

TABELA 1. Grupos experimentais

Grupos	Sessões de imobilização n = 12-13	Medidas CSV* n = 12-13	Teste do LCE n = 7-8	Avaliações da secreção salivar** n = 5
Adulto jovem controle	0	sim	15ºdia	15ºdia
Adulto jovem estresse	15	sim	15ºdia	15ºdia
Adulto controle	0	sim	15ºdia	15ºdia
Adulto estresse	15	sim	15ºdia	15ºdia

*As medidas foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 e 14. CSV = compostos sulfurados voláteis. LCE = labirinto em cruz elevado. ** Medida de fluxo e pH salivares, e concentração de proteínas na saliva.

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar com 3-4 meses de idade (adultos jovens) e com 12-13 meses de idade (adultos), alojados em gaiolas coletivas, em número

de 5 animais/gaiola (idade de 4 meses) e número de 3/gaiola (12 meses de idade). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 6:00 h), onde receberam água e ração à vontade.

Os animais foram mantidos no biotério por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos, e foram manipulados por 10 dias para eliminação do estresse por manuseio. No momento da manipulação, foi realizada também a introdução da ponta de um sugador odontológico na cavidade bucal, para que o animal se habituassem a este procedimento, posteriormente utilizado para a medida da concentração bucal dos compostos sulfurados voláteis (CSV). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia/UNICAMP (CEEA-protocolo nº 159-1).

4.3. ESTRESSE POR NATAÇÃO

A natação, além de representar um agente estressante pelo exercício físico, apresenta um forte componente emocional, relacionado à novidade que este estímulo representa para o rato e à impossibilidade de fuga, somada à iminência de morte (ÖSTMAN-SMITH, 1979; COX *et al.*, 1985; GARCIA-MARQUEZ & ARMARIO, 1987; MARCONDES *et al.*, 1996).

Nove animais com idade entre 3 e 4 meses foram submetidos simultaneamente a uma sessão de 30 min de natação/dia, em três dias consecutivos, em um tanque medindo 90 cm de comprimento x 70 cm de largura x 60 cm de altura, contendo água a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a uma profundidade de 40 cm, suficiente para evitar que os animais encostassem a cauda no fundo do tanque (MARCONDES *et al.*, 1996).

4.4. ESTRESSE POR IMOBILIZAÇÃO

Os animais foram levados para o laboratório, onde permaneceram por 30 minutos antes do início das sessões de imobilização para eliminação do estresse por transporte. Durante este período os animais foram privados de água e ração para que estes fatores não influenciassem as medidas basais da concentração bucal dos compostos sulfurados voláteis.

Os animais foram imobilizados por um período de 2 horas, durante o qual os mesmos foram privados de água, alimento e deslocamento (AL-MOHAISEN *et al.*, 2000). O procedimento foi realizado utilizando-se tubos de PVC de dois diâmetros diferentes: diâmetro interno de 5,3 cm para os animais adultos jovens e 7,2 cm para os animais adultos (FIG. 2). As sessões de imobilização foram realizadas entre 8:00 e 10:00 h diariamente, durante 15 dias consecutivos.

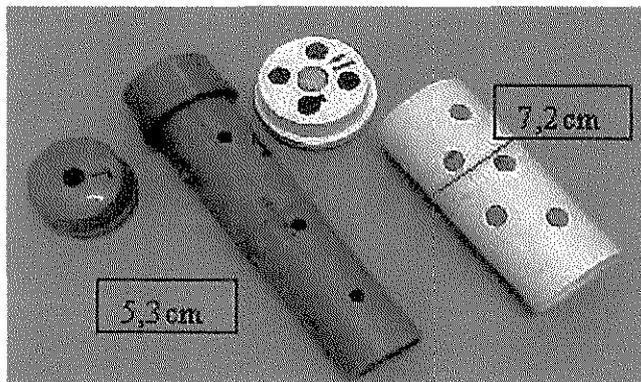


FIGURA 2. Tubos de PVC utilizados para imobilização de ratos de laboratório. Os valores indicados correspondem ao diâmetro dos tubos.

Nos mesmos dias e horários, os animais dos grupos controle permaneceram em suas gaiolas-moradia no laboratório de experimentação, também privados de água e ração.

4.5. MEDIDA DOS COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS (CSV)

Utilizando-se um monitor de sulfetos (halímetro – FIG. 3), foram quantificados os CSV no ar emanado da boca dos animais. O halímetro mede o número de moléculas de CSV em partes por bilhão (ppb), o que é mostrado em um visor frontal (ROSENBERG *et al.*, 1991).

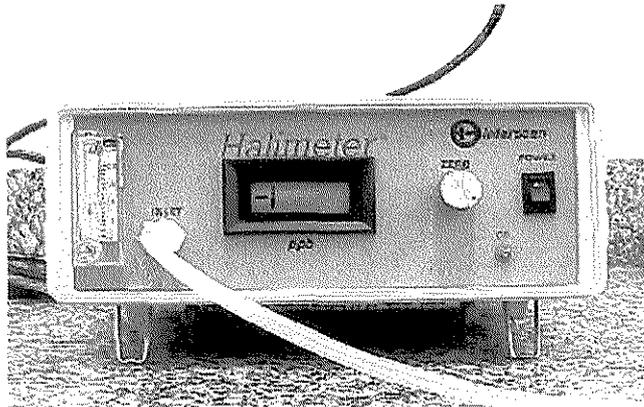


FIGURA 3. Monitor de sulfetos (Halímetro) utilizado para quantificação da concentração bucal de compostos sulfurados voláteis.

Uma cânula plástica e descartável de 10 cm de comprimento, utilizada em consultórios odontológicos na ponta de sugadores, foi adaptada à cânula plástica de 40 cm de comprimento e 7 mm de diâmetro que faz parte do aparelho. A cânula descartável foi introduzida lateralmente na cavidade bucal do animal de forma que não ocorresse a interrupção da sucção (FIG. 4). O ar coletado ao atingir o sensor eletroquímico no interior do aparelho permite a quantificação das moléculas de CSV. O maior valor observado durante 5 segundos foi registrado. Frente à aversão que o animal possui em relação à introdução forçada de objetos na cavidade bucal, este tempo foi utilizado por ser o menor período suficiente para leitura no halímetro. Embora em humanos geralmente seja feita a média de duas ou três leituras consecutivas, e cada leitura dure em média um minuto, neste estudo foi realizada apenas uma única medida. Isto se deve ao tamanho da cânula, e ao fato de que não é possível a manutenção da cânula na boca do

animal por um minuto já que o animal não permanece com a cabeça imóvel sem lutar para fugir da contenção. Além disso, a concentração de CSV é maior na primeira medida uma vez que, aberta a boca do animal, parte dos CSV é liberado no ambiente.



FIGURA 4. Medida da concentração bucal de compostos sulfurados voláteis em ratos de laboratório, por meio da introdução, na boca do animal, de uma cânula ligada ao halímetro,.

4.6. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO SALIVAR

A coleta de saliva foi realizada no 15^o dia do experimento, imediatamente após a última sessão de imobilização ou, no caso de ratos controle, após 2 h e meia de permanência no laboratório. Os animais foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40 mg/Kg i.p.). Após comprovação do efeito anestésico, por ausência de resposta à estimulação mecânica das patas posteriores (pressão aplicada com uma pinça), a salivação foi estimulada por

administração de pilocarpina - 10 mg/Kg i.p. (KOLLER et al, 2000). Dois minutos após esta injeção, a coleta de saliva foi iniciada e mantida por 15 minutos, em copos descartáveis, mantidos em banho de gelo.

A partir do volume e do tempo de coleta (15 min), calculou-se o fluxo salivar em mL/ min. O volume de saliva obtido foi quantificado através do uso de seringas descartáveis de 5 mL para a transferência da saliva dos copos descartáveis para tubos de ensaio. Nestes, foi realizada a verificação do pH salivar (Micronal). A concentração protéica na saliva foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se o kit comercial produzido pela empresa Biorad[®].

4.7. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ANSIEDADE

Para avaliar o nível de ansiedade dos animais utilizou-se o teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Os animais foram colocados no centro do labirinto (FIG.1), de frente para um dos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985), 30 min após terem sido submetidos à última sessão de imobilização. Os animais controle foram submetidos a este teste após 2 h e meia de permanência no laboratório, também no 15º dia de experimento.

Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste (CRUZ *et al.*, 1994) e seu comportamento foi filmado por 5 minutos. Para a filmagem, os animais eram identificados por somente por um número escrito em uma folha de papel, e colocados no LCE por um pesquisador colaborador. Este registrava em um caderno a que animal cada número correspondia. Posteriormente, sem conhecimento do grupo a que cada animal filmado pertencia, o experimentador autor deste projeto e outro colaborador analisaram os filmes (experimento cego). Foram registrados o tempo de exploração dos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Os resultados foram convertidos posteriormente em:

1) Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($100 \times \text{Tempo (s) nos braços abertos} / \text{Tempo total de observação}$), classicamente considerada um índice de ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985). Maior porcentagem de tempo nos braços abertos indica menor nível de ansiedade do animal (CRUZ *et al.*, 1994).

2) Porcentagem de entradas feitas nos braços abertos ($100 \times \text{N.º de entradas nos braços abertos} / \text{n.º total de entradas}$), a qual está relacionada à ansiedade e à atividade locomotora do animal (CRUZ *et al.*, 1994).

3) N° de entradas feitas nos braços fechados, considerado um índice de atividade locomotora (CRUZ *et al.*, 1994).

Somente após a análise de todos os filmes, as médias das medidas

registradas pelos dois pesquisadores, foram relacionadas aos respectivo animal para a análise estatística dos dados.

4.9. FÁRMACOS E REAGENTES

Para o preparo da solução anestésica foram utilizados tiopental sódico 2% produzido pelo laboratório Cristália e solução salina estéril. Para o preparo da solução de pilocarpina 0,4%, foi utilizada pilocarpina produzida pela Sigma Chemical Co., diluída em água deionizada imediatamente antes do uso. Os reagentes padrão (albumina de soro bovina) e de cor para dosagem de proteínas foram adquiridas da Bio-Rad, e preparados de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade da água deionizada foi confirmada semanalmente por verificação de sua condutividade.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados referentes à comparação entre os efeitos do estresse por natação e imobilização, foi utilizada Análise de Variância Bifatorial com os fatores grupo (natação x imobilização) e medida (antes - dia1 x 3h depois - dia 1 x antes - dia 3 x 3h depois - dia 3).

Para a análise dos níveis de CSV, foi utilizada Análise de Variância em esquema de parcelas subdivididas, sendo a parcela representada pelo fatorial idade x grupo e subparcela pelos dias das avaliações, fixando-se o fator medida. Para os fatores idade e grupo, houve dois níveis: adulto jovem x adulto e controle x estresse, respectivamente. Para o fator dia, houve oito níveis: dia 1 x dia 2 x dia 3 x dia 4 x dia 8 x dia 10 x dia 12 x dia 14. Para a comparação entre as medidas realizadas, foi utilizado o teste estatístico por ordens assinaladas. Como não houve homogeneidade de variâncias, os dados referentes aos níveis de CSV foram transformados ($\log x + 0$).

Para análise dos dados referentes a fluxo salivar, pH salivar, concentração de proteínas na saliva e nível de ansiedade, foi utilizada Análise de Variância Bifatorial com os fatores idade (jovem x adulto) e grupo (controle x estresse).

Quando valores significativos de F foram obtidos, as Análises de Variância foram seguidas do teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. Valores de p menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

5. RESULTADOS

Os resultados referentes à comparação entre os efeitos do estresse por natação e por imobilização sobre a concentração bucal de CSV estão apresentados no GRAF. 1. Ratos submetidos à natação apresentaram um aumento nas concentrações bucais de CSV, três horas após a 1ª ($20 \pm 0,8 \times 27 \pm 1,3$ ppb; $p=0,018$, GRAF. 1), e terceira sessões ($18 \pm 0,9 \times 21 \pm 0,6$ ppb; $p=0,015$, GRAF. 1), em relação às respectivas medidas obtidas antes da aplicação do estresse. Os níveis de CSV observados 3 h após a terceira sessão de natação foram menores do que aqueles obtidos 3 h após a primeira sessão (GRAF. 1). Não houve diferenças entre as concentrações bucais de CSV observadas antes da 1ª e 3ª sessões de natação ($20 \pm 0,8 \times 18 \pm 0,9$ ppb; $p= 0,829$, GRAF. 1).

Ratos submetidos à imobilização apresentaram aumento nos níveis de CSV três horas após a 1ª sessão em comparação aos valores observados antes da sessão de estresse ($28 \pm 2,4 \times 17 \pm 0,7$ ppb; $p= 0,000$, GRAF. 1). Um aumento semelhante foi observado 3 horas depois da 3ª sessão de imobilização ($25 \pm 1,6 \times 19 \pm 1,4$ ppb; $p=0,037$; GRAF. 1) em relação à concentração antes da aplicação do estresse. Não houve diferenças significativas entre os níveis de CSV obtidos antes da 1ª e da 3ª sessões de imobilização ($17 \pm 0,7 \times 19 \pm 1,4$ ppb; $p=0,829$, GRAF. 1). Não foram observadas diferenças entre as concentrações de CSV entre ratos estressados por natação e imobilização em cada medida realizada.

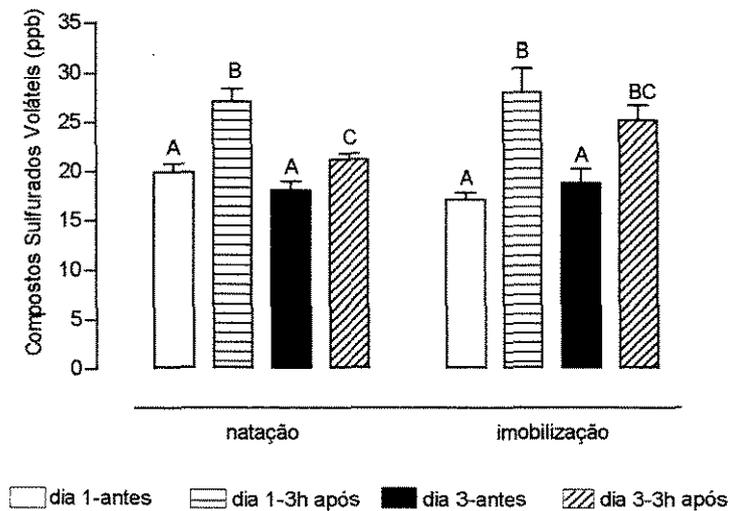


GRÁFICO 1. Concentração bucal de CSV em ratos submetidos a três sessões de natação (n=9) ou imobilização (n=10), aplicadas em dias consecutivos. As medidas foram obtidas antes e 3 horas após as sessões de estresse. Letras diferentes indicam grupos significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Para a avaliação do efeito do estresse por imobilização e da idade sobre a concentração bucal de CSV foram avaliados 4 fatores simultaneamente: idade (adulto jovem x adulto), grupo experimental (estresse x controle), dia (dias em que as medidas foram realizadas) e medida (4 medidas feitas no mesmo dia). Os dados serão apresentados separadamente por medida realizada.

Na primeira medida, obtida após permanência do animais por 30 min no laboratório, houve efeito significativo do fator idade (TAB. 2; $p = 0,01260$), sem interação entre idade e os demais fatores. Ratos adultos apresentaram maiores concentrações bucais de CSV em relação a ratos adultos jovens,

independentemente do grupo experimental (controle ou estresse) e do dia avaliado (TAB. 3).

TABELA 2. Análise de variância fixando a medida 1 do fator medida.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
IDADE	1	0.9415206	0.9415206	6.6365	0.01260
GRUPO	1	0.1620860	0.1620860	1.1425	0.29053
IDADE*GRUPO	1	0.0323081	0.0323081	0.2277	0.64057
RESIDUO (A)	48	6.8098127	0.1418711		
PARCELAS	51	7.9457274			
DIA	7	2.5880971	0.3697282	8.1057	0.00001
IDADE*DIA	7	0.4258299	0.0608328	1.3337	0.23257
GRUPO*DIA	7	1.4581520	0.2083074	4.5668	0.00018
IDADE*GRUPO*DIA	7	0.3377104	0.0482443	1.0577	0.39075
RESIDUO (B)	336	15.3260716	0.0456133		
TOTAL	415	28.0815885			

TABELA 3. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (CSV) em ratos adultos jovens e adultos, na primeira medida diária realizada.

Grupo	N ^a	CSV (ppb) ^b
Adulto jovem	200	18,89±4.72
Adulto	200	20.88±5.64*

^aNúmero de medidas/grupo. ^bMédia ± DP. *Diferença significativa em relação ao grupo adulto jovem (p=0,01260).

Na análise dos valores de CSV obtidos na primeira medida realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 e 14, houve interação significativa entre os fatores grupo e dia (TAB. 2; p = 0,00018). Os grupos submetidos a estresse apresentaram aumento na concentração bucal de CSV em relação aos

respectivos grupos controle nos dias 2, 4, 12 e 14 (GRAF. 2). Este efeito foi independente da idade dos animais.

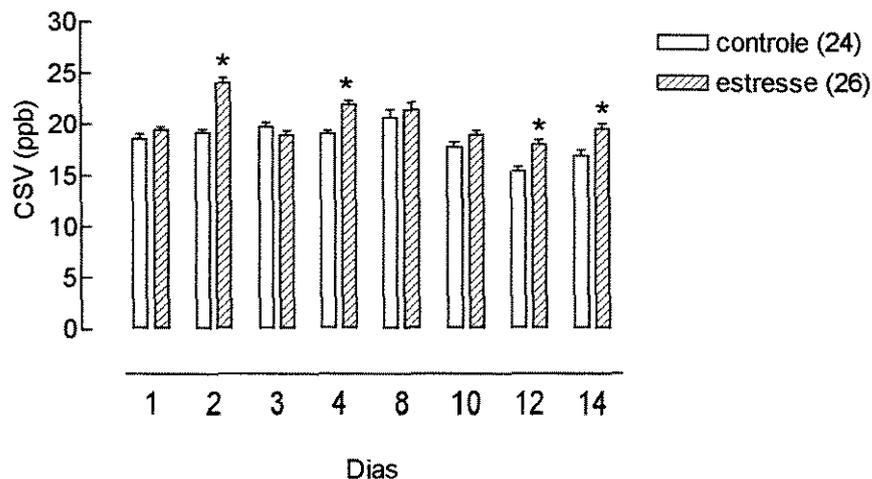


GRÁFICO 2. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização, na primeira medida realizada/por dia. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Com relação ao efeito dos dias, animais controle apresentaram, na primeira medida diária obtida, aumento na concentração bucal de CSV no segundo dia em relação ao primeiro (GRAF. 3; $p < 0,05$). No 12º dia foi observado uma queda significativa na concentração bucal de CSV em relação aos dias 1, 2, 3, 4 e 8 (GRAF. 3; $p < 0,05$). Entretanto nos grupos submetidos a estresse foi observada queda significativa nos níveis de CSV no 12º dia somente em relação ao 4º dia (GRAF.3; $p < 0,05$).

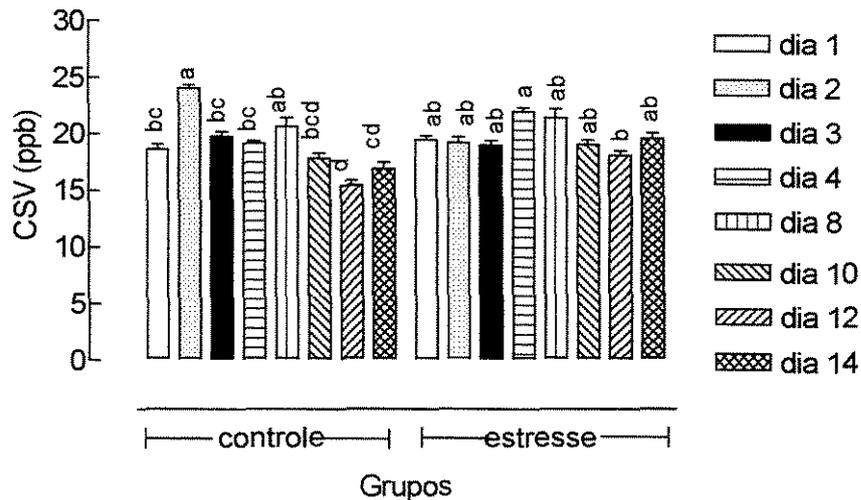


GRÁFICO 3. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização na primeira medida obtida / dia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre dias no mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

Na análise das medidas realizadas imediatamente após a sessão de imobilização (2ª medida / dia), para os grupos submetidos a estresse, e após duas horas e meia de permanência no laboratório para os animais controle (2ª medida / dia), houve interação significativa entre os fatores idade e grupo (TAB. 4; $p = 0,00039$). Ratos adultos jovens submetidos a estresse apresentaram menores concentrações bucais de CSV do que animais adultos submetidos ao mesmo tratamento (TAB. 5; $p < 0,05$). Porém não houve diferença entre idades nos grupos controle (TAB. 5; $p < 0,05$).

TABELA 4. Análise de variância fixando a medida 2 do fator medida.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
IDADE	1	0.2746177	0.2746177	9.4939	0.00369
GRUPO	1	0.0148899	0.0148899	0.5148	0.51660
IDADE*GRUPO	1	0.4746114	0.4746114	16.4079	0.00039
RESIDUO (A)	48	1.3884358	0.0289257		
PARCELAS	51	2.1525548			
DIA	7	5.7799301	0.8257043	15.5205	0.00001
IDADE*DIA	7	0.3127992	0.0446856	0.8399	0.55587
GRUPO*DIA	7	1.4440485	0.2062926	3.8776	0.00068
IDADE*GRUPO*DIA	7	0.1405625	0.0200804	0.3774	0.91515
RESIDUO (B)	336	17.8754699	0.0532008		
TOTAL	415	27.7053651			

TABELA 5. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (CSV) em ratos adultos jovens e adultos, na segunda medida realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 8, 10 12 e 14.

Idade	Controle (N = 96)	Estresse (N = 104)
Adulto jovem	26,22±7,43 A	24,16±7,94 A
Adulto	25,91±7,37 A	26,89±5,85 B

Letras maiúsculas comparam, na vertical, idade dentro dos grupos controle ou estresse. Letras diferente indicam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). N = número de medidas realizadas/ grupo.

Na segunda medida realizada, houve interação significativa entre os fatores grupo experimental e dia de tratamento (TAB. 4; $p = 0,00068$). O estresse induziu aumento na concentração bucal de CSV no 2º e 4º dias (GRAF. 4; $p < 0,05$). Por outro lado, nos dias 3, 8 e 14, foi observada queda na concentração bucal de CSV nos animais submetidos ao estresse por imobilização, em relação aos respectivos grupos controle (GRAF. 4; $p < 0,05$).

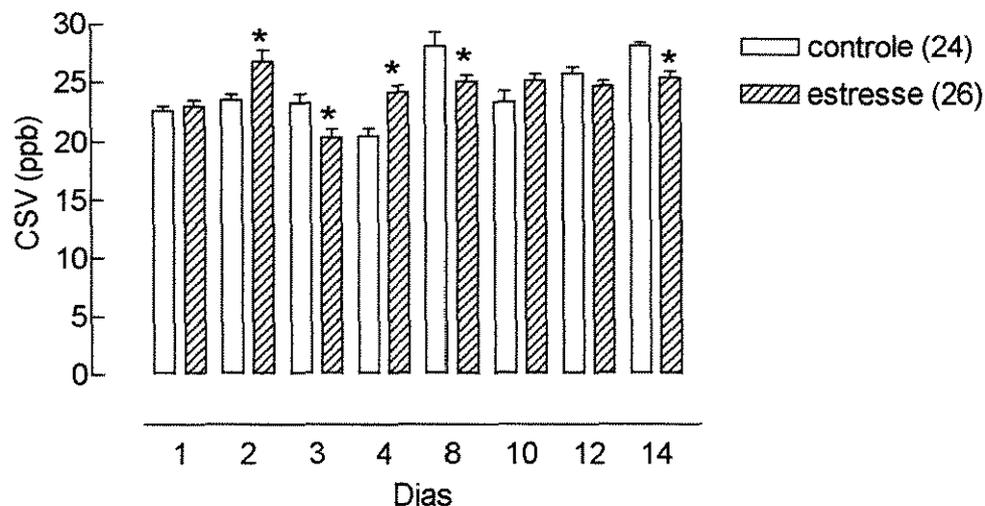


GRÁFICO 4. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização, na segunda medida realizada / por dia. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Com relação ao efeito dos dias, na segunda medida obtida / dia, ratos controle apresentaram um aumento significativo na concentração bucal de CSV no 8º dia, em relação aos dias 1, 2, 3 e 4 (GRAF. 5; $p < 0,05$). E no 14º dia, os níveis de CSV apresentavam-se elevados em relação ao primeiro dia (GRAF. 5; $p < 0,05$). Nos grupos submetidos ao estresse por imobilização, foi observada queda na concentração bucal de CSV no 3º dia, em relação ao segundo dia (GRAF. 5; $p < 0,05$), sendo que a partir do 4º dia, não houve diferenças significativas em relação aos dias 1 e 2 (GRAF. 5; $p > 0,05$).

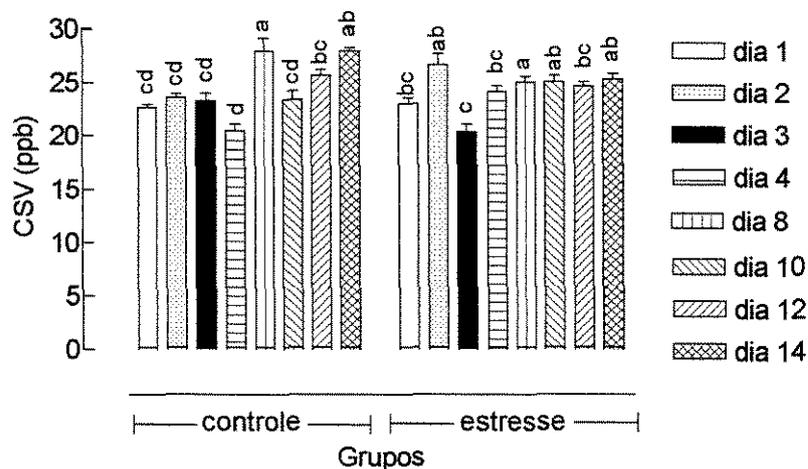


GRÁFICO 5. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por immobilização na segunda medida obtida / dia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre dias no mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

Na análise das medidas realizadas 1 hora (3ª medida / dia) após a sessão de immobilização, para os grupos submetidos a estresse, e após três horas e meia de permanência no laboratório para os animais controle, novamente houve interação significativa entre os fatores idade e grupo (TAB. 6; $p = 0,02870$). Ratos adultos jovens submetidos a estresse apresentaram menores concentrações bucais de CSV do que animais adultos submetidos ao mesmo tratamento (TAB. 7; $p < 0,05$). Porém não houve diferença entre idades nos grupos controle (TAB. 7; $p < 0,05$).

TABELA 6. Análise de variância fixando a medida 3 do fator medida.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
IDADE	1	0.2539242	0.2539242	6.1604	0.01580
GRUPO	1	0.0413098	0.0413098	1.0022	0.32311
IDADE*GRUPO	1	0.2048721	0.2048721	4.9703	0.02870
RESIDUO (A)	48	1.9785156	0.0412191		
PARCELAS	51	2.4786216			
DIA	7	5.6096303	0.8013758	14.6866	0.00001
IDADE*DIA	7	0.2458623	0.0351232	0.6437	0.72159
GRUPO*DIA	7	0.9926900	0.1418129	2.5990	0.01272
IDADE*GRUPO*DIA	7	0.3899130	0.0557019	1.0208	0.41658
RESIDUO (B)	336	18.3338885	0.0545651		
TOTAL	415	28.0506057			

TABELA 7. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (CSV) em ratos adultos jovens e adultos, na terceira medida realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 e 14.

Idade	Controle (N = 96)	Estresse (N = 104)
Adulto jovem	26,09±6,70 A	25,35±5,99 A
Adulto	26,63±9,07 A	27,73±6,07 B

Letras maiúsculas comparam, na vertical, idade dentro dos grupos controle ou estresse. Letras diferente indicam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). N = nº de medidas realizadas.

Na medida realizada 1 h após a sessão de imobilização (grupos estresse) ou após permanência no laboratório por 3 horas e meia (grupos controle), houve interação significativa entre os fatores grupo experimental e dia de tratamento (TAB. 6; $p = 0,001272$). Ratos submetidos ao estresse por imobilização apresentaram maiores níveis de CSV comparados aos respectivos

controles no 4º dia (GRAF. 6; $p < 0,05$), sem diferença nos demais dias em que as medidas foram realizadas.

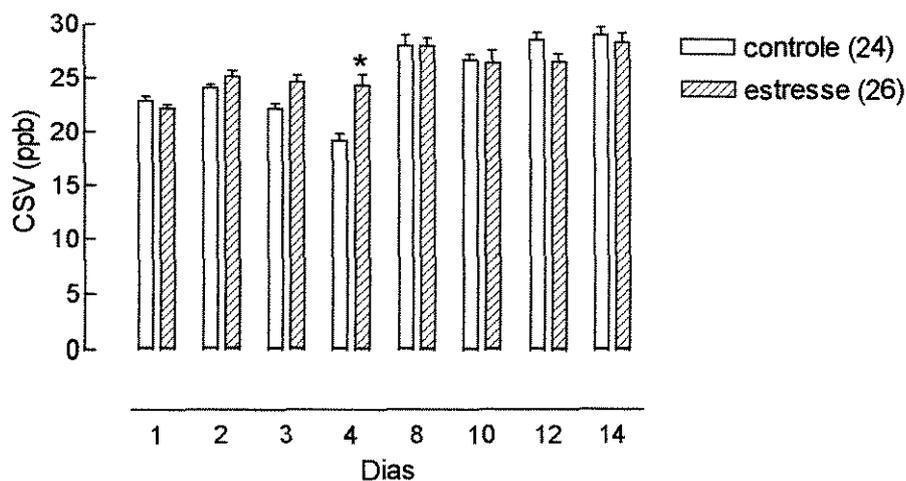


GRÁFICO 6. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização, na terceira medida realizada / por dia. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Com relação ao efeito dos dias, na terceira medida obtida / dia, ratos controle apresentaram um aumento significativo na concentração bucal de CSV no 8º dia, em relação aos dias 1, 2, 3 e 4 (GRAF. 7; $p < 0,05$). Este aumento se manteve também no 14º dia (GRAF. 7; $p < 0,05$). Nos grupos submetidos ao estresse por imobilização, foi observado aumento na concentração bucal de CSV no 8º dia, em relação aos dias 1 e 4 (GRAF. 7; $p < 0,05$). E no 14º dia, houve

aumento significativo em relação aos níveis observados no primeiro dia (GRAF. 7; $p < 0,05$).

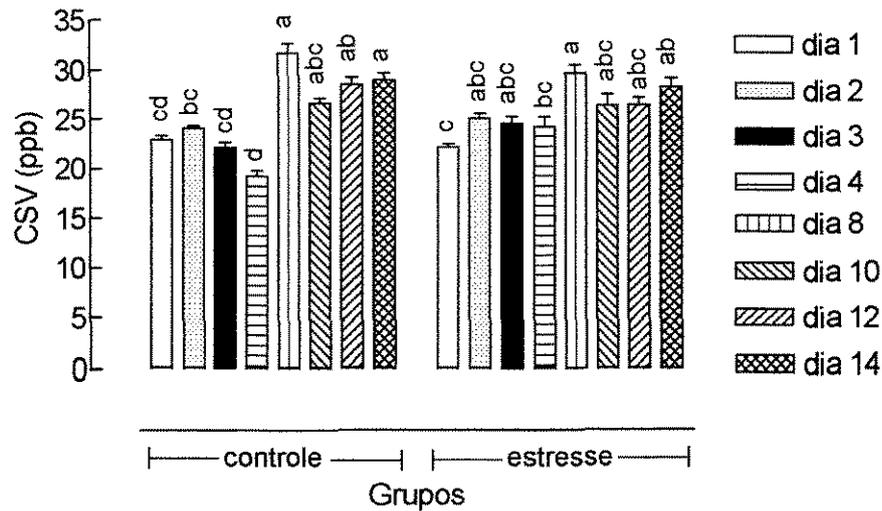


GRÁFICO 7. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização na terceira medida obtida / dia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre dias no mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

A análise das medidas dos CSV realizadas em animais estressados, 3 h após as sessões de imobilização e, em animais controle, 5 h e meia após permanência no laboratório indicou efeito significativo somente do fator dia (TAB. 8; $p = 0,00001$). Houve queda nos níveis de CSV no 2º dia, em relação ao 1º, 4º, 8º, 10º, 12º e 14º dias (GRAF. 8; $p < 0,05$). Não houve diferença entre as idades ou tratamentos ($p > 0,05$).

TABELA 8. Análise de variância fixando a medida 4 do fator medida.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
IDADE	1	0.1735538	0.1735538	3.8724	0.05195
GRUPO	1	0.0803424	0.0803424	1.7927	0.18386
IDADE*GRUPO	1	0.1134927	0.1134927	2.5323	0.11428
RESIDUO (A)	48	2.1512480	0.0448177		
PARCELAS	51	2.5186369			
DIA	7	2.3575767	0.3367967	9.2118	0.00001
IDADE*DIA	7	0.3947044	0.0563863	1.5422	0.15136
GRUPO*DIA	7	0.3760805	0.0537258	1.4695	0.17641
IDADE*GRUPO*DIA	7	0.1200254	0.0171465	0.4690	0.85745
RESIDUO (B)	336	12.2846367	0.0365614		
TOTAL	415	18.0516606			

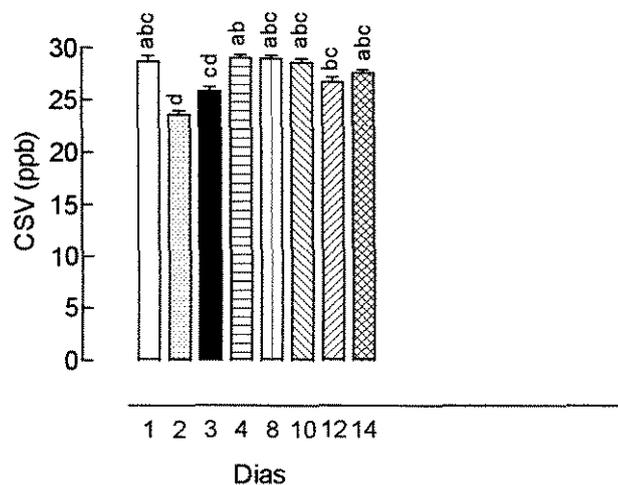


GRÁFICO 8. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização na quarta medida obtida / dia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre dias no mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

Com relação à comparação entre as 4 medidas realizadas num mesmo dia, durante os 14 dias de experimento, houve diferenças significativas entre as medidas dos níveis de CSV em ratos, independentemente da idade, grupo experimental ou dia de observação. Houve um aumento progressivo entre os valores obtidos (GRAF. 9; $p < 0,05$).

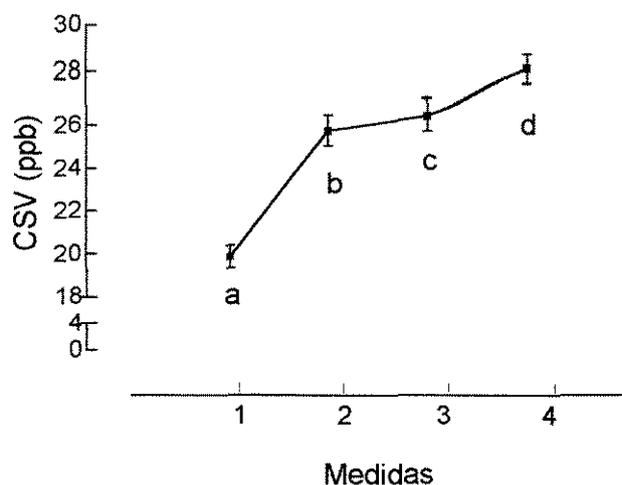


GRÁFICO 9. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos a estresse repetido por imobilização, nas quatro medidas realizadas / dia durante 14 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as medidas obtidas ($p < 0,05$).

Considerando as interações nas variações de CSV dos dados anteriormente apresentados, a TAB. 9 mostra um quadro geral dos resultados.

TABELA 9. Resultados gerais obtidos de CSV.

Medida	Idade	Grupo	Dias
1	Adulto > Adulto jovem	estresse > controle (2, 4, 12 e 14)	Controle: 2 > 1, 12 < 1, 2, 3, 4 Estresse: 12 < 4
2	Adulto estresse > Adulto jovem estresse	estresse > controle (2 e 4) estresse < controle (3, 8 e 14)	Controle: 8 > 1, 2, 3, 4, 10 e 12 Estresse: 3 < 2; 8, 10 e 14
3	Adulto estresse > Adulto jovem estresse	estresse > controle (4)	Controle: 8 e 14 > 1, 2, 3 e 4 Estresse: 8 > 1, 4
4	-	-	2 < 1, 4, 8, 10, 12 e 14

Após 15 sessões de imobilização, foram analisados o fluxo e pH salivares e a concentração de proteínas na saliva de ratos adultos jovens e de ratos adultos. Esta avaliação foi também realizada em animais controle.

Ratos adultos controle apresentaram fluxo salivar menor do que ratos adultos jovens controle (GRAF. 10; $p < 0,05$). Após o estresse por imobilização ratos adultos jovens apresentaram redução significativa do fluxo salivar em relação ao respectivo grupo controle (GRAF. 10; $p < 0,05$). Com relação aos animais adultos, não foi observada diferença entre animais controle e submetidos à imobilização (GRAF. 10; $p > 0,05$).

Quanto ao pH salivar, ratos adultos, controle e estressados, apresentaram maior pH salivar do que ratos adultos jovens controle ou estressados (GRAF. 12; $p < 0,05$).

O GRAF. 11 mostra a concentração protéica total na saliva de ratos adultos jovens e adultos, controle e submetidos ao estresse por imobilização. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados (GRAF. 11; $p > 0,05$).

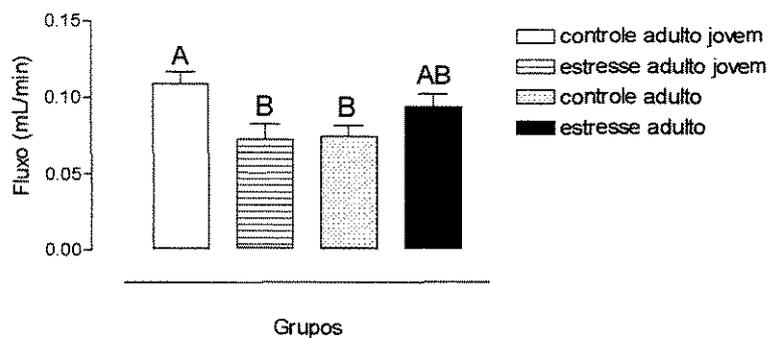


GRÁFICO 10. Fluxo salivar de ratos adultos jovens e adultos, controle ou submetidos a 15 sessões de 2h de imobilização aplicadas em dias consecutivos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O número de experimentos foi igual a 5 animais/grupo.

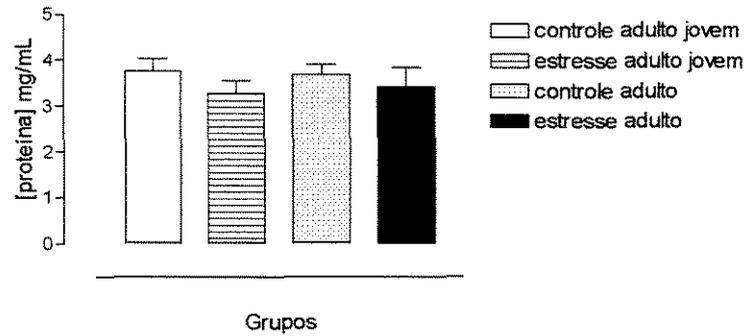


GRÁFICO 11. Concentração total de proteínas na saliva de ratos adultos jovens e adultos, controle ou submetidos a 15 sessões de 2h de imobilização aplicadas em dias consecutivos. O número de experimentos foi igual a 5 animais/grupo.

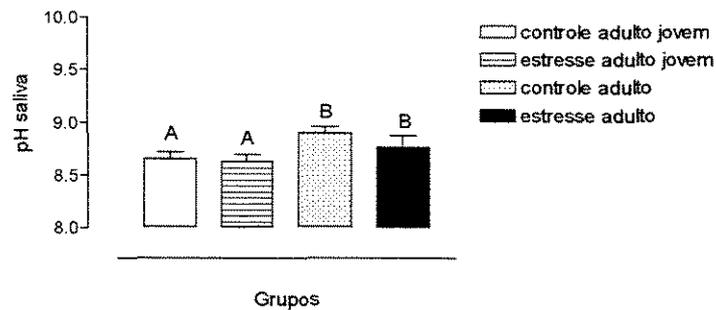


GRÁFICO 12. pH salivar de ratos adultos jovens e adultos, controle ou submetidos a 15 sessões de 2h de imobilização aplicadas em dias consecutivos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O número de experimentos foi igual a 5 animais/grupo.

Além da análise dos CSV e de parâmetros salivares, o nível de ansiedade dos animais também foi avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Em ratos controle, a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos foi menor em animais adultos do que em ratos adultos jovens (GRAF. 13A). Ratos adultos submetidos ao estresse por imobilização também apresentaram menor porcentagem de tempo nos braços abertos do que ratos adultos jovens submetidos ao mesmo tratamento. Não houve diferenças entre animais submetidos ao estresse e os respectivos grupos controle (GRAF. 13A; $p < 0,05$).

Entre ratos controle, animais adultos apresentaram menor porcentagem de entradas nos braços abertos do que animais adultos jovens (GRAF. 13B; $p < 0,05$). Em ratos adultos submetidos ao estresse por imobilização também foi observada menor porcentagem de entradas nos braços abertos, em relação a ratos adultos jovens submetidos ao mesmo tratamento (GRAF. 13B; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças na porcentagem de entradas nos braços abertos entre os grupos estressados e seus respectivos controle (GRAF. 13B; $p > 0,05$).

Não houve diferenças entre os grupos analisados no número de entradas realizadas nos braços fechados (GRAF. 13C; $p > 0,05$).

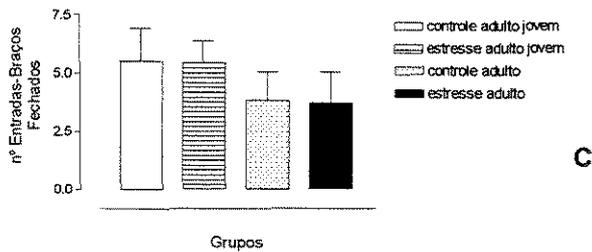
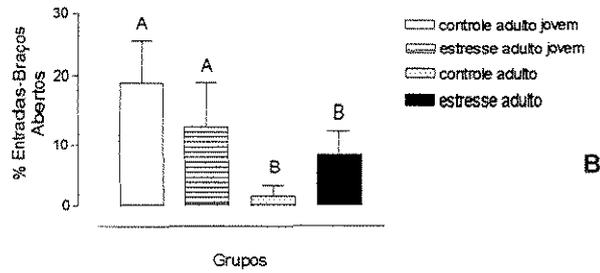
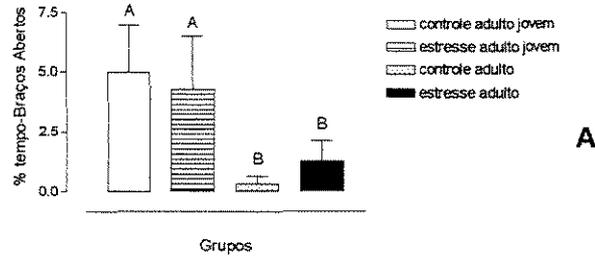


GRÁFICO 13. Porcentagem de tempo nos braços abertos (A), porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos (B) e número de entradas nos braços fechados (C), no teste do labirinto em cruz elevado, de ratos adultos jovens e adultos, controle e submetidos a 15 sessões de estresse por imobilização. O número de experimentos foi de 6-7 animais/grupo. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A halitose ou mau hálito é causada por má higiene oral, doenças bucais ou sistêmicas. Embora o estresse também tenha sido proposto como um agente desencadeante da halitose, há poucos estudos desenvolvidos para analisar a relação entre estresse e mau hálito (QUEIROZ, 1999).

Os principais componentes do mau odor bucal são os compostos sulfurados voláteis (CSV), cujas concentrações no ar bucal podem ser determinadas por meio de um monitor de sulfetos ou halímetro.

No presente estudo, o estresse e a idade alteraram a concentração bucal de CSV em ratos de laboratório. A maior concentração bucal de CSV em ratos com 12-13 meses em relação àquela de ratos com 4 meses, antes do início das sessões de imobilização, mostra que o aumento da idade induziu uma maior produção destes compostos.

Com relação aos efeitos do estresse, nossos resultados confirmaram o efeito do estresse por natação sobre a produção de CSV, e mostraram que houve um aumento na concentração bucal de CSV em ratos submetidos ao estresse por imobilização. Este efeito foi evidenciado claramente quando o animal foi utilizado como seu próprio controle.

Porém nos experimentos em que 15 sessões de imobilização foram utilizadas como estímulo estressor, e outro grupo controle foi usado, os efeitos do

estresse não parecem ter sido tão claros, além de terem sido dependentes da idade dos animais e do dia em que as medidas foram obtidas. Animais adultos apresentaram maiores níveis de CSV, imediatamente e 1 hora após as sessões de imobilização, em relação aos animais adultos jovens também submetidos a este tratamento. As variações, entre dias, nas concentrações bucais de CSV, entretanto, não nos permitiram identificar nenhum padrão para as variações observadas.

Considerando que foram observadas variações, mesmo em animais controles, na concentração bucal de CSV, entre os dias em que as medidas foram realizadas, feromônios liberados pelos ratos submetidos ao estresse repetido por imobilização podem ter sido um estímulo estressor para os animais controle.

Feromônios são substâncias que desempenham a função de comunicação entre indivíduos da mesma espécie com diferentes finalidades, como por exemplo reprodução (VANDENBERGH, 1973), cuidado parental (MYKYTOWCZ & GOODRICH, 1974) e alerta (WILSON, 1975). Estudos mostraram que roedores evitam o local em que outro animal foi estressado, o que sugere que animais da mesma espécie podem identificar a fonte e o perigo potencial em odores, de forma que possam evitar riscos potenciais de encontro com estímulos aversivos. Se o animal não pode escapar do lugar em que há presença dos feromônios de alarme, pode apresentar comportamentos defensivos associados ao estresse (KIKUSUI *et al.*, 2001).

Nos experimentos por nós realizados, feromônios podem ter sido liberados pelos animais submetidos ao estresse por imobilização durante a sessão de estresse, e também após o retorno dos animais ao biotério. Se isto de fato ocorreu, os animais controle foram expostos aos feromônios de alarme, os quais podem ter induzido alerta, desencadeando a reação de estresse em animais não submetidos à imobilização. Como a produção e percepção de tais substâncias variam em função das condições ambientais e do número de animais mantidos em um mesmo ambiente, a produção de feromônios explicaria também os resultados sem um padrão definido com relação ao efeito do estresse (aumento, queda, não alteração) ao longo dos 15 dias de experimento.

Como o grupo controle foi definido com base na preocupação de que os diferentes grupos tivessem todo o tratamento similar, inclusive o mesmo período para obtenção das medidas de CSV, excetuando-se apenas a aplicação do estresse, todos os animais foram mantidos nos mesmos ambientes (sala de experimentação e biotério) durante o experimento. Portanto, é realmente possível que o efeito de feromônios de alarme tenham influenciado os resultados obtidos. Neste caso, um tipo de estresse basicamente emocional, sinalização química, também parece alterar as concentrações bucais de CSV em ratos de laboratório.

O aumento na produção de CSV pode ser resultado de diminuição no fluxo salivar, mudanças no pH salivar, aumento na oferta de substrato protéico para o metabolismo de bactérias anaeróbicas e/ou alterações na microbiota bucal.

Tais fatores poderiam atuar isoladamente ou em conjunto, determinando uma maior produção de gases resultantes da degradação de aminoácidos sulfurados.

No presente estudo, para avaliar a influência da saliva nos níveis de CSV, analisamos o fluxo salivar, pH salivar e concentração de proteínas salivares em ratos adultos jovens e adultos, controles e submetidos a estresse repetido por imobilização. Nossos resultados mostraram que a idade induziu uma diminuição na salivação e no o pH salivar sem alteração na concentração total de proteínas na saliva. Com relação ao estresse, foi observado que as sessões de imobilização induziram queda no fluxo salivar somente em animais adultos jovens, sem alteração em ratos adultos.

Como foi realizada a coleta de saliva total, alterações que possam ter diferencialmente ocorrido nas glândulas parótidas, submaxilares e sublinguais foram mascaradas. Portanto nossos resultados não permitem afirmar que o estresse e a idade não alteraram a concentração das diferentes proteínas salivares. A proporção entre estas poderia ser alterada, sem alteração na concentração protéica total.

Considerando que a redução do fluxo salivar favorece a produção de CSV, nossos resultados parecem indicar que a idade e o estresse, ao induzirem a queda na salivação, favorecem o aumento da produção de CSV. Entretanto os mecanismos envolvidos provavelmente são diferentes.

Em indivíduos idosos, ocorre redução do volume das glândulas salivares submandibulares e parótidas (BAUM *et al.*, 1995), o que explicaria a menor produção de saliva em idosos (MILETIC, 1995). Embora a diminuição do volume salivar produzido não seja simplesmente uma seqüela do envelhecimento, ela está associada a algumas condições como doenças e terapias medicamentosas geralmente observadas em idosos (BAUM *et al.*, 1995), e estes fatores podem contribuir para o fenômeno bucal denominado xerostomia.

No experimento realizado por LIU *et al.*(2000) foi analisada a glândula submandibular de camundongos fêmea com diferentes idades (3, 10 e 28 meses) para análise das mudanças nos aspectos celulares. O conteúdo de DNA, e peso da glândula aumentaram significativamente dos 3 aos 10 meses de idade. Houve queda significativa na porcentagem de células acinares dos 3 aos 28 meses. Neste mesmo período a porcentagem de células intercalares e granulares das células de ductos aumentou.

A maior secreção de catecolaminas visa promover ajustes cardio-respiratórios e comportamentais, e simultaneamente inibir respostas não essenciais durante a exposição a agentes estressores. Isto permite melhor aporte de oxigênio e substratos energéticos à musculatura esquelética e ao sistema nervoso central. Entre as funções inibidas durante a reação de estresse, cita-se a digestão (MORSE *et al.*, 1981), e neste contexto, a secreção salivar. Nas situações de estresse, ocorre uma diminuição do fluxo salivar por ativação do

sistema nervoso simpático. A maior liberação de catecolaminas gera uma diminuição do calibre dos vasos sanguíneos. Especificamente nas glândulas salivares esta diminuição representa menor produção de saliva uma vez que o fluido é obtido da própria corrente sanguínea (GEMBA, 1996).

Seria lógico pensar que a redução de massa de células acinares induzida pela idade e a menor secreção salivar induzida pelo estresse acarretariam também uma diminuição na liberação de proteínas na saliva. Porém, em indivíduos idosos o que se observou foi que a produção protéica de amilase, IgA secretória, lactoferrina e lisozima se mantém estável (BAUM *et al.*, 1995). Nossos resultados confirmaram estes achados, pois não observamos diferenças na concentração total de proteínas na saliva entre animais adultos jovens e adultos, controles ou estressados.

Outro fator importante que influencia a produção de CSV é o pH salivar. O pH ácido reduz ou inibe a produção do mau odor bucal, enquanto um pH próximo ao neutro ou básico a favorece (KLEINBERG & WESTBAY, 1992). Nossos resultados mostram que o pH salivar de ratos adultos estava próximo a 9, enquanto animais adultos jovens apresentaram pH salivar com valor próximo a 8,5. Estes valores foram independentes do estresse, e parecem estar relacionados à idade dos animais. Porém, a mensuração de pH de saliva estimulada por pilocarpina não pode ser considerada como o pH real da saliva já que a pilocarpina inibe a reabsorção de bicarbonato durante a secreção salivar,

acarretando um aumento do pH. Portanto, as diferenças observadas nos valores de pH não parecem estar relacionadas com a produção de CSV.

O sistema nervoso autônomo regula a função das glândulas salivares, e sua atividade é regulada pelo sistema límbico, do qual fazem parte o hipocampo e hipotálamo. Este sistema é formado por um conjunto de estruturas nervosas relacionadas com o controle das emoções e do processamento de informações sensoriais. Alterações no sistema límbico decorrentes da idade poderiam estar relacionados a mudanças no nível de ansiedade dos animais, as quais poderiam alterar a função das glândulas salivares.

A análise comportamental do nível de ansiedade de ratos adultos jovens e adultos, controles e submetidos ao estresse repetido por imobilização, mostrou que animais adultos apresentaram maior ansiedade em relação aos animais adultos jovens. Este efeito foi independente do estresse. Portanto, a maior produção de CSV em animais adultos poderia estar relacionada ao fato destes apresentarem maior nível de ansiedade do que animais adultos jovens. Isto, por sua vez poderia estar relacionado a uma maior secreção de glicocorticóides em animais adultos do que em animais jovens.

A secreção basal de glicocorticóides apresenta-se aumentada em roedores com 20 meses de idade e em humanos com 70-80 anos, o que poderia explicar algumas disfunções do hipocampo senil (SAPOLSKY, 1999). A secreção aumentada e prolongada de glicocorticóides em ratos velhos e uma maior

exposição aos glicocorticóides em humanos idosos por meio da antecipação de um estresse agudo, além das altas concentrações basais, geram um maior dano na cognição hipocampo-dependente (SAPOLSKY, 1999). Além disso, a presença de altos níveis de glicocorticóides parece induzir perda de volume do hipocampo durante o envelhecimento e em situações de estresse crônico (SAPOLSKY, 1999; SOMER *et al.*, 1993).

Entretanto como não podemos descartar a hipótese de que feromônios poderiam estar sinalizando a situação de estresse para os animais controle, os resultados referentes ao nível de ansiedade também poderiam significar que animais adultos seriam mais sensíveis à sinalização de alarme do que animais adultos jovens.

Isto novamente reforça a hipótese de que os animais controle estariam apresentando algum nível de estresse, provavelmente devido aos feromônios de alarme. Como a análise da secreção salivar e do nível de ansiedade não poderia ser feita duas vezes no mesmo animal, foi necessário a utilização de dois grupos, controle e estresse, independentes e não pudemos portanto utilizar a medida realizada antes da primeira sessão de imobilização como controle. Embora isto possa a princípio parecer um fator complicador para o desenvolvimento do modelo aqui proposto, acreditamos que isto nos esteja proporcionando a possibilidade de esclarecer o efeito de outros fatores, relacionados ao estresse, sobre a produção bucal de CSV.

Como nossa proposta foi o desenvolvimento de um modelo animal para avaliação das concentrações bucais de CSV após estresse, acreditamos que as dificuldades encontradas na análise e compreensão dos resultados obtidos se devem ao fato de termos proposto a análise de vários fatores simultaneamente (idade, estresse, dias e medidas). Isto requer uma complexa análise estatística dos dados, o que em alguns momentos dificulta a compreensão das variáveis que deveriam ser mantidas constantes ou não. A definição de novas metodologias envolve realmente tais dificuldades. Por outro lado, os protocolos aqui utilizados permitiram evidenciar que há interação entre o estresse e a idade, além de uma possível influência de feromônios de alarme, sobre a produção de CSV.

Concluindo, o presente estudo evidenciou a influência da idade e do estresse sobre a concentração bucal de CSV em ratos de laboratório. Também evidenciou a possibilidade de análise dos fatores que poderiam estar determinando as alterações observadas (fluxo e proteínas salivares). A partir de nossos dados, é necessário analisar isoladamente os fatores que influenciam a produção de CSV em ratos para refinar o modelo animal. Este poderá então ser utilizado como uma ferramenta complementar aos estudos em humanos, nos quais as complexas interações entre fatores fisiológicos, patológicos, sociais, emocionais e psicológicos dificultam a compreensão dos fatores que desencadeiam as alterações na homeostasia bucal.

7. CONCLUSÃO

É possível medir o efeito do estresse sobre a produção bucal de compostos sulfurados voláteis em ratos de laboratório. Porém os dados obtidos mostram que há necessidade de maiores estudos para caracterizar um modelo animal para avaliação da relação entre estresse e halitose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AL-MOHAISEN, M.; CARDOUNEL, A.; KALIMI, M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. **Steroids**, New York, v.65, n.1, p.8-15, Jan. 2000.

AMIR, E.; SHIMONOV, R.; ROSENBERG, M. Halitosis in children. **J Pediatr**, Saint Louis, v.134, p.338-343, 1999.

ANISHCHENKO, T.G.; GUDKOVA, E.V. Sex differences in sensitivity of albion rats to adrenaline. **Biull Eksp Biol Med**, Moskva, v.113, n.6, p.577-579, June 1992.

ATTIA, E.L.; MARSHALL, K.G. Halitosis. **Can Med Assoc J**, Ottawa, v.126, p.128-135, June 1982.

AXELROD, J.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, Washington, v.224, n.4648, p.452-459, May 1984.

BÁNKY, Z.; NAGY, G.M.; HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. **Neuroendocrinology**, Basel, v.59, n.1, p.63-71, Jan. 1994.

BAUM, B.J.; DRUMMOND, J.R.; NEWTON, J.P. The ageing mouth. *In*: DRUMMOND, J.R.; NEWTON J.P.; YEMM, R. (Ed.) **Dental care of the Elderly**. London : Mosby-Wolfe, 1995. p.41-52.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BOGDASARIAN, R.S. Halitosis. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v.19, n.1, p.101-117, Feb. 1986.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Orlando, v.72, p.248-254, May 1976.

BREIVIK, T. *et al.* Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.104, n.4, p.327-334, Aug. 1996.

CANNON, *et al.* Studies on the conditions of activity in endocrine glands. The role of adrenal excretion in the chemical control of body temperature. **Am J Physiol**, v.79, p.466-506, 1927.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. **JAMA**, Chicago, v.267, n.9, p.1244-1252, Mar. 1992.

COX, R.H. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. **J Appl Physiol**, Bethesda, v.58, n.4, p.1207-1214, Apr. 1985.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, New York, v.49, p.171-176, 1994.

CURETON, S.L. Premenstrual syndrome and dentistry. **Gen Dent**, Chicago, v.34, n.5, p.364-366, Sept./Oct. 1986.

DAWSON, G.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol Sci**, Barking, v.16, n.2, p.33-36, Feb. 1995.

ELI, I. *et al.* The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. **Psychosom Med**, Baltimore, v.58, n.2, p.156-159, Mar./Apr. 1996.

FÁBIÁN, T.K.; FÁBIÁN, G. Dental stress. *In*: FINK, G. (Ed.) **Encyclopedia of stress**. San Diego : Academic Press, 2000. v.1, p.657-659.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. *In*: ELLIOT, J.M.; HEAL, K.J.; MARSDEN, C.A. (Ed.) **Experimental approaches to anxiety and depression**. Chichester : John Wiley & Sons, 1992. p.25-44.

FOSDICK, L.S.; PIEZ, K.A. Chemical studies in periodontal disease X Paper chromatographic investigation of the putrefaction associated with periodontitis. **J Dent Res**, Washington, v.32, p.87-100, 1953.

FRASER, D.; RITCHIE, J.S.D.; FRASER, A.F. The term "stress" in a veterinary context. **Br Vet J**, London, v.131, n.6, p.653-662, Nov./Dec. 1975.

GARCIA – MARQUEZ, C.; ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav*, v.40, n.1, p.33-38, 1987.

GEMBA, H.; TERANAKA, A.; TAKEMURA, K. Influences of emotion upon parotid secretion in human. **Neurosci Lett**, Limerick, v.211, n.3, p.159-162, June 1996.

GREENMAN, J. Oral biofilms in health and disease. *In*: NEWMAN, H.N.; WILSON, M. **Dental plaque revisited**. Cardiff : BIOLINE, 1999. p.419-441.

GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet Immunol Immunopathol**, Amsterdam, v.20, n.3, p.263-312, Feb. 1989.

GROSSEN, N.E.; KELLEY, M.J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **J Comp Physiol Psychol**, Arlington, v.81, n.2, p.307-310, Nov. 1972.

GUHAD, F.A.; HAU, J. Salivary IgA as a marker of social stress in rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v.216, n.2, p.137-140, Sept. 1996.

HORAN, M.A.; BARTON, R.N.; LITHGOW, G. Biology of aging and stress. *In*: FINK, G. (Ed.) **Encyclopedia of stress**. San Diego : Academic Press, 2000. p.111-117.

KAUFMAN, A.Y. Aphthous stomatitis as a featuring syndrome of emotional stress in dental treatment. **Quintessence Int**, Berlin, v.7, n.9, p.75-79, Sept. 1976.

KIKUSUI, T. *et al.* Alarm pheromone enhances stress induced hyperthermia in rats. **Physiol Behav**, New York, v.72, n.1-2, p.45-50, Jan. 2001.

KLEINBERG, I.; WESTBAY, G. Salivary and metabolic factors involved in oral malodor formation. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.9, p.768-775, Sept. 1992.

KOLLER, M.M. *et al.* Desipramine changes salivary gland function, oral microbiota, and oral health in rats. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.408, n.1, p.91-98, Nov. 2000.

KOOB, G.F. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. **Biol Psychiatry**, New York, v.46, n.9, p.1167-1180, Nov. 1999.

KOOLHAAS, J.M. *et al.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neurosci Biobehav Rev**, New York, v.23, n.7, p.925-935, Nov.

1999.

KOPIN, I.J. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.771, p.19-30, Dec. 1995.

KVETŇASKY, R.; McCARTY, R. Immobilization stress. *In*: FINK, G. (Ed.) **Encyclopedia of stress**. San Diego : Academic Press, 2000. v.2, p.503-506.

LESCOAT, G. *et al.* Sex influences on the response on hte hypothalamo-hypophysio-adrenal axis to emotional and systemic stress in the rat. **C R Seances Soc Biol Fil**, Paris, v.164, n.10, p.2106-2113, 1970.

LIU, P.; DENNY, A.P.; DENNY, P. The effect of ageing on parenchymal cell populations in adult female mouse submandibular gland. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.45, n.7 p.585-592, July 2000.

MANDEL, I.D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.119, n.2, p.298-304, Aug. 1989.

MARCONDES *et al.* Stress – induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can J Physiol Pharmacol**, Ottawa, v.74, n.6, p.663-669, Jun. 1996.

MARPLE, D.N. *et al.* Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. **J Anim Sci**, Champaign, v.35, n.3, p.576-579, Sept. 1972.

MASON, J.W. A review of psychoendocrine on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom Med**, Baltimore, v.30, n.5, p.576-607, Sept./Oct. 1968a.

MASON, J.W. A review of psychoendocrine on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom Med**, Baltimore, v.30, n.5, p.631-653, Sept./Oct. 1968b.

McCARTAN, B.E.; LAMEY, P.J.; WALLACE, A.M. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.25, n.7, p.357-359, Aug. 1996.

McNAMARA, T.F.; ALEXANDER, J.F.; LEE, M. The role of microorganisms in the production of oral malodor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v.34, n.1, p.41-48, July 1972.

MILETIC, I.D. *et al.* Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. **Physiol Behav**, Elmsford, v.60, n.1, p.243-248, July 1996.

MIYAZAKI, H. *et al.* Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population. **J Periodontol**, Chicago, v.66, n.8, p.679-684, Aug. 1995.

MIZUNO, T.; KIMURA, F. Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v.222, n.1, p.49-52, Jan. 1997.

MORSE, D.R. *et al.* Stress, relaxation, and saliva: a pilot study involving endodontic patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.52, n.3, p.308-313, Sept. 1981

NATELSON, B.H. *et al.* Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiol Behav**, Elmsford, v.43, n.1, p.41-46, 1988.

NESSE, R.M.; YOUNG, E.A. Evolutionary origins and functions of the stress response. *In: FINK, G. (Ed.) Encyclopedia of stress.* San Diego : Academic Press, 2000. v.2, p.79-84.

ÖHAMN, A. Anxiety. *In: FINK, G. (Ed.) Encyclopedia of stress.* San Diego : Academic Press, 2000. v.1, p.226-231.

ÖSTMAN-SMITH, I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hipertrophy. **Acta Physiol Scand Suppl**, Oxford, v.447, p.1-118, 1979.

OTTENWELLER, J.E. Animal models (nonprimate) for human stress. *In: FINK, G. (Ed.) Encyclopedia of stress.* San Diego : Academic Press, 2000. v.1, p.200-205.

PARÉ, W.P.; REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiol Behav**, Elmsford, v.54, n.6, p.1179-1185, Dec. 1993.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in na elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **J Neurosci Methods**, Amsterdam, v.14, n.3, p.149-167, Aug. 1985.

PICKERING, A.D. The concept of biological stress. *In: PICKERING, A.D. (Ed.) Stress and fish.* New York : Academic Press, 1981.

POPOVIC, M.; POPOVIC, N. Estrus cycle and gastric lesions in individual- and group-stressed female rats. **Int J Psychophysiol**, Amsterdam, v.33, n.1, p.21-26, July 1999.

PRETI, G. *et al.* Non-oral etiologies of oral malodor and altered chemosensation. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.9, p.790-796, Sept. 1992.

QUEIROZ, C.S. *et al.* Relação entre estresse e compostos de enxofre voláteis - um estudo em rato de laboratório. 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Águas de São Pedro – SP, **Anais**, 1999

RICHTER, J.L. Diagnosis and treatment of halitosis. **Compend Contin Educ Dent**, Newtown, v.17, n.4, p.370-390, Apr. 1996.

RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. **Neuroendocrinology**, Basel, v.11, n.1, p.1-10, 1973.

ROSENBERG, M. Bad breath: diagnosis and treatment. **Univ Tor Dent J**, Toronto, v.3, n.2, p.7-11, Spring 1990.

ROSENBERG, M. *et al.* Day-long reduction of oral malodor by a two-phase oil: water mouthrinse as compared to chlorhexidine and placebo rinses. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.1, p.39-43, Sept. 1992

ROSENBERG, M. *et al.* Reproducibility and sensitivity of oral malodour measurements with a portable sulfide monitor. **J Dent Res**, Washington, v.70, n.11, p.1436-1440, Nov. 1991.

ROSENBERG, M. *et al.* Self-estimation of oral malodor. **J Dent Res**, Washington, v.74, n.9, p.1577-1582, Sept. 1995

ROSENBERG, M.; McCULLOCH, C.A. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.9, p.776-782,

Sept. 1992.

SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. **Exp Gerontol**, Tarrytown, v.34, n.6, p.721-732, Sept. 1999.

SAPOLSKY, R.M. Stress in the wild. **Sci Am**, New York, v.262, n.1, p.116-113, Jan. 1990.

SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; McEWEN, B. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade Hypothesis. **Endocr Rev**, Baltimore, v.7, n.3, p.284-301, Aug. 1986.

SCHUBERT, M.M.; IZUTSU, K.T. Iatrogenic causes of salivary gland Dysfunction. **J Dent Res**, Washington, v.66, p.680-688, Feb. 1987.

SCULLY, C.; PORTER, S.; GREENMAN, J. What to do about halitosis. **BMJ**, London, v.22, 308, n.6923, p.217-218, Jan. 1994.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, London, v.138, n.1, p.32, 1936.

SERVATIUS, R.J. *et al.* Restraint stress. *In*: FINK, G. (Ed.) **Encyclopedia of stress**. San Diego : Academic Press, 2000. v.3, p.376-377.

SHIMURA, M. *et al.* A new monitor with a zinc-oxide thin film semiconductor sensor for the measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. **J Periodontol**, Chicago, v.67, n.4, p.396-402, Apr. 1996.

SHORS, T.J. *et al.* Stages of estrous mediate the stress-induced impairment of associative learning in the female rat. **Neuroreport**, Oxford, v.9, n.3, p.419-423,

Feb. 1998.

SOMER, E.; BEM-ARYEH, H.; LAUFER, D. Salivary composition, gender and psychosocial stress. **Int J Psychosom**, Philadelphia, v.40, n.1-4, p.17-21, 1993.

SZABO, S.; GLAVIN, G.B. Hans Selye and the concept of biologic stress. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.597, p.14-16, 1990.

TONZETICH, J. *et al.* Volatility as a factor in the inability of certain amines and indole to increase the odor of saliva. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.12, n.10 p.1167-1175, Oct. 1967.

TONZETICH, J. Production and origin of oral malodor. **J Periodontol**, Chicago, v.48, n.1, p.13-20, Jan. 1977.

TONZETICH, J., CARPENTER, P.A. Production of volatile sulphur compounds from cysteine, cystine and methionine by human dental plaque. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.16, n.6, p.559-667, June 1971.

TONZETICH, J.; McBRIDE, B.C. Characterization of volatile sulphur production by pathogenic and nonpathogenic strains of oral bacteroides. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.26, n.12, p.963-969, 1981.

TONZETICH, J.; PRETI, G.; HUGGINS, G.R. Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cycle. **J Int Med Res**, Northampton, v.6, n.3, p.245-254, 1978.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, New York, v.31, p.959-962, 1989.

VAN DER KAR, L.D.; RICHARDSON-MORTON, K.; RITTENHOUSE, P.A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Achiev Exp Pathol**, Basel, v.14, p.133-173, 1991.

VANDERBERGH, J.G. Acceleration and inhibition of puberty in female mice by pheromones. **J Reprod Fertil Suppl**, Colchester, v.19, p.411-419, Dec.1973.

VOGEL, W.H.; JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v.87, n.1-2, p.183-188, Apr. 1988.

WALER, S.M. On the transformation of sulfur-containing amino acids and peptides to volatile sulfur compounds (VSC) in the human mouth. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.105, p.534-537, Oct. 1997a.

WALER, S.M. The effect fo some metal ions on volatile sulfur compounds originating from the oral cavity. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.55, n.4, p.261-264, Aug. 1997b.

WILSON, E. Enemy specification in the alarm-recruitment system of na ant. **Science**, Washington, v.190, n. 4216, p.798-800, Nov. 1975.

YAEGAKI, K.; SANADA, K. Biochemical and clinical factors influencing oral malodor in periodontal patients. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.9, p.783-789, Sept. 1992.