



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



AUGUSTO RODRIGUES LIMA

***Relação entre estresse associado a atividades  
acadêmicas, contraceptivos orais e  
homeostasia bucal***

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Klein Marcondes

Co-Orientadora: Patrícia de Oliveira Lima

Piracicaba

2012

AUGUSTO RODRIGUES LIMA

***Relação entre estresse associado a atividades  
acadêmicas, contraceptivos orais e  
homeostasia bucal***

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Klein Marcondes

Co-Orientadora: Patrícia de Oliveira Lima

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Lima, Augusto Rodrigues, 1991-

L628r

Relação entre estresse associado a atividades acadêmicas, contraceptivos orais e homeostasia bucal / Augusto Rodrigues Lima. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.

Coorientador: Patrícia de Oliveira Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cortisol. 2. Proteínas salivares. I. Marcondes, Fernanda Klein, 1970- II. Lima, Patrícia de Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

## **Resumo**

A halitose é caracterizada pela emissão de odores desagradáveis da cavidade oral, causando constrangimento aos portadores dessa condição. Na maioria dos casos sua origem está relacionada à ação de bactérias anaeróbicas gram-negativas, na cavidade bucal, as quais degradam aminoácidos contendo enxofre, produzindo compostos sulfurados voláteis (CSV). Entretanto, muitos pacientes queixam-se de mau hálito e não apresentam causas clínicas evidentes. Diante disso, alterações emocionais, como o estresse e a ansiedade, têm sido relacionadas à sua produção, embora haja poucos estudos sobre esta relação. As variações hormonais do ciclo menstrual, somadas a tensões emocionais, que parecem se intensificar durante o período pré-menstrual, podem ser consideradas potentes agentes estressores para o sexo feminino além de induzirem alterações na microbiota oral que podem influenciar o aparecimento da halitose. Entretanto, pouco é conhecido sobre a influência dos contraceptivos orais sobre a homeostasia bucal e sua relação com as alterações emocionais. Assim, nosso objetivo é investigar a relação entre alterações emocionais associadas a atividades acadêmicas e produção de compostos sulfurados voláteis, em mulheres usuárias de contraceptivos orais.

**Palavras chave:** estresse, contraceptivos orais, compostos sulfurados voláteis e proteínas salivares

## **Abstract**

Halitosis is the emanation of malodours from the oral cavity and can have major detrimental social implications for the sufferer and significant impact on normal social interactions. In most cases, their origin is related to the action of Gram-negative anaerobic bacteria in the oral cavity, which degrade sulfur-containing amino acids, producing volatile sulfur compounds (VSC). However, many patients complain about bad breath and do not show obvious clinical cause. So, emotional changes, such as stress and anxiety, have been related to its production, although there are few studies about this relationship. Hormonal changes of menstrual cycle, combined with emotional tensions, which seem to be intensified during the premenstrual period, can be considered potent stressor agents to the female beyond induce changes in oral

microbiota that may cause halitosis. However, little is known about the influence of oral contraceptives on the oral homeostasis and its relationship with emotional changes. Thus, our aim is to investigate the relationship between emotional changes, associated with academic activities, and volatile sulfur compounds production, in women using oral contraceptives.

**Key words:** stress, oral contraceptives, volatile sulfur compounds and salivary proteins

## **Sumário**

1. Introdução.....	07
2. Revisão da literatura.....	09
3. Proposição.....	11
4. Materiais e Métodos.....	12
5. Resultados.....	15
6. Discussão.....	17
7. Conclusão.....	25

## 1. Introdução

A halitose, também conhecida por mau odor ou mau hálito, é uma condição relativamente comum, que atinge grande parcela da população, e causa constrangimento a seus portadores, prejudicando o convívio social entre estes e os indivíduos com os quais se relacionam (Rosenberg & Culloch, 1992; Calil & Marcondes, 2006).

Embora na maioria dos casos, a halitose tenha origem bucal, o estresse também tem sido sugerido como um fator predisponente ao mau hálito, já que muitas vezes o paciente não apresenta nenhuma evidência clínica de patologias bucais ou desordens sistêmicas que justifiquem a presença do mau hálito. O comprometimento da homeostasia bucal pela ansiedade e o estresse têm sido evidenciada por sua associação a reações alérgicas, inflamações bucais, úlcera aftosa recorrente (Fábián e Fábián, 2000) e doenças periodontais (Attia & Marshal, 1982.). E, com relação à produção de CSV, foi demonstrado que estímulos estressores podem aumentar a produção bucal de CSV em animais de laboratório (Kurihara & Marcondes, 2002) e em indivíduos saudáveis (Queiroz et al., 2002; Calil & Marcondes, 2006). Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, observou-se que a ansiedade experimental induzida pelo Stroop Color Test induziu aumento dos CSV em homens (Calil *et al.*, 2006). E esta alteração foi associada a aumento da concentração salivar de alfa-amilase, que é considerada um marcador da atividade simpática e de estresse (Sôo-Quee e Choon-Huat, 2007, Nater e Rohleder, 2009, Lima *et al.*, 2012a, c). Por outro lado, neste mesmo estudo não evidenciamos alteração nos níveis de cortisol salivar, sugerindo ativação somente do eixo sistema nervoso simpático – medula suprarrenal, sem ativação do eixo hipotálamo – hipófise – adrenal nesta situação de estresse agudo (Lima *et al.*, 2012c).

Além do estresse, estudos têm mostrado que as oscilações hormonais características do ciclo menstrual e a síndrome pré-menstrual podem afetar a homeostasia bucal, com implicações para o tratamento odontológico. Nas décadas de 60 e 70 alguns autores sugeriram que as oscilações entre estrógeno e progesterona poderiam estar relacionadas a aumento de exudato gengival, descamação de células epiteliais da cavidade oral e também ao aparecimento da

halitose (Loe & Silness 1963; Lindhe & Attstrom 1967; Lindhe et al, 1969; Tonzetich et al., 1978). Entretanto, curiosamente, nos 10 anos seguintes houve poucos artigos sobre a relação entre ciclo menstrual e alterações bucais. Foi relatado que a incidência de herpes simples, estomatite herpética recorrente e úlceras aftosas, apertamento ou ranger dos dentes se torna maior no período pré-menstrual (Cureton, 1986). Em 2002, Queiroz et al. observaram que mulheres com síndrome pré-menstrual apresentaram maior produção de CSV durante as fases pré-menstrual e menstrual em relação à fase não menstrual. Porém, embora possamos considerar que, em mulheres, as flutuações hormonais acompanhadas de estresse e ansiedade poderiam alterar a homeostasia bucal, ainda não há trabalhos suficientes para esclarecer os mecanismos pelos quais o ciclo menstrual e situações ansiogênicas podem interferir na produção de CSV.

Estes efeitos parecem estar relacionados a efeitos dos hormônios sexuais já que estudos das décadas de 60 e 70 relataram a indução de doenças gengivais pelo uso de CO. Estudos clínicos relataram maior prevalência de inflamação gengival (Lindhe & Björn, 1967; El Ashiry et al., 1970), perda de inserção periodontal (Das et al., 1971a,b; Knight & Wade, 1974) e ampliação gengival (afetando aparência e função) (Kaufman, 1969) em usuárias de CO comparadas às que não fazem uso desse medicamento. Entretanto, estes resultados são baseados em estudos que foram realizados há mais de 30 anos, quando os contraceptivos orais apresentavam altas doses de estrógenos e progestágenos, sendo que os contraceptivos hormonais atuais apresentam baixas dosagens hormonais.

As alterações emocionais podem ser de origem aguda ou crônica. Alguns autores têm estudado alterações induzidas por atividades acadêmicas e outros fatores associados ao curso de Graduação como uma situação de estresse crônico. Foi observado que profissionais da saúde apresentam altos níveis de ansiedade (Newbury-Birch et al., 2002; Bérzin, 2007), e que este fenômeno parece ter início durante a sua formação acadêmica.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o nível de estresse e a produção de CSV em alunas do curso de graduação em Odontologia da FOP – UNICAMP, usuárias de contraceptivos orais.

## 2. Revisão da Literatura

O mau hálito pode ser originado de fatores intra e extra-orais, tais como higiene bucal deficiente, gengivite, periodontite, inflamação nasal, sinusite crônica, diabetes mellitus, cirrose hepática, úlceras gastrointestinais, dentre outras (Attia & Marshal, 1882). Na maioria dos casos, a halitose tem origem na cavidade oral (cerca de 90%), sendo que em 40% dos casos a origem desta condição se deve à formação de saburra lingual, principalmente no terço posterior do dorso da língua (Springfield et al., 2001; Calil et al., 2006).

Um método que tem se mostrado bastante eficaz para medir o estresse e a ansiedade, é a quantificação de cortisol na saliva. Sabe-se que a ansiedade e o estresse estimulam a secreção do hormônio cortisol pelo córtex da glândula supra-renal. Como há uma relação direta entre os níveis de alguns hormônios e medicamentos na saliva e no sangue, em vários estudos a dosagem salivar de cortisol tem sido utilizada devido à simplicidade na coleta da amostra e sensibilidade do método. Ao contrário, a coleta de sangue requer profissionais especializados e gera maior estresse devido à apreensão gerada pelo medo da agulha (Akyuz et al., 1996). Além disso, McCartan et al. (1996) encontraram correlação positiva entre ansiedade e a concentração de cortisol salivar.

Além do cortisol, a enzima salivar alfa-amilase tem sido proposta como um marcador da atividade simpática induzida pelo estresse (Rohleder et al., 2006; Soo-Quee & Choon-Huat Koh 2007), tendo sido observados aumentos significativos na concentração salivar de alfa-amilase em resposta a situações ansiogênicas, tais como exame acadêmico (Bosch et al., 1996), apresentação de vídeos com cenas desagradáveis (Bosch et al., 2003), e estressores laboratoriais (Granger et al., 2006). Porém, Wolf et al. (2007), observaram que o estresse crônico por asma, em crianças, diminuiu as concentrações de alfa amilase e Bosh et al. (2003), não encontram alterações nas concentrações dessa enzima salivar após um teste de memória. Assim, embora tenha sido proposto que a avaliação da concentração salivar de alfa-amilase poderia auxiliar na compreensão de mecanismos envolvidos na fisiologia do estresse, funções comportamentais e cognitivas (Granger

ET al., 2007), o estudo da relação entre a secreção de alfa-amilase e estresse requer estudos complementares.

No que concerne às alterações emocionais, alguns autores têm estudado alterações induzidas por atividades acadêmicas e outros fatores associados ao curso de Graduação como uma situação de estresse crônico. Foi observado que profissionais da saúde apresentam altos níveis de ansiedade (Newbury-Birch et al., 2002; Bérzin, 2007). Barberia et al. (2004) relataram que a ansiedade em estudantes de Odontologia não apresenta a mesma intensidade e característica em todos os anos da graduação, modificando-se de acordo com as condições curriculares e sociais.

O aprendizado de profissões na área da saúde tem sido associado a alguns estressores, como pressão a todo tempo, necessidade de memorização de grande quantidade de informações, freqüentes avaliações, problemas financeiros para realizar o curso e tempo limitado para o lazer (Vitaliano et al., 1984), conduzindo a desordens de ansiedade e depressão. Além disso, características de personalidade, como perfeccionismo severo, comum em profissionais da saúde, têm sido associadas a um maior risco de desordens psicológicas nestes profissionais, tornando-os mais ansiosos em comparação com a população em geral (Henning et al., 1998).

Além disso, várias características do indivíduo, tais como o sexo, o ciclo reprodutivo, as características genéticas e a idade podem influenciar a reação de estresse e o estado de ansiedade (Bánky et al., 1994; Horan, 2000). Peretz & Mann (2000) observaram que características do gênero também podem influenciar os níveis de ansiedade. Neste contexto, estes autores relataram que estudantes universitárias de uma Faculdade de Odontologia de Israel apresentaram maiores níveis de ansiedade quando comparadas aos estudantes do gênero masculino.

Preshaw et al. (2001), utilizando um modelo experimental de ansiedade, estudaram o efeito de CO sobre a resposta inflamatória da gengiva à placa. Estes autores não observaram diferenças significativas entre usuárias e não usuárias de CO nos parâmetros avaliados (índice gengival, índice de placa e fluido gengival crevicular). Klinger et al. (1998) também relataram que anticoncepcionais de

baixas concentrações de estrógeno parecem não ter efeito sobre a saúde periodontal. Porém, outros autores observaram aumento na perda de inserção óssea associado ao uso de CO (Soory, 2000) e maiores índices de inflamação gengival (Haerian-Arkadani et al., 2010). Estes efeitos podem estar relacionados a alterações na microvasculatura, na permeabilidade capilar e na resposta inflamatória (Lindhe et al., 1967, Lindhe & Branemark, 1967). Logo, faz-se necessário esclarecer os efeitos dos CO sobre a homeostasia bucal.

Em relação ao efeito dos CO sobre a resposta fisiológica ao estresse psicossocial, Kirschbaum et al. (1999) observaram menor resposta do cortisol livre frente a estressores psicossociais ou físicos em mulheres usuárias de CO em comparação a mulheres na fase lútea do ciclo e a homens, sem diferença significativa em relação a mulheres na fase folicular do ciclo. Entretanto, ainda é desconhecido se essa menor resposta ocorre devido a hiporreatividade do eixo HPA relacionado ao uso de CO ou se usuárias de CO secretam quantidades similares de cortisol, mas devido à maior produção de globulina transportadora de glicocorticóides, promovida pelo estrógeno, a fração biologicamente ativa de cortisol livre se torna reduzida (Kirschbaum et al., 1999). Além disso, poucos estudos têm avaliado o efeito de contraceptivos orais sobre a ativação simpática em resposta a estressores. Nesse sentido, Ward et al. (2004), observaram que mulheres usuárias de contraceptivos orais, apresentaram valores de pressão arterial média, frente a um estressor laboratorial, semelhantes às mulheres não usuárias, em diferentes fases do ciclo menstrual.

### **3. Proposição**

Estudar o efeito do estresse relacionado a atividades do curso de graduação sobre o nível de ansiedade, a concentração bucal de compostos sulfurados voláteis, pressão arterial, frequência cardíaca, fluxo salivar, secreção salivar de cortisol e alfa-amilase em alunas usuárias de contraceptivos orais dos 4 anos do curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP).

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Seleção dos voluntários**

Alunas do primeiro ao quarto anos (mulheres, usuárias de CO) do curso de Graduação em Odontologia da FOP – UNICAMP foram convidadas a participar deste estudo. Todas as que se dispuseram a participar do trabalho foram submetidas a uma anamnese e exame clínico intra-oral. As voluntárias selecionadas foram aquelas que não apresentaram doenças periodontais, cáries, língua saburrosa, próteses, aftas e/ou ulcerações, alterações sistêmicas e/ou naso-faríngeas e respiração bucal já que todos esses fatores podem favorecer a produção dos CSV do hálito.

O número de alunas selecionadas foi estabelecido após assessoria estatística e foi vinculado ao número de mulheres presentes em cada ano da Graduação. As voluntárias faziam uso de CO por um período maior do que seis meses, sendo que também não apresentaram descontinuação da ingestão do mesmo durante os últimos seis meses. Todas faziam uso de CO que apresentassem uma combinação de estrógeno/progesterona em baixas concentrações desses hormônios. A coleta de dados e amostras foi realizada durante o período equivalente à fase menstrual do ciclo para cada voluntária para padronização das avaliações e porque este projeto está vinculado a um projeto principal no qual estão sendo avaliadas mulheres que não fazem uso de anticoncepcional. E, nestas voluntárias, as análises são realizadas durante a fase menstrual do ciclo.

As voluntárias passaram por avaliação psicológica realizadas por uma Psicóloga, que aplicou o *Beck Hopelessness Scale* (BHS) para avaliação do nível de ansiedade.

### **4.2. Delineamento Experimental**

As voluntárias foram solicitadas a comparecer ao Laboratório de Estresse da FOP – UNICAMP no início da manhã, em jejum. Inicialmente, foi feita a determinação da pressão arterial e frequência cardíaca, coleta de saliva e mensuração dos CSV. Em seguida, as amostras foram armazenadas para

determinação das concentrações de cortisol, alfa-amilase e fluxo salivar.

Foi coletada a saliva das voluntárias em três dias consecutivos, para dosagem do hormônio cortisol, considerado um marcador sensível do estresse. As avaliações em voluntárias foram feitas por dois meses consecutivos, sendo que no primeiro dia de coleta todas as variáveis acima citadas foram avaliadas e nos próximos dois dias apenas a coleta de saliva foi realizada.

Como a mediada de CSV requer uma padronização, que consiste em condição de jejum, e sabendo que todas as voluntárias iniciam suas aulas às 8:00 h da manhã, foi realizado no máximo dois experimentos por dia, para evitar atrasos em suas atividades acadêmicas. Terminando o experimento, foi oferecido um café da manhã completo nas dependências do departamento de Ciências Fisiológicas. Cuidado foi tomado para que tais avaliações não ocorressem em dias de prova, ou atividades de que induzissem ansiedade, tais como seminários e atividade clínica, conforme indicação das próprias voluntárias.

#### **4.3. Avaliação psicológica**

As voluntárias foram solicitadas a comparecer a uma avaliação clínica com uma psicóloga, a qual foi realizada, durante o horário de almoço. Foi aplicada a Escala Beck de Desesperança - BHS (*Beck Hopelessness Scale*), utilizada como medida da dimensão do pessimismo e da extensão de atitudes negativas frente ao futuro (Cunha, 2001).

#### **4.4. Determinação da pressão arterial e frequência cardíaca**

A determinação da pressão arterial foi feita utilizando-se um monitor digital (Digital Blood Pressure Monitor, *Pro Check*), devidamente calibrado. Esta avaliação foi realizada como medida complementar para avaliar o nível de estresse das voluntárias, já que a ativação simpática desencadeada por estímulos estressores resulta em aumento da atividade cardíaca e da resistência periférica. Foram determinados os valores de frequência cardíaca, pressão arterial média, sistólica e diastólica.

#### **4.5. Medida do fluxo salivar**

Foi feita a coleta de saliva não estimulada, de acordo com Tárzia (2003). A voluntária foi orientada a deglutir a saliva, que se encontrava na boca, e em seguida, depositar no frasco toda a saliva que fosse secretada durante os cinco minutos seguintes. O volume obtido foi dividido por cinco e o resultado, apresentado em mL/min. A saliva coletada foi centrifugada, e o sobrenadante armazenado em recipientes plásticos esterilizados, e colocados em gelo para sua conservação durante o transporte até armazenagem em freezer, para posterior dosagem de cortisol (-20°C) e alfa-amilase (-70°C).

#### **4.6. Medida dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)**

Todos as voluntárias selecionados apresentaram-se nos dias determinados às 7:00 h, nas seguintes condições: não ter realizado nenhum tipo de higiene bucal, em jejum de 8 horas, não ter ingerido alimentos condimentados (alho, cebola, salame, pickles) no dia anterior ao experimento e não ter utilizado perfumes, colônias, e outros compostos com derivados alcoólicos, no dia do experimento. A mensuração dos CSV foi realizada utilizando-se um Halímetro (*Halímetro RK17K, n de série H15248*, Interscan Co), de acordo com o protocolo descrito por Queiroz *et al.* (2002) e Calil & Marcondes (2006). Primeiramente foi solicitado que a voluntária permanecesse com a boca fechada por um minuto. Em seguida, uma cânula de plástico foi introduzida na cavidade bucal da voluntária, que permaneceu com a boca entreaberta aproximadamente 1,5cm e recebeu orientações para não mover a língua e os lábios durante a coleta, para evitar que os mesmos tocassem a cânula e interrompessem a sucção do ar bucal pelo aparelho. A respiração foi interrompida durante a coleta, sendo que a voluntária foi orientada a retornar a respirar caso sentisse algum desconforto. O ar expirado é levado ao interior do aparelho via cânula por sucção, passando através de um sensor eletroquímico o qual efetua a contagem das moléculas dos CSV presentes na amostra de ar coletado, sendo o calor expresso em ppb através de um monitor digital. Foram anotados dois valores, e posteriormente foi feito uma média.

#### **4.7. Dosagens Bioquímicas**

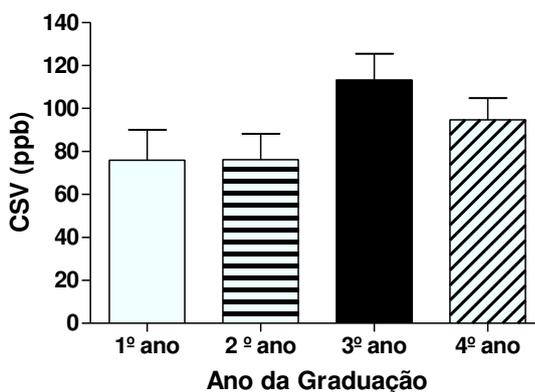
Como índices de estresse foram determinadas as concentrações salivares de alfa amilase por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais da Salimetrics (O'Donnel *et al.*, 2009). Ainda podemos determinar as concentrações salivares de cortisol por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais da Salimetrics (Calil *et al.*, 2008), já que tivemos problemas na importação dos kits de dosagem.

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados foram analisados por análise de variância com o modelo apropriado para experimentos inteiramente casualizados considerando-se o nível de significância de 0,05%.

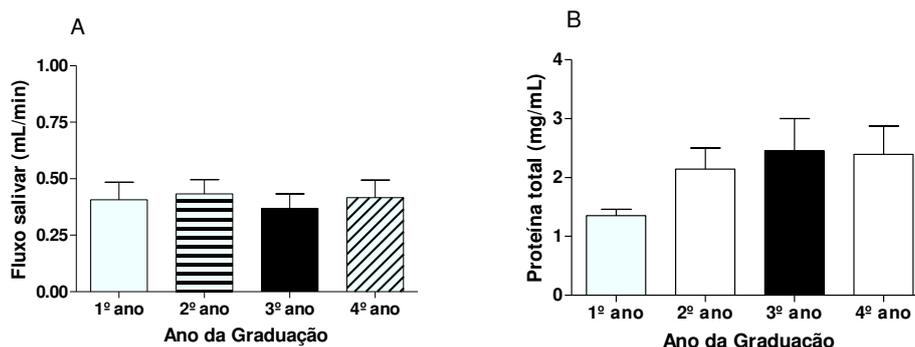
### **5. Resultados**

Em relação aos compostos sulfurados voláteis (Figura 1) os dados mostram que houve uma tendência a aumento na concentração bucal de CSV em alunas do terceiro ano, em relação aos demais, porém esta diferença não foi significativa ( $p>0,05$ ).



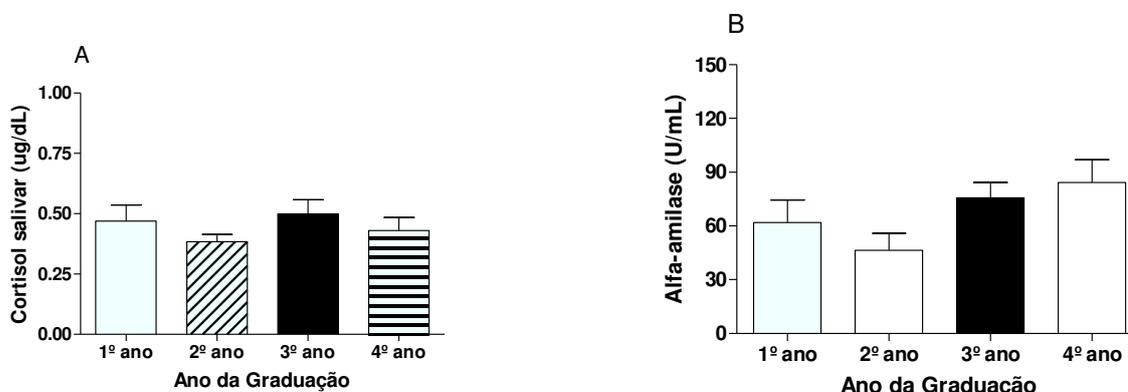
**Figura 1.** Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis de alunas dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N=12 no primeiro ano, 13 no segundo ano, 14 no terceiro ano e 15 no quarto ano da graduação.

Não foi observada alteração significativa do fluxo salivar (Figura 2A), entre alunas dos quatro anos do curso de graduação ( $p>0,05$ ). Houve tendência de aumento da concentração salivar de proteínas no segundo, terceiro e quarto anos em relação ao primeiro ano, porém as diferenças observadas não foram significativas estatisticamente ( $p > 0,05$ ; Figura 2B).



**Figura 2.** Fluxo salivar (A) e concentração salivar de proteína total (B) em alunas dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N=12 no primeiro ano, 13 no segundo ano, 14 no terceiro ano e 15 no quarto ano da graduação.

Com relação às concentrações salivares de cortisol (Figura 3A), os dados mostraram que não houve diferença significativa entre alunas cursando os quatro anos da graduação em Odontologia ( $p>0,05$ ). Houve uma tendência de aumento na concentração salivar de alfa-amilase no terceiro e quarto anos em relação aos dois primeiros anos do curso de graduação, porém não houve diferença significativa (Figura 3B)



**Figura 3.** Concentração salivar de cortisol (A) e de Alfa-amilase (B) de alunas dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N=12 no primeiro ano, 13 no segundo ano, 14 no terceiro ano e 15 no quarto ano da graduação.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, podemos observar que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados (pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca), entre as alunas dos quatro anos de graduação ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Parâmetros cardiovasculares de alunas dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP.

Parâmetros Cardiovasculares	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	108 ± 3	114 ± 3	110 ± 1	112 ± 2
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	72 ± 2	77 ± 2	73 ± 1	73 ± 1
Pressão Arterial Média (mmHg)	84 ± 2	89 ± 2	82 ± 3	86 ± 2
Frequência cardíaca (bpm)	80 ± 2	82 ± 2	79 ± 2	81 ± 2

N=12 alunas no primeiro ano, 13 no segundo ano, 14 no terceiro ano e 15 no quarto ano da graduação;  $p > 0,05$ .

Pode-se observar na Tabela 2 que a maioria das alunas avaliadas neste estudo apresenta nível mínimo de sentimento de pessimismo e atitudes negativas frente ao futuro durante os dois primeiros anos do curso. No terceiro e quarto anos do curso de graduação observam-se alunas com nível mínimo e com nível leve de desesperança.

**Tabela 2** - Classificação dos escores da *Beck Hopelessness scale* (BHS) apresentados por estudantes do sexo feminino, usuárias de anticoncepcional oral, de acordo com o ano do curso de Graduação.

Escore	Nível	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano
0-4	Mínimo	12	13	9	11
5-8	Leve	0	0	5	4
9-13	Moderado	0	0	0	0
14-20	Grave	0	0	0	0

N=12 alunas no primeiro ano, 13 no segundo ano, 14 no terceiro ano e 15 no quarto ano da graduação.

## 6. Discussão

A halitose pela manhã, ao acordar, é uma condição fisiológica conhecida como halitose matinal. Essa condição provavelmente ocorre devido à diminuição do

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

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

Em relação à doença periodontal, tem sido observado que os CSV podem acelerar a destruição do tecido periodontal, o que pode explicar a razão de muitos pacientes frequentemente queixarem-se de mau hálito (Moritta & Wang, 2001). Diante disso, Yaegaki & Sanada (1992) indicaram que a saliva de pacientes com doença periodontal contém altas concentrações de 2-quetobutirato, um metabólito intermediário na conversão de metionina para  $\text{CH}_3\text{SH}$ . Assim, pacientes com doença periodontal poderiam apresentar uma rápida conversão deste metabólito em um dos principais CSV responsáveis pela geração da halitose (Tsai *et al.*, 2008).

Entretanto, em alguns casos, o paciente não apresenta causas intra ou extra-orais que possam justificar a presença de halitose causando grande constrangimento para o cirurgião-dentista que não consegue encontrar solução para o problema. Assim, fatores emocionais como o estresse e a ansiedade também têm sido relacionados à produção de CSV e consequente halitose, porém existem

poucos estudos sobre esta relação (Eli *et al.*, 1996; Queiroz *et al.*, 2002; Kurihara & Marcondes, 2002; van den Broek *et al.*, 2007, Lima *et al.*, 2012 a,c).

No presente estudo não foram observadas alterações nos valores de CSV das voluntárias entre os anos do curso de graduação. No entanto, outro estudo de nosso grupo de pesquisa, em desenvolvimento (Lima, comunicação pessoal), no qual alunas que não faziam o uso de contraceptivos orais foram avaliadas, observou-se que alunas do terceiro ano da graduação apresentaram maiores concentrações bucais de CSV em relação a alunas do primeiro, segundo e quarto anos da graduação. Também foi analisado esse parâmetro em alunos do sexo masculino alunos do terceiro ano do curso de graduação também apresentaram aumento da concentração bucal de CSV em relação aos demais anos (Lima *et al.*, 2012b). Assim comparando-se os dados obtidos, é possível verificar que o presente estudo sugere que a não ocorrência da oscilação hormonal decorrente do ciclo menstrual, em usuárias de contraceptivos orais poderia impedir a alteração na produção de CSV decorrente de estresse. Este dados estão de acordo com Ward *et al.* (2004), que relataram ausência de alteração da pressão arterial média em usuárias de CO em resposta a um estressor laboratorial.

Por outro lado, Preshaw *et al.* (2001), utilizando um modelo experimental de ansiedade, estudaram o efeito de contraceptivos orais sobre a resposta inflamatória da gengiva à placa. Estes autores não observaram diferenças significativas entre usuárias e não usuárias de contraceptivos orais nos parâmetros avaliados (índice gengival, índice de placa e fluido gengival crevicular). Klinger *et al.* (1998) também relataram que anticoncepcionais de baixas concentrações de estrógeno parecem não ter efeito sobre a saúde periodontal.

É importante ressaltar que no presente estudo, as voluntárias são saudáveis oralmente, conforme observado através de exame clínico oral. Assim, não seriam esperadas alterações gengivais decorrentes do uso de anticoncepcionais em nossas alunas e, ao contrário, este medicamento poderia apresentar um papel protetor na homeostasia oral, em decorrência da manutenção constante dos hormônios sexuais estrógeno e progesterona, durante todo o ciclo menstrual. Entretanto, esta hipótese necessita de mais estudos para ser confirmada.

Um dos fatores que contribui para a ocorrência da halitose é a redução do fluxo salivar (Shinjiro *et al.*, 2003). A redução do fluxo salivar enfraquece os mecanismos de limpeza mecânica da cavidade bucal e predispõe a flora bucal ao crescimento e proliferação de microrganismos gram-negativos responsáveis pelo mau odor (Messadi *et al.*, 1997).

O fluxo salivar é o grande responsável pela verdadeira saúde bucal. Vários fatores podem contribuir para alteração de nosso fluxo salivar, como a idade avançada, além de outros fatores xerostômicos. A saliva pode sofrer alterações de volume, viscosidade e densidade, sendo que qualquer uma destas alterações irá causar um desequilíbrio na cavidade bucal, tanto no hálito, quanto favorecendo a formação de cáries e outras desordens, as quais geram um enorme desconforto para os portadores de hipossalivação (Epstein, 2001).

A saliva é constituída predominantemente por água (97-99,5%) originada do plasma, presente na célula acinar, além de conter constituintes orgânicos e inorgânicos (Chicharro *et al.*, 1998). O controle da secreção salivar é mediado por uma ação combinada de estímulos simpáticos e parassimpáticos. A inervação parassimpática provoca vasodilatação, o que aumenta a quantidade e a fluidez da saliva contendo baixos níveis de compostos orgânicos e inorgânicos. A inervação simpática provoca vasoconstrição, o que confere um baixo volume do fluxo salivar, porém contém elevados níveis de proteínas, especialmente  $\alpha$ -amilase, e compostos inorgânicos. Este estímulo faz com que a saliva se torne mais viscosa (Schneyer, 1976; Dennis & Young, 1978).

Entretanto, nossos resultados mostraram que não houve alteração, neste parâmetro, entre alunas cursando os quatro anos do curso. Esse resultado está de acordo com os resultados observados para os CSV, em que nenhuma diferença significativa foi observada, denotando os mecanismos de controle do organismo para manutenção da homeostasia oral.

A Escala Beck de Desesperança – BHS (*Beck Hopelessness Scale*) tem sido utilizada como medida da dimensão do sentimento de pessimismo e da extensão de atitudes negativas frente ao futuro (Cunha, 2001). A interpretação diagnóstica dos escores é feita a partir de uma classificação que considera os seguintes níveis:

Mínimo, Leve, Moderado e Grave. No presente estudo, as voluntárias apresentaram níveis mínimo ou leve de desesperança, o que sugere ausência de estresse e ansiedade, o que poderia explicar a não alteração dos parâmetros cardiovasculares e CSV.

A saliva é composta por grande número de proteínas que participam na proteção dos tecidos orais, como lisozima, lactoferrina, imunoglobulinas, aglutininas e mucinas (Nieuw Amerongen e Veermaan, 2002). Como elas apresentam um amplo espectro de ação contra diversos microrganismos, parecem apresentar considerável funcionalidade. Este conhecimento é relevante pelo fato de que a susceptibilidade a doenças orais podem não estar relacionadas à concentração de um único componente, mas à proporção de cada um deles na cavidade oral (Rudney *et al.*, 1999).

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

Em relação a estresse, a quantificação de cortisol na saliva tem se mostrado um método bastante eficaz para medida do estresse e da ansiedade é a quantificação de cortisol na saliva. Sabe-se que a ansiedade e o estresse estimulam a secreção do hormônio corticosteroide cortisol pelo córtex da glândula supra-renal. Como há uma relação direta entre os níveis de alguns hormônios e medicamentos na saliva e no sangue, em vários estudos a dosagem salivar de cortisol tem sido utilizada devido à simplicidade na coleta da amostra e sensibilidade do método. Ao contrário, a coleta de sangue requer profissionais especializados e gera maior estresse devido a apreensão gerada pelo medo da agulha (Akyuz *et al.*, 1996). Mc Cartan *et al* (1996) encontraram correlação positiva entre ansiedade e a concentração de cortisol salivar.

A ansiedade e o estresse têm sido associados a reações alérgicas, inflamações bucais, úlcera aftosa recorrente (Fábián & Fábián, 2000), doenças periodontais e halitose (Queiroz *et al.*, 2002). A quantificação de cortisol na saliva tem se demonstrado bastante eficaz para medir o estresse e a ansiedade (Jessop *et al.*, 2007), pois ambos estimulam a secreção do cortisol pelo córtex da glândula supra renal. E, como há uma relação direta entre os níveis de alguns hormônios e medicamentos na saliva e no sangue, em vários estudos a quantificação de cortisol salivar tem sido utilizada devido a eficácia e simplicidade sem métodos invasivos. Foi demonstrado por Miller *et al.* (1995) que o estresse avaliado pelos níveis plasmáticos de cortisol, associado a extração dentária, em adultos, foi maior do que o relacionado com os demais procedimentos odontológicos.

Estudos têm demonstrado que mulheres que fazem uso de anticoncepcional apresentam menores valores de cortisol ao longo da vida (Reinberg *et al.*, 1996), ao acordar (Prussner *et al.*, 1997) e em resposta a situações envolvendo estresse social (Kirschbaum *et al.*, 1999; Rohleder *et al.*, 2003) em relação as mulheres que não fazem uso do medicamento. Estudos recentes demonstraram que mulheres que faziam uso de contraceptivos orais apresentaram menores respostas de cortisol em resposta a um estressor laboratorial quando comparadas a mulheres que não faziam uso do mesmo e a homens (Bouma *et al.*, 2009; Cornelisse *et al.*, 2010). Entretanto, ainda é desconhecido se essa menor resposta ocorre devido a hiporreatividade do eixo HPA relacionado ao uso de contraceptivos orais ou se usuárias deste medicamento secretam quantidades similares de cortisol, mas devido à maior produção de globulina transportadora de glicocorticóides, promovida pelo estrógeno, a fração biologicamente ativa de cortisol livre se torna reduzida (Kirschbaum *et al.*, 1999).

A secreção de cortisol é controlada quase que exclusivamente pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise anterior, através do fator liberador de corticotropina (CRF). O ACTH, por sua vez, atua sobre as células adrenocorticais localizadas no córtex da adrenal, induzindo à liberação de cortisol. O estresse, físico ou mental, pode determinar em poucos minutos, secreção aumentada de ACTH e, portanto, de cortisol. Acredita-se que isso decorra da atividade aumentada do sistema límbico, particularmente da região da amígdala e do

hipocampo, que transmitem sinais para o hipotálamo medial posterior (Guyton & Hall 2002). Concentrações de cortisol salivar são muito próximas das concentrações encontradas no plasma (Kirschbaum et al, 1994) e, portanto, são um bom índice da resposta reflexiva do eixo HPA ao estresse. Simultaneamente à ativação do eixo HPA, ocorre ativação do eixo sistema nervoso simpático – medula adrenal, o que resulta em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas. Desta forma, o cortisol é considerado um biomarcador do estresse em resposta à ativação do eixo HPA, enquanto que a alfa-amilase parece estar associada a mudanças na atividade do sistema nervoso simpático. Nesse contexto, Chatterton *et al.* (1996) relataram que houve significativa associação entre a concentração de alfa amilase e os níveis sanguíneos de catecolaminas.

Takai et al, em 2004, aplicou um vídeo cirúrgico de transplante de córnea como fator estressante em 83 voluntários, e observou um aumento nos níveis de amilase e cortisol salivares, sendo que a amilase salivar apresentou um maior e mais rápido aumento em comparação ao cortisol, o qual demorou mais para obter um aumento em sua concentração, porém apresentou um tempo de latência do pico mais longo, sendo que, provavelmente, essas diferenças no tempo de resposta se devem ao tempo de latência entre a resposta ao estresse do eixo HPA e do sistema simpático.

Embora no presente estudo, não tenha havido diferença na concentração salivar de alfa amilase e de cortisol em alunas usuárias de contraceptivos orais, entre os quatro anos do curso de graduação, no estudo de Lima (Patricia Oliveira de Lima - comunicação pessoal), também desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foi observado que alunas do quarto ano da graduação, que não fazem uso de contraceptivos orais, apresentam maiores concentrações salivares de alfa amilase em relação às alunas cursando o primeiro ano do curso. No mesmo estudo, foi observado que alunos do sexo masculino matriculados no terceiro ano da graduação apresentaram aumento na concentração salivar de alfa-amilase em comparação a alunos cursando o primeiro ano do curso (Lima *et al.*, 2012b). A enzima salivar alfa-amilase tem sido proposta como um marcador da atividade simpática (Rohleder *et al.*, 2006; Soo-Quee e Choon-Huat Koh, 2007) e do estresse (Granger *et al.*, 2007), e alguns estudos têm relatado aumentos significativos na concentração salivar de

alfa-amilase em resposta a situações ansiogênicas, tais como exame acadêmico (Bosch *et al.*, 1996), apresentação de vídeos com cenas desagradáveis (Bosh *et al.*, 2003), e estressores laboratoriais (Granger *et al.*, 2006). Assim, os dados obtidos por nosso grupo de pesquisa sugerem que haveria nível de estresse em alunas, que não fazem uso de contraceptivos orais, no quarto ano e em alunos do sexo masculino no terceiro ano do curso de graduação. E, além disso, os dados do presente estudo parecem indicar que a ausência de oscilação cíclica dos hormônios sexuais, em usuárias de contraceptivos orais, poderia de alguma forma diminuir a sensibilidade ao estresse acadêmico, evitando alterações na atividade simpática.

Ainda em menção ao estresse, com relação aos parâmetros cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca), é conhecido que o sistema cardiovascular participa ativamente das adaptações ao estresse, estando, portanto sujeito às influências neuro-humorais (Krantz & Manuck, 1994). O sistema nervoso autônomo tem um importante papel na sucessão de eventos nas situações de estresse. No sistema cardiovascular, a estimulação simpática é sempre associada com a inibição do sistema nervoso parassimpático, causando um aumento na frequência cardíaca e da pressão arterial (Henry *et al.*, 1995). No entanto, para a manutenção da homeostasia cardiovascular, é extremamente importante que a pressão arterial seja mantida em um nível relativamente constante. Sabe-se que a manutenção do equilíbrio desta variável depende da frequência cardíaca, do volume sistólico e da resistência periférica vascular (Tumelero, 1999).

A manutenção da PA envolve controle rígido, mediado tanto por mecanismos periféricos quanto centrais, sendo, os barorreceptores arteriais, um dos principais responsáveis pelo ajuste momento-a-momento da PA. Os barorreceptores são mecanorreceptores constituídos por terminações nervosas livres que se situam na adventícia de grandes vasos (aorta e carótida) e que são estimuladas por deformações das paredes desses vasos, normalmente provocadas pela onda de pressão e pelas características mecano-elásticas da parede. Na pressão basal, os barorreceptores descarregam de forma intermitente e sincrônica com a pressão sistólica, na dependência das variações instantâneas da deformação e da tensão vascular induzidas pela PA (Michelini, 1999). Durante elevações da PA, há grande deformação da parede e ativação dos barorreceptores que geram os potenciais de

ação. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), via nervo glossofaríngeo (fibras carótídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando um aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca (FC). O tônus simpático para o coração, rins e vasos, por outro lado, é reduzido, uma vez que outros neurônios do NTS, quando estimulados por aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral. Ocorre, assim, redução da contratilidade cardíaca e bradicardia e, também, queda da resistência vascular periférica e renal, que levam à redução da PA (Michellini LC, 1999).

Em relação à influência dos contraceptivos orais sobre a pressão arterial, alguns estudos mostram que as mulheres que fazem uso deste medicamento tendem a apresentar, em média, pressão arterial mais elevada em comparação às mulheres que não tomam. O efeito mostra-se, em geral, mais significativo na pressão sistólica do que na diastólica (Clezy *et al*, 1972; Kunin *et al*, 1969; Ramcharan *et al*, 1977; Saruta *et al*, 1970 e Spellacy & Birk, 1972). Entretanto, considerando-se as voluntárias do presente estudo são saudáveis sistemicamente e não apresentam nenhuma doença sistêmica, não eram esperadas alterações nesses parâmetros, exceto aqueles que poderiam ser desencadeadas por estresse. E, como não houve diferenças, podemos sugerir que as atividades acadêmicas não parecem ter sido um fator estressante.

## **7. Conclusão**

Portanto, o fato de não termos observado aumento nas concentrações salivares de cortisol, alfa-amilase e também nos parâmetros cardiovasculares entre alunas cursando os quatro anos do curso demonstram que o estresse acadêmico causado pelas atividades de ensino e aprendizado não influenciou os resultados observados acima (valores de CSV, fluxo salivar e concentração total de proteínas

salivares totais), justificando a ausência de alteração significativa nos parâmetros avaliados, não sendo um estresse relevante em usuárias de anticoncepcionais.

## 8. Referências bibliográficas

- Akyz S., Pince S., Hekim N. Children's stress during a restorative dental treatment: assessment using salivary cortisol measurements. *Pediatr Dent.* v.20(3), p. 219-23, 1996.
- Almståhl A., Wikström M., Groenink J. Lactoferrin, Amyllase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in Hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.*; 16:345-52, 2001.
- Attia, E.L.; Marshal, K.G. Halitosis. *Can Med Assoc J, Ottawa,* 126,: 128-135, June 1982.
- Attia, E.L.; Marshal, K.G. Halitosis. *Can Med Assoc J, Ottawa.* ; 126: 128-35, 1992.
- Bánky, Z.; Nagy, G.M.; Halász, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to either, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology, Basel,* v.59, n.1, p.63-71, 1994.
- Barbería, E.; Fernández-Frías, C.; Suárez-Clúa, C.; Saavedra, D. Análisis of anxiety variables in dental students. *Int Dent j,* 54(6): 445-449, 2004.
- Berzin, M. G. R. Características da formação profissional, prática clínica e perfil biopsicossocial de cirurgiões-dentistas e médicos que atuam na área de dor orofacial. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- Bosch, J. A., Brand, H. S., Ligtenberg, T. J., Bermond, B., Hoogstraten, J., & Nieuw Amerongen, A. V. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosomatic Medicine,* v.58, p.374–382, 1996.
- Bosch, J. A., de Geus, E. J., Veerman, E. C., Hoogstraten, J., & Nieuw Amerongen, A. V. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosomatic Medicine,* 65, 245–258, 2003.
- Calil CM. Influência do Estado de ansiedade e do ciclo menstrual sobre a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis. Tese de Doutorado - Programa de Pós Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP, 2006.
- Calil C.M.; Marcondes F.K. Influence of anxiety on the production of oral volatile compounds. *Life Sci.*; 79: 660-664, 2006.
- Calil, C.M., Lima, P.O.; Bernardes, C.F.; Groppo, F.C.; Bado, F. Marcondes FK. Influence of gender and menstrual cycle on volatile sulphur compounds production. *Arch Oral Biol.* v.53(12):1107-12, 2008.

- Calil, C.M.; Liberato, F.L.; Pereira, A.C.; Meneguim, M.C.; Goodson, J.M.; Groppo, F.C. The relationship between volatile sulfur compounds, tongue coating, and periodontal disease. *Int J Dent Hyg.*, 7(4): 251-255, 2009.
- Chatterton R.T., Volgelsong K.M., Lu Y., Ellman A.B., Hudgens G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol*; 16: 433-448, 1996.
- Chicharro, J. L.; Lucia, A; Pérez,M; Vaquero, A. F.; Urena, R. Saliva composition and exercise. *Sports Méd*, 26: 17-27, 1998.
- Clow, A., Thorn, L., Evans, P. and Hucklebridge, F. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress* 7, 29-37, 2004.
- Cureton, S.L. Premenstrual syndrome and dentistry. *Gen Dent*, Chicago, 34(5): 364-366, 1986.
- Das, A.K.; Bhowmick, S.; Dutta, A. Oral contraceptives and periodontal disease. *J Indian Dent Assoc.*, 43: 47-53, 1971a.
- Das, A.K.; Bhowmick, S.; Dutta, A. Oral contraceptives and periodontal disease. Prevalence and severity. *J Indian Dent Assoc.*, 43: 155-158, 1971b.
- Dennis, A. R.; Young, J. A. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. *Pfugers. Arch.*; 376: 73-80, 1978.
- Dugue, B., Leppanem, E. and Grasbeck, R. The driving license examination as a stress model: effects on blood picture, serum cortisol and the production of interleukins in man. *Life Science* 68, 1641-47, 2001.
- El-Ashiry, G.M.; El-Kafrawy, A.H.; Nasr, M.F.; Younis, N. Comparative study of the influence of pregnancy and oral contraceptives on the gingival. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.*, 30: 472-475-,1970.
- Edwards, S., Evans, P., Hucklebridge, F. and Clow, A. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Life Science* 68, 2093-2103, 2001a.
- El-Ashiry, G.M.; El-Kafrawy, A.H.; Nasr, M.F.; Younis, N. Comparative study of the influence of pregnancy and oral contraceptives on the gingival. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.*, 30: 472-475-,1970.
- Eli I, Baht R, Kolowsky A, Rosenberg M. The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. *Psychosom. Med.*; 58(2):.156-9, 1996.
- Epstein, J. B; Scully, C.; Cand.- The Role of Saliva in oral health and the causes and effects of Xerostomia. *J Dent Assoc.*; 58(3): 217-221, 1992.
- Fábian TK, Fábian G. Dental stress. In: Fink, G. (Ed.) *Encyclopedia of stress*. San Diego: Academic Press, v.1,p. 657-659, 2000.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. Os hormônios adrenocorticais. Rio de Janeiro: : Guanabara-Koogan, p.813-826. In: *Tratado de Fisiologia Médica*, 10 ed, 2002.
- Granger, D. A., Kivlighan, K. T., Blair, C., El-Sheik, M., Mize, J., Lisonbee, J. A., et al. Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child

- health, development, and social relationships. *Journal of Social and Personal Relationships*, v.23, p.267–290, 2006.
- Granger, D. A., Kivlighan, K. T., El-Sheik, M., Gordis, E.B.; Stroud L. R. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1098, p.122-44, 2007.
- Haerian-Ardakani A, Moientaghavi A, Talebi-Ardakani MR, Sohrabi K, Bahmani S, Dargahi M. The association between current low-dose oral contraceptive pills and periodontal health: a matched-case-control study. *J Contemp Dent Pract* 11(3): 33-40, 2010.
- Henning, K.; Ey, S.; Shaw, D. Perfectionism, the impostor phenomenon, and psychological adjustment in medical, dental, nursing and pharmacy students. *Med Educ* 32: 456-464, 1998.
- Horan, M.A.; Barton, R.N.; Lithgow, G. Biology of aging and stress. In: FINK, G. (Ed.) *Encyclopedia of stress*. San Diego: Academic Press, 111-117, 2000.
- Irigoyen MC, Moreira RD, Krieger EM. Funções do nervo renal. In: Cruz J et al. *Atualidades em Nefrologia II*. São Paulo, Sanvier, 1992.
- Kaufman, A.Y. An oral contraceptive as an etiologic factor in producing hyperplastic gingivitis and a neoplasm of the pregnancy tumor type. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol* 28: 666-670, 1969.
- Kirschbaum, C.; Hellhammer, D.H. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, v.19, p.313-333, 1994.
- Kirschbaum, C.; Kudielka, B.M.; Gaab, J.; Schommer, N.C.; Hellhammer, D.H. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary adrenal axis. *Psychosom Med* 61(2): 154-62, 1999.
- Kleinberg I, Wolff MS, Coldpilly DM. Role of saliva in oral dryness, oral feel and oral malodour. *Int Dent J*;53(3):236-40,2002.
- Klinger, G.; Eick, S.; Klinger G.; Pfister, W.; Graser, T.; Moore, C.; Oettel, M. Influence of hormonal contraceptives on microbial flora of the gingival sulcus. *Contraception* .; 57: 381-384, 1998.
- Knight, G.M.; Wade, B.A. The effects of hormonal contraceptives on the human periodontium. *J Periodontal Res* 9: 18-22, 1974.
- Krantz DS, Manuck SB. Acute psychophysiologic reactivity and risk of cardiovascular disease: A review and methodologic critique. *Psychol Bull*; 96: 435-64,1984.
- Kurihara, E; Marcondes, F.K. Oral Concentration of Sulfur Compounds in Stressed rats. *Stress* 5(4): 295-298, 2002.
- Levine M.J. Salivary macromolecules. A structure/function synopsis. *Ann N Y Acad Sci.*; 694:11-16, 1993.
- Lima PO, Calil CM, Marcondes FK. Relação entre estresse e compostos sulfurados voláteis; participação do sulfeto de hidrogênio. *Perionews*, 6(2): 171-179, 2012a.

- Lima PO, Lima AR, Calil CM, Marcondes FK. Estresse acadêmico aumenta a produção de compostos sulfurados voláteis em indivíduos saudáveis. XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 02 - 05/09/2012, Gramado – RS, Brasil. *Anais*, 2012b.
- Lima PO, Calil CM, Marcondes FK. Influence of gender and stress on the volatile sulphur compounds and stress biomarkers production. *Oral diseases*, 18: 1-8, 2012 c.
- Lindhe, J.; Attsteom, R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res* 2: 194, 1967.
- Lindhe, J.; Branemark P.I.; Lundskog, J. Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones *J Periodontal Res* 2: 266-272, 1967.
- Lindhe, J.; Branemark, P.I. Changes in vascular permeability after local application of sex hormones. *J Periodontal Res* 2: 259-265, 1967.
- Lindhe, J.; Bjorn, A-L. Influence of hormonal contraceptives on the gingival of women. *J Periodontal Res* 2: 1-6, 1967.
- Lindhe, J.; Attsteom, R.; Bjorn, A.S. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycle. *J. Periodontal Res* 4: 97, 1969.
- Loe, H.; Silness, J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol. Scand.*, v.21, p. 533, 1963.
- Main, D.M.G., Ritchie, G.M. Cyclic changes in oral smears from young menstruating women. *Br. J. Dermatol* 79: 20-30, 1967.
- Mark AL, Mancina G. Cardiopulmonary baroreflex in humans. In: Sheperd JT, Abboud FM (eds.). *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System. Peripheral Circulation and Organ Blood Flow*. Washington DC: Am Physiol Soc. 3: pp.795-813., 1993.
- McCartan B.E., Lamey P-J, Wallace A.M. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 25: 357-359, 1996.
- Messadi D.V. Oral and nonoral sources of halitosis. *J Calif Dent Assoc*; 25: 127-131, 1997.
- Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta.*; 347(1-2): 25-39, 2004.
- Michelini LC. Regulação da pressão arterial: Mecanismos neuro-humorais. In: Aires MM. *Fisiologia*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; pp.473-9, 1999.
- Michelini, LC. Regulação momento a momento da pressão arterial na normo e na hipertensão. *Hipertenso* 3:90-8., 2000.
- Miller C.S., Dembo J.B., Falace D.A., Kaplan A.I., Salivary cortisol response to dental treatment of varying stress. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* v.79, n.4, p.436-41, 1995.
- Morita M, Wang HL. Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. *J CLin Periodontol*; 28:213., 2001.

- Newbury-Birch, D.; Lowry, R.J.; Kamali, F. The changing patterns of drinking, illicit drug use, stress, anxiety and depression in dental students in a UK dental school: a longitudinal study. *Br Dent J*, 192(11): 646-649, 2002.
- Nieuw Amerongen A.V., Veerman E.C.I. Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Dis.*; 29:1051-1058, 2002.
- Ockenfeis, M.C., Porter, I., Smyth, J., Kirschbaum, C., Hellhammer, D.H. and Stone, A.A. Effect of chronic stress associated with unemployment on salivary cortisol: overall cortisol levels, diurnal rhythm, and acute stress reactivity. *Psychosomatic Medicine* 57, 460-67, 1995.
- O'Donnel, K., Kammerer, M., O'Reilly, R., Taylor, A., Glover, V. Salivary - amylase stability, diurnal profile and lack of response to the cold hand test in young women. *Stress* 3: 1, 2009.
- Peretz, B.; Mann J. Dental anxiety among Israeli dental students. *Eur J Dent Educ*, 4: 133-137, 2000.
- Prakash ES, Madanmohan, Pal GK. What is the ultimate goal in neural regulation of cardiovascular function? *Adv Physiol Educ*;28(1-4):100-1, 2004.
- Preshaw P.M.; Knutsen, M.A.; Mariotti, A. Experimental gingivitis in women using oral contraceptives. *J Dent Res* 80(11): 2011-2015, 2001.
- Pruessener, J.C., Wolf, O.T., Helhammer, D.H., Buske-Kirschbaum, A. von Auer, K., Jobst, S., Kaspers, F. and Kirschbaum, C. Free Cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for assessment of adrenocortical activity. *Life Sciences* 61, 2539-2549, 1997.
- Queiroz, C.S.; Hayacibara, M.F.; Tabchoury, C.P.M.; Marcondes, F.K.; Cury, J.A. Relationship among stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur containing compounds. *Eur J Oral Sci*, 110: 337-349, 2002.
- Rohleder, N.; Wolf, J.; Maldonato, E. F.; Kirchbaum, C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology* 43 (6): 645-652, 2006.
- Rosenberg, M.; McCulloch, C.A. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol*, Chicago 63(9): 776-782, 1992.
- Rudney J.D. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral healthy. *Crit Rev Oral Bopl Med.*; 6(4):243367, 1995.
- Schneyer, L. H. Sympathetic control of Na and K transport in perfused submaxillary main duct of rat. *Am J Physiol.*; 230: 341-345, 1976.
- Shepperd JT, Vanhoutte PM. The human cardiovascular system. Facts and concepts. New York: Raven Press; 1979.
- Shinjiro k., Shuji A., kenjiro G., Kurihara E., Toshihiro A., Tadamichi T. Low salivary flow and volatile sulfur compounds in mouth air. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 96:38-41, 2003.
- Soo-Quee Koh, D.; Choon-Huat Koh, G. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med* 64: 200-210, 2007.
- Soory, M. Hormonal factors in periodontal disease. *Dent Update* 27:380-383, 2000.

- Springfield, J.; Suarez, F.L.; Majerus, G.J.; Lenton, P.A.; Furne, J.K.; Levitt, M.D. Spontaneous Fluctuations in the Concentrations of Oral Sulfur-containing Gases. *J Dental Res* 80(5):1441-1444, 2001.
- Sterer N, Rosenberg M. Streptococcus salivarius promotes mucins putrefaction and malodor production by Porphyromonas gingivalis. *J Dent Res.*, v.85(10): 910-914, 2006.
- Takai, N.; Yamaguchi, M.; Aragaki, T.; Eto, K.; Uchihashi, K.; Nishkawa, Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol*, v.49, p. 963-968, 2004.
- Tárzia, O. Halitose: Um desafio que tem cura. São Paulo: Editora de publicações biomédicas, 228, 2003.
- Thorn, L., Hucklebridge, F., Evans, P. and Clow, A. Suspected non-adherence and weekend versus week day differences in the awakening cortisol response. *Psychoneuroendocrinology* 31, 1009-1018, 2006.
- 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* 6(3):245-254, 1978.
- Tsai CC, Chou HH, Wu TL, Yang YH, Ho KY, Wu YM, Ho YP. The levels of volatile sulfur compounds in mouth air from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*; 43(2): 186-93, 2008.
- Tumelero, S.; Gallo JR. L. Estudo do Comportamento da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistêmica em Diferentes Inclinações do Decúbito Dorsal em Indivíduos Normais. Dissertação Mestrado, Campinas, 1999.
- Van den Broek A, Feenstra L, Batt C. A review of the current literature on etiology and measurement methods of halitosis. *J. Dentistry.*; 35:627-35, 2007.
- Van den Velde S, Quiynen M, van Hee P, van Steenberghe D. Halitosis associated volatiles in breath of healthy subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Sci.*; 853 (1-2): 54-61, 2007.
- Vitaliano, P.; Russo, J.; Carr, J.; Heerwagen, J. Medical school pressures and their relationships to anxiety. *J Nerv Ment Dis* 172: 730-736, 1984.
- Yargaki, K.; Sanada, K. Volatile sulphur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontitis. *J Periodont Res.*; 27:233-238, 1992.
- Ward, A.M.V.; Moore, V.M.; Steptoe, A.; Cockington, R.A.; Robinson, J.S.; Phillips, D.I.W. Size at birth and cardiovascular responses to psychological stressors: evidence for prenatal programming in women. *J Hypertens* 22: 2295-2301, 2004.
- Willians, E. Magid, K. and Steptoe, A. The impact of time of waking and concurrent subjective stress on the cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology* 30, 139-148, 2005.
- Wolf, J.M.; Nicholls, E.; Chen, E. Chronic stress, salivary cortisol, and  $\alpha$ -amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol* 78: 20-28, 2007.



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



**CERTIFICADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, certifica que o projeto de pesquisa "Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis", protocolo nº 108/2007, dos pesquisadores **FERNANDA KLEIN MARCONDES, CAROLINE MORINI CALIL, EDUARDO HARUKI OZERA, PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA e PEDRO HENRIQUE MOREIRA PAULO TOLENTINO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/12/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "A study about the relation between emotional changes and the production of volatile sulfur compounds", register number 108/2007, of **FERNANDA KLEIN MARCONDES, CAROLINE MORINI CALIL, EDUARDO HARUKI OZERA, PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA and PEDRO HENRIQUE MOREIRA PAULO TOLENTINO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 12/12/2007.

  
**Prof. Pablo Agustín Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

  
**Prof. Jacs Jorge Júnior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.