



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Patricia Oliveira de Lima

Orientador(a): Prof^a. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Ano de Conclusão do Curso: 2007

Patrícia Oliveira de Lima

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVÍVEL
SOBRE A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS.

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
Da Faculdade de Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-
Dentista.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

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

L628i **Lima, Patrícia Oliveira de.**
Influência do estresse crônico moderado e
imprevisível sobre a produção de compostos sulfurados
voláteis. / Patrícia Oliveira de Lima. -- Piracicaba, SP :
[s.n.], 2007.
26f. : il.

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

1. Halitose. I. Marcondes, Fernanda Klein. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Luiz e Deborah, meus maiores exemplos de vida, por todo apoio, dedicação, amor e carinho depositados em mim; pelos esforços e ensinamentos para que meus sonhos pudessem ser realizados.

Ao meu irmão, Luis Fernando, pelo companheirismo e amizade.

AGRADEDIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Prof^a Dra. Fernanda Klein Marcondes, por sua dedicação e paciência no exercício de sua profissão; pelos ensinamentos e orientação durante meus trabalhos; pela ética e competência em suas pesquisas; por me incentivar na busca pelos melhores resultados e na realização dos melhores trabalhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre iluminou o meu caminho e me deu forças para superar todos os obstáculos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela infra-estrutura e aprendizado, tornando possível a formação de exímios profissionais.

À Caroline Morine Calil, pelos ensinamentos e amizade e por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos colegas da Fisiologia Rose, Rafa, Mariana Leite, Vander, Vinícius, Luana, Júlia, Karla e Nádia.

Às minhas amigas Dani, Carol, Bia, Isa Campache, Juliane, Ju Haddad, Fer, Michelle, Silvia, Ana Paula e Ju Utimura, pela confiança e amizade e por tornarem meus dias na faculdade mais agradáveis.

SUMÁRIO

1. LISTA DE TABELAS.....	07
2. LISTA DE FIGURAS.....	07
3. LISTA DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM.....	08
4. RESUMO.....	09
5. INTRODUÇÃO.....	09
6. OBJETIVO.....	13
7. DESENVOLVIMENTO.....	13
7.1. Materiais e Métodos 12.....	13
7.2. Resultados.....	16
7.3. Discussão.....	18
8. CONCLUSÃO.....	20
9. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	21

1. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. A) Monitor de sulfeto (halímetro) e B) Manipulação do animal durante o procedimento de mensuração dos CSV..... 13

Tabela 2. Número de mergulhos e bolos fecais produzidos por ratos controle e submetidos a estresse, durante o teste de natação forçada, nas 1^a e 2^a sessões... 17

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Halímetro e B) Manipulação do animal durante o procedimento de mensuração dos CSV..... 14

Figura 2. Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse. * Diferença estatística significativa em relação ao Grupo Controle ($p < 0,05$)..... 16

Figura 3. Tempo de imobilização observado em ratos controle e submetidos a estresse, nas 1 e 2 sessão do teste de natação forçada. *Diferença estatística significativa em relação ao Grupo Controle ($p < 0,05$)..... 17

3. LISTA DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM

et al. = e outros (abreviatura de “*et alii*”)

CSV = Compostos sulfurados voláteis

ECMI = Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

TNF = Teste de Natação Forçada

LCE = Labirinto em Cruz Elevado

4. RESUMO

A halitose é caracterizada pela emissão de odores fétidos pela boca. Estes se devem à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV), a partir da degradação de aminoácidos por bactérias bucais, 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 medido 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 lingual, doenças periodontais ou das características dos alimentos consumidos (Attia & Marshall, 1982; Kleinberg & Westbay, 1992; Eli *et al.*, 1996, Amir *et al.*, 1999). Sintomas psicopatológicos e o estresse também têm sido propostos como fatores que induzem o aparecimento da halitose (Eli *et al.*, 1996), porém ainda são poucos os estudos sobre esta relação. Como a utilização de animais de laboratório em pesquisa permite maior controle sobre as variáveis que possam ter influência sobre os resultados experimentais e contribui significativamente para a compreensão da fisiologia e patologias humanas, a proposta de nosso trabalho foi avaliar o efeito de um modelo experimental de estresse crônico sobre a produção bucal de compostos sulfurados voláteis em ratos de laboratório.

5. INTRODUÇÃO

Halitose é uma alteração do hálito, caracterizada pela emissão de odores fétidos pela boca. Apresenta origem local ou sistêmica e causa constrangimento tanto para quem a possui como para as pessoas com as quais o indivíduo convive (Rosenberg & Culloch, 1992; Calil & Marcondes, 2006a). Os odores desagradáveis são produzidos pela ação das bactérias gram-negativas da microbiota bucal sobre aminoácidos que contêm enxofre. A degradação de tais aminoácidos produz compostos sulfurados voláteis (CSV), representados pelo sulfeto de hidrogênio (H_2S), metil mercaptana (CH_3SH), e o dimetil sulfeto (CH_3SCH_3) (Springfield *et al.*, 2001), sendo as concentrações desses gases usadas como indicadores da severidade da halitose (Rosenberg *et al.*, 1991; Rosenberg & McCulloch, 1992). A mensuração destes compostos pode ser realizada por meio de avaliação organoléptica do ar emanado da cavidade oral (Rosenberg *et al.*, 1991), por

cromatografia gasosa (Rosenberg & McCulloch, 1992) ou por meio de um monitor de sulfeto (Rosenberg, 1990; Rosenberg *et al.*, 1991; Calil *et al.* 2006).

Estudos sobre a etiologia do mau hálito mostram que 56 a 85% dos casos são causados por condições orais originadas de má higiene bucal, placa dental, próteses não higienizadas, periodontite, saburra lingual ou por consumo de alimentos condimentados (Attia & Marshal, 1982; Calil *et al.* 2006). A maioria das espécies bacterianas que coloniza as superfícies orais, particularmente os tecidos duros, é sacarolítica, isto é, utilizam carboidratos com fonte de energia. Outras espécies são proteolíticas (assacarolíticas), pois utilizam proteínas, peptídeos ou aminoácidos como fonte de energia (Lindhe *et al.*, 1969). Algumas bactérias essencialmente proteolíticas, como a *Prevotella intermédia* ou o *Fusobacterium nucleatum*, quando se desenvolvem *in vitro*, são produtoras de mau odor e, por esta razão, presume-se que essas espécies contribuam para o mau hálito *in vivo*. Além disso, a halitose pode também estar relacionada a desordens do trato respiratório, diabetes, doenças hepáticas, gastrointestinais e renais (Attia & Marshal, 1982).

Muitas vezes, porém, o cirurgião-dentista se depara com o paciente se queixando de mau-hálito e surpreendentemente, durante a anamnese e exame clínico, não encontra nenhum sinal ou causa orgânica para o sintoma. Com o passar do tempo esse mau odor não desaparece, e às vezes até se intensifica, gerando problemas para o profissional que, além de não solucionar o problema, não encontra na literatura explicações objetivas para o fenômeno. Diante disso, sintomas psicopatológicos e o estresse também têm sido relacionados ao aparecimento da halitose (Eli *et al.*, 1996; Queiroz *et al.*, 2002; Kurihara & Marcondes, 2002; van den Broek *et al.*, 2007).

Fisiologicamente, é a reação de estresse que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos aos inúmeros estímulos ambientais, nocivos ou não, a que estão constantemente expostos. Porém quando esse estímulo é mantido por muito tempo ou é muito intenso, o processo de adaptação pode não ocorrer. Neste momento, desenvolve-se a fase de exaustão da reação de estresse em que o organismo se torna susceptível a distúrbios e patologias (Selye, 1936). No campo da Odontologia essa fase pode se manifestar na forma de reações alérgicas e inflamações bucais, úlcera aftosa recorrente (Fábián & Fábián, 2000), doenças periodontais e halitose (Queiroz *et al.*, 2002).

Fatores individuais, tais como características genéticas (Marple *et al.*, 1972), idade (Riegle, 1973), sexo e ciclo reprodutivo (Marcondes *et al.*, 1998; Spadari-

Bratfish *et al.*, 1999) influenciam a reação de estresse. 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, 1998; Griffin, 1989).

Muitas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização das respostas a estímulos aversivos (Van der kar *et al.*, 1991). O sistema límbico, ao ser estimulado, age sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal. A resposta consiste na secreção elevada do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise, levando ao aumento na liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (Van der kar *et al.*, 1991). Simultaneamente, ocorre ativação do eixo sistema nervoso simpático - medula adrenal, o que resulta em aumento dos níveis plasmáticos das catecolaminas noradrenalina e adrenalina (Koob, 1999).

O sistema nervoso autônomo possui duas divisões. O sistema simpático, o qual é ativado como parte das respostas 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, armazenando energia e direcionamento do sangue para digestão e reparo corpóreo, na reação ao estresse tem sua atividade inibida (Nesse & Young, 2000).

O estresse promove importantes alterações no comportamento em humanos e em modelos animais. Desordens emocionais como a ansiedade e a depressão têm sido associadas ao aumento da secreção de cortisol em humanos (Grippe *et al.*, 2002). Complementando os estudos em humanos, modelos animais têm sido utilizados para investigar os mecanismos envolvidos na relação entre estresse e halitose.

Para o estudo da reação de estresse, em ratos de laboratório, diferentes modelos experimentais são utilizados, tais como a natação (Marcondes *et al.*, 1996), imobilização (Torrellas *et al.*, 1981; Marti *et al.*, 1999; Benzi *et al.*, 1997; Nankova *et al.*, 2000) e choques nas patas (Marcondes *et al.*, 1996; Marcondes, 1998). Está bem estabelecido que ratos podem se adaptar à aplicação repetida de estímulos estressores, porém, esta adaptação não ocorre quando os animais são submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), que consiste na exposição repetida a diferentes estímulos (Willner 1990; Katz *et al.*, 1981). A ausência de adaptação aos estímulos estressores foi confirmada por Rodriguez

Echandia (1988), que observou elevação mantida nos níveis séricos de prolactina e corticosterona, em resposta ao ECMI. Além disso, o ECMI também induziu aumento na pressão arterial e frequência cardíaca em ratos (Grippe *et al.*, 2002). Neste modelo experimental, a exposição crônica de ratos a uma variedade de estressores moderados induz estado de anedonia ou subsensibilidade à recompensa, evidenciados pela diminuição no consumo e preferência por solução doce e pela diminuição no desempenho da auto-estimulação do hipotálamo ventrolateral, área responsável pela resposta de recompensa. Como tais efeitos podem ser cancelados pelo tratamento com antidepressivos tricíclicos, e agonistas de receptores 5HT_{1c}, a indução de anedonia, pelo ECMI, é um modelo com validade preditiva para estudos de mecanismos envolvidos na depressão humana (Willner, 1990; Moreau *et al.*, 1993; Moreau *et al.*, 1995; Moreau *et al.*, 1992).

Neste contexto, o teste da natação forçada tem sido também utilizado, porque neste teste, o comportamento de imobilidade é tido como desamparo aprendido e é análogo ao estado de depressão humana, sendo revertido pelo tratamento com antidepressivos (Porsolt, 1977; Beijamini *et al.*, 1998; Calil *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006).

Na área odontológica, estudos realizados em humanos têm demonstrado aumento na produção de CSV. Queiroz *et al.* (2002), em estudo com indivíduos saudáveis submetidos a um exame acadêmico, observaram que esta alteração foi acompanhada de diminuição do fluxo salivar, em relação aos valores observados uma semana antes do exame. Apesar dos indícios sobre a participação da hipossalivação e da diminuição da atividade imunológica, induzidas pelo estresse ou ansiedade, no desenvolvimento da halitose, ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais o estresse e a ansiedade contribuem para a ocorrência do mau hálito (Calil *et al.*, 2006).

Na clínica odontológica, é muito difícil a determinação das causas que induzem ansiedade e estresse, já que fatores sociais, econômicos e familiares não podem ser excluídos, e somam-se àqueles diretamente relacionados ao tratamento dental. Assim, é evidente a importância do desenvolvimento de protocolos experimentais que permitam a padronização da qualidade e intensidade do estímulo ansiogênico, assim como o seu papel no desenvolvimento de sintomas psicopatológicos e manifestações bucais. Por isso, estudamos a relação entre alterações comportamentais induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível sobre a produção de CSV.

6. OBJETIVO

Avaliar o efeito do ECMI sobre a produção de CSV em ratos.

7. DESENVOLVIMENTO

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1. Animais

Foram utilizados 20 ratos Sprague-Dawley, SPF (“specific patogen free”), sendo 10 destinados ao grupo controle e os outros 10 ao grupo do estresse, com 2 meses de idade no início do experimento fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB), e mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Estresse, localizado no Depto de Ciências Fisiológicas da FOP/UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendendo às 6:00h). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo CEEA n° 900-1) de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

7.1.2. Protocolo de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

Após uma semana de adaptação no biotério, os animais foram analisados durante 7 semanas. Nas 3^a, 4^a e 5^a semanas, os animais submeteram-se ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), modificado a partir da metodologia descrita por Moreau (1997). O protocolo de ECMI consiste na aplicação de diferentes estímulos estressores ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas. Os estímulos utilizados foram: imobilização, período de iluminação contínua durante uma noite, um período de pernoite sob privação de comida, imediatamente seguida por duas horas de acesso restrito à comida (45mg de ração distribuído em cada gaiola-moradia), um período

de pernoite sob privação de água imediatamente seguido da apresentação de uma garrafa de água vazia, um período de pernoite em gaiolas com maravalha úmida e suja e manutenção em ciclo claro/escuro invertido por 2,5 dias (noite de sexta-feira até a manhã de segunda-feira), como indicado na Tabela 1.

TABELA 1. PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL.

	Manhã	Tarde
Segunda-Feira	8:00 – 9:00: imobilização	13:00 – 14:00: imobilização. 18:00: Iluminação contínua durante a noite.
Terça-Feira	8:00 – 9:00: imobilização 11:00 – 12:00: imobilização.	14:00 – 15:00: imobilização 16:00: Privação de água e comida durante 18 horas.
Quarta-Feira	8:00 – 10:00 Acesso restrito à comida durante duas horas.	13:00 – 14:00: imobilização 16:00: Privação de água durante 18 horas.
Quinta-Feira	8:00 – 10:00: Exposição a garrafas de água vazias. 11:00 – 12:00: Restrição	14:00 – 15:00: imobilização 16:00: pernoite em gaiolas com maravalha úmida.
Sexta-Feira	8:00 – 9:00: imobilização 11:00 – 12:00: imobilização	16:00: Ciclo Claro/Escuro invertido (até 8h00 da segunda-feira seguinte).

7.1.3. Medida da Concentração de Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

A verificação dos CSV foi feita uma vez na semana, durante as duas semanas de adaptação que antecedem o protocolo de estresse, nas três semanas em que os ratos foram submetidos ao protocolo de estresse e duas semanas posteriores ao protocolo de ECMI. Os compostos sulfurados voláteis foram medidos na sexta-feira, após a aplicação dos estressores durante toda a semana, entre 11 e 14 horas. No grupo controle, a medição dos CSV foi feita da mesma maneira e seguindo os mesmos horários que no grupo submetido ao estresse.

Utilizando-se um aparelho halímetro, foram quantificados os CSV no ar emanado da boca dos animais, como realizado em estudo anterior (Kurihara & Marcondes, 2002). Este aparelho oferece os dados em um “display” significando o número de moléculas em parte por bilhão (ppb).

Uma cânula plástica e descartável de 10 cm de comprimento, utilizada comumente no consultório odontológico 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 pela lateral da cavidade bucal de forma que não ocorresse a interrupção da sucção. O ar coletado ao atingir o sensor eletroquímico no interior do aparelho permite a quantificação das moléculas de CSV. O maior valor observado entre 5 e 10 segundos foi registrado (tempo determinado por ser o menor período suficiente para leitura no halímetro, devido à aversão que o animal possui em relação à introdução forçada de objetos na cavidade bucal).

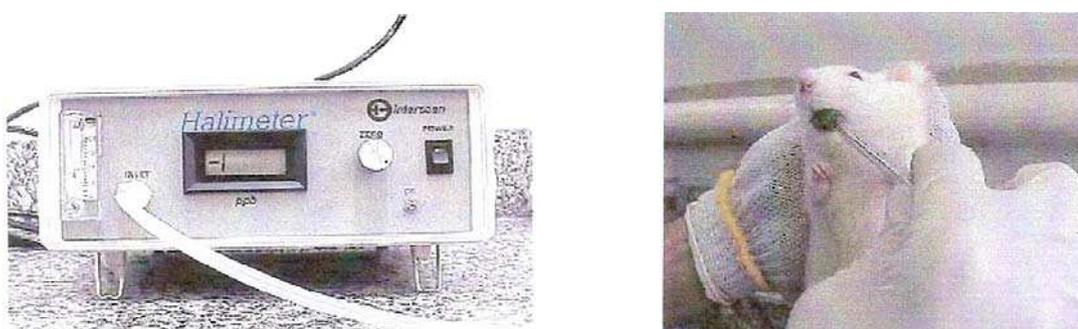


Figura 1: A) Monitor de sulfeto (halímetro) e B) Manipulação do animal durante o procedimento de mensuração dos CSV.

7.1.4. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Na 6ª semana, os animais foram submetidos, individualmente, à natação por 15 min, entre 8:00 e 10:00h, em um tanque de acrílico medindo 20cm x 20cm x 50cm com 20 cm de água a 25°C. O Teste de Natação Forçada (TNF) é constituído de duas sessões, a primeira sessão consiste no pré-teste, no qual os animais são submetidos a 15 min de natação; e a segunda sessão é caracterizada por apresentar 5 minutos Imediatamente depois, os animais foram retirados da água, secados com uma toalha e mantidos próximo a um aquecedor de ambiente. Após estarem completamente secos (cerca de 30 min), os ratos foram recolocados em suas gaiola e transportados ao biotério de experimentação. No dia seguinte, 24 horas após a primeira sessão, os animais foram novamente submetidos à natação, nas mesmas condições, durante 5 min. Neste caso, o animal bóia, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

Outro parâmetro observado foi o número de mergulho feito pelos animais,

durante as duas sessões (Molina *et al.*, 1994). O mergulho é definido como um movimento em que o corpo do rato se submerge na água, com a cabeça em direção ao fundo do tanque (Bielajew *et al.*, 2003).

No tempo de imobilidade, o rato se mantém imóvel sempre que flutua passivamente na água, ligeiramente encurvado, com movimentos rápidos apenas para manter a cabeça voltada para cima e mantida sobre a superfície da água (Häidkind *et al.*, 2003).

7.1.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados por Teste t de *Student*, considerando-se o nível de significância de 5%.

7.2. RESULTADOS

Nossos resultados mostram que, durante as duas semanas de adaptação dos animais no biotério, não foi observada diferença significativa entre os grupos, na produção de compostos sulfurados voláteis (CSV). Porém, a aplicação do ECMI, na 3ª semana, promoveu aumento significativo (Figura 2, $p < 0,05$) na produção de CSV comparado ao grupo controle ($18,1 \pm 1,05$ vs $22,1 \pm 0,92$ ppb), o que também ocorreu na 4ª ($16,5 \pm 1,1$ vs $24,7 \pm 0,9$ ppb) e 5ª semanas ($16,8 \pm 1,6$ vs $24,3 \pm 1,3$ ppb). Este aumento se manteve na ausência de estímulos estressores, o que pode ser visualizado na 6ª semana de experimento ($18,8 \pm 0,9$ vs $25,7 \pm 1,6$), em que o protocolo de estresse já havia sido encerrado (Figura 2, $p < 0,05$).

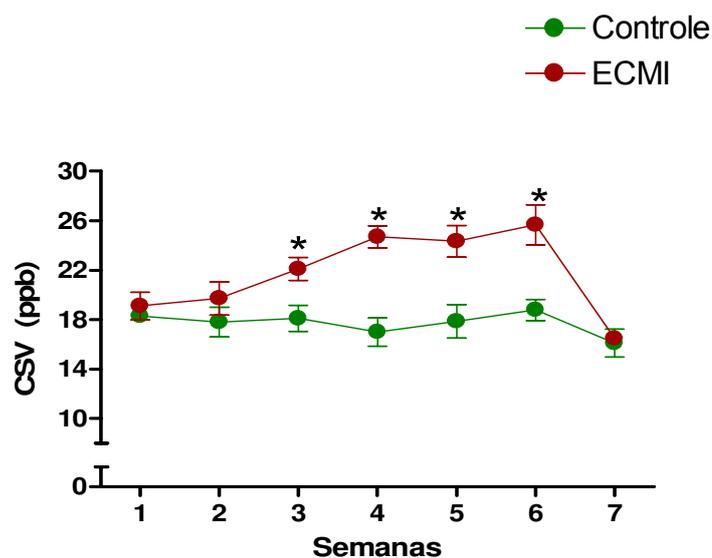


Figura 2: Concentração bucal de CSV de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível. *Diferença significativa em relação ao Grupo Controle ($p < 0,05$).

Em relação ao teste de natação forçada (TNF), houve um aumento significativo no tempo de imobilidade durante os primeiros 5 minutos da 1ª sessão de natação (228 ± 4 vs. 208 ± 7), sem diferença nos 10 minutos posteriores, ou na segunda sessão, em relação ao grupo controle (Figura 3, $p < 0,05$).

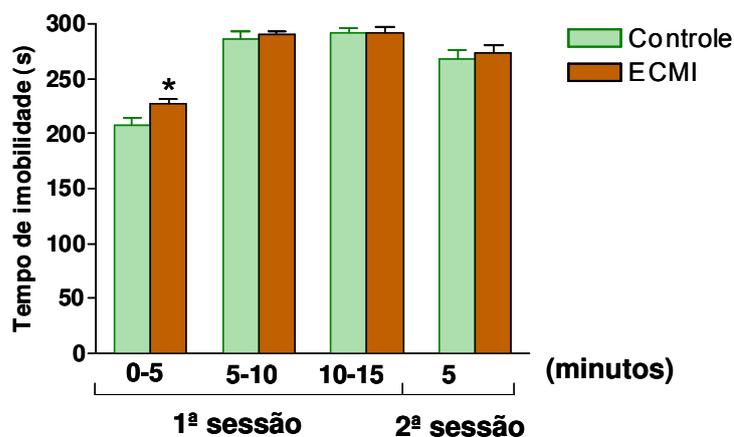


Figura 3: Tempo de imobilidade observado em ratos controle e submetidos a estresse, nas 1ª e 2ª sessão do teste de natação forçada. *Diferença estatística significativa em relação ao Grupo Controle ($p < 0,05$).

Durante o TNF, houve um aumento significativo do número de mergulhos e de bolos fecais no grupo ECMI em relação ao grupo controle, na primeira sessão (15 min). Porém na segunda sessão (5 minutos), houve aumento apenas número de bolos fecais, sem alteração significativa no número de mergulhos (Tabela 2), em comparação com animais controle.

Tabela 2. Número de mergulhos e bolos fecais produzidos por ratos controle e submetidos a estresse, durante o teste de natação forçada, nas 1ª e 2ª sessões.

	Controle	ECMI
1ª. Sessão (0 – 15 minutos)		
Mergulhos	5,0 ± 0,7	2,5 ± 0,5*
Bolos Fecais	3,5 ± 0,9	7,3 ± 0,9
2ª. Sessão (0 – 5 minutos)		
Mergulhos	0,1 ± 0,1	0
Bolos Fecais	2,1 ± 0,8	7,9 ± 0,6*

*Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

7.3. DISCUSSÃO

No presente estudo, o estresse alterou a concentração bucal de CSV em ratos de laboratório, confirmando o efeito do ECMI sobre a produção de CSV em ratos.

O aumento da produção de CSV pode ser resultado da diminuição do 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.

O estresse promove ativação do sistema nervoso simpático, levando à maior secreção de catecolaminas, aumento este que visa promover ajustes cardio-respiratórios e comportamentais, e simultaneamente inibir respostas 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 secreção salivar (Morse *et al*, 1981). Nas glândulas salivares, estímulos simpáticos causam constrição da vascularização da glândula, através da liberação de catecolaminas, produzindo somente pequenas quantidades de saliva mucosa (Schubert & Izutsu, 1987). Vários estudos têm demonstrado a relação entre estresse e redução do fluxo salivar, em humanos (Morse *et al*, 1981; Gemba *et al*, 1996) e em modelos animais (Kurihara & Marcondes, 2002).

Outro fator relevante é a presença de proteínas na saliva, tais como a lisozima, mucinas, IgA, lactoferrina, dentre outras, as quais exercem uma função anti-bacteriana (Breivik *et al*, 1996). O estresse pode alterar a concentração destas proteínas, desequilibrando a relação entre os microorganismos bucais e o hospedeiro, o que poderia explicar o aumento da produção de CSV nas semanas relacionadas ao protocolo de estresse.

Outro fator, importante a ser considerado, 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 neutro ou básico a favorece (Kleinberg & Westbay, 1992).

Em nosso estudo, não realizamos a coleta de saliva dos animais e, por isso, não foi possível a coleta de dados referentes ao fluxo salivar, pH e concentração de proteínas salivares. Porém, um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, por Kurihara & Marcondes (2002), observou uma redução do fluxo salivar em ratos de laboratório ao utilizar o método de estresse por imobilização. Portanto, embora não tenham sido realizados, estes dados poderiam explicar os resultados obtidos em nosso estudo, evidenciando os efeitos do estresse crônico sobre a produção de CSV.

Em relação ao teste de natação forçada, o presente trabalho demonstrou que houve um aumento no tempo de imobilidade durante a primeira sessão. Este aumento foi observado somente nos primeiros 5 minutos do teste. Durante a segunda sessão (5 minutos), não houve nenhuma alteração no tempo de imobilidade. O grupo do estresse mostrou uma redução no número de mergulhos quando comparados ao grupo controle, sem alteração significativa na segunda sessão. Porsolt *et al*. (1977) observou que ratos, quando forçados à natação em uma situação em que não há como escapar, após um período inicial de intensa atividade, cessam essa atividade e mantêm sua cabeça sobre a água, sugerindo um

estado de desamparo, como se os animais “percebem que será impossível escapar da situação, resignando-se à condição experimental”.

Nossos resultados estão de acordo com os de Garcia- Márquez & Armário (1987), o qual investigou o efeito do choque nas patas e uma combinação de vários estressores, escolhidos diariamente, ao acaso, sobre comportamentos variáveis, tais como tempo de imobilidade, número de bolos fecais, suspensões da cabeça e mergulhos, em ratos machos adultos, medidos no dia subsequente ao da exposição ao estresse. Dois modelos de estresse crônico resultaram não somente em uma redução da atividade exploratória, mas também no aumento da imobilidade no TNF, sem mudanças no número de bolos fecais e nem no nível de ACTH. Rodriguez-Echandia *et al* (1988), observaram que ratos submetidos diariamente a estressores imprevisíveis, emocionais e físicos, por um período de 14 dias, mostraram maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, mas somente o grupo de estresse físico apresentou menor frequência de pulos (reação de escape).

Nossos resultados estão de acordo com os esperados, indicando que a imobilidade está relacionada ao desamparo aprendido dos animais, já que os ratos apresentam maior número de mergulhos, através dos quais eles buscam uma saída pelo fundo do tanque, durante os primeiros 5 minutos da primeira sessão (15 minutos). Nos últimos 10 minutos e na segunda sessão de 5 minutos, quando percebem que não poderão escapar, diminuem assim, sua atividade, o que está de acordo com Thierry *et al.* (1984).

O protocolo de ECMI é considerado como um modelo imprevisível e incontrolável (sem possibilidade de escape). Logo, o tipo de estresse utilizado (que é variável), e o tempo de aplicação são fatores de imprevisibilidade, conduzindo, assim, a alterações comportamentais. Desta forma, podemos analisar o efeito do estresse crônico sobre este teste, levando-nos à conclusão de que o estresse crônico aumenta a atividade do teste de natação forçada (Platt & Stone, 1982), e pode ser um modelo experimental válido para o estudo da relação entre estresse e produção de CSV.

8.CONCLUSÃO

Nossos dados confirmam a relação entre estresse e aumento da produção de CSV, e mostram que este efeito se manteve na ausência de estímulos estressores, e

foi acompanhado de alterações comportamentais indicativas de desamparo aprendido, mostrando que os modelos experimentais de estresse crônico moderado e imprevisível e da natação forçada podem ser muito úteis para o estudo dos mecanismos relacionados às alterações promovidas pelo estresse e que podem alterar a homeostasia bucal, contribuindo para o aumento na produção de CSV.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTIA, E.L.; MARSHAL, K.G. Halitosis. **Can Med Assoc J**, Ottawa, 126:128-135, 1982.

AMIR ,E.; SHIMONOV, R. & ROSENBERG, M. Halitosis in children. **J Pediatr.**, 134(3):338-343, 1999.

BEIJAMINI, V, SKALISZ, LL, JOCA, SRL. & ANDREATINI, R. The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. **Eur J Pharmacol.** 347: 23-27,1998.

BENZI, N.; BERTUZZI, M.; ARMARIO, A. ; GAUNA, H.F. chronic immobilization stress reduces sodium intake and renal excretion in rats. **Physiol. Behav.**, 62(6):1391-1396, 1997.

BIELAJEW C, KONKLE AT, KENTNER AC, BAKER SL, STEWART A, HUTCHINS AA, SANTA-MARIA BARBAGALLO L, FOURIEZOS G. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. **Stress.** 6(4):269-80, 2003.

BREIVIK, T.; THRANE, P.S.; MURISON, R.GJERMO,P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. 104(4):327-334, 1996.

CALIL CM, BIANCHJI FJ, TANNO AP, CUNHA TS & MARCONDES FK. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Braz J Pharmac Sci.** 38 (4): 479-485, 2002.

CALIL, C.M.; MARCONDES, F.K. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. **Life Sciences.**, 79:1712-1719, 2006.

CALIL C.M.; MARCONDES F.K. Influence of anxiety on the production of oral volatile compounds. **Life Sci.**, 79: 660-664, 2006a.

CALIL C.M., TÁRZIA O., MARCONDES F.K. Qual é a origem do mau hálito? **Revista de Odontologia da Unesp - online**, 35(3): 185-190, 2006.

CALIL, C.M.; MARCONDES, F.K. The comparison of immobility time in

experimental rat swimming models. **Life Sciences**. 79: 1712-1719, 2006.

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

ELI, I.; BAHT R.; KOZLOWSKY, A., ROSENBERG M. The complaint of oral malodor: possible psychopathological aspects. **Psychosom. Med., Baltimore**. 58(2): 156-159, 1996.

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

GARCIA-MARQUES, 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**. 40(1): 33-38, 1987.

GEMBA, H.; TERANAKA, A.; TAKEMURA, K. Influences of emotion upon parotid secretion in human. **Neurosci Lett**. 211(3): 159-162, 1996.

GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 20: 263-312, 1989.

GRIPPO, A.J.; MOFFIT, J.A.; JOHNSON, A.K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 282(5):1333-1341, 2002.

HAIKIND R, ELLER M, HARRO M, KASK A, RINKEN A, ORELAND L, HARRO J. Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in the rat. **Eur Neuropsychopharmacol**. 13(1): 19-28, 2003.

KATZ, R.J.; ROTH, K.A.; CARROLL, B.J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 5(2):247-251, 1981.

KLEINBERG, I.; WESTBAY, G. Salivary and metabolic factors involved in oral malodor formation. **J Periodontol**. 63(9), 768-775, 1992.

KOOB, G.F. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. **Biol Psychiatric**. 46(9): 1167-1180, 1999.

KURIHARA, E.; MARCONDES, F.K. Oral concentration of volatile sulphur compounds in stressed rats. **Stress**. 5(4):295-298, 2002.

LINDHE, J.; ATTSTROM, R.; BJORN, A.S. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycle. **J. Periodontal Res**. 4:97, 1969.

MARCONDES, F.K., VANDERLEI, L.C.M., LANZA, L.L.B. & SPADARI-

BRATFISCH, R.C. Stress induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can J Physiol Pharmacol.**, 74:663-669, 1996.

MARCONDES, F.K. Influência do ciclo estral sobre as respostas hormonais de ratas submetidas a estresse. **Tese de Doutorado.** Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 62pp, 1998.

MARCONDES FK, MIGUEL KJ, MELO LL, SPADARI-BRATFISCH RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav.** 74(4-5): 435-440, 2001.

MARPLE, D.N.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; BLAKE, W.H. & JUDGE, M.D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environment stressors. **J. Anim. Sci.**, 35(3): 576-579, 1972.

MARTI,O.; HARBUZ, M.S.; ANDRES, R.; LIGHTMAN, S.L.; ARMARIO, A. Activation of the hypothalamic –pituitary axis in adrenalectomized rats: potentiation by chronic stress. **Brain. Res.**, 821(1):1-7, 1999.

MIYAZAKI, H.; SAKAO, S.; KATOH, Y.; TAKEHARA, T. Correlation between volatile sulfur compounds and certain oral health measurements in the general population. **J. Periodontol.** , 66(8):679-684, 1995.

MOLINA VA, HEYSER CJ, SPEAR LP. Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. **Psychopharmacology (Berl).** 114(3):433-40, 1994.

MOREAU J.L., JENCK F., MARTIN J.R., MORTAS P., HAEFELY W.E. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. **Eur Neuropsychopharmacol.** 2(1): 43-9, 1992.

MOREAU J.L., JENCK F., MARTIN J.R., PERRIN S., HAEFELY W.E. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT_{1C} receptor activation in rats. **Psychopharmacology (Berl).** 110(1-2): 140-144, 1993.

MOREAU J.L., SCHERSCHLICHT R., JENCK F., MARTIN J.R. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. **Behav Pharmacol.** 6(7): 682-687, 1995.

MOREAU JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. **Encephale.** 23(4): 280-289, 1997.

MORSE, D.R.; SCHACTERLE, G.R.; FURST, M.L.; BOSE, K. Stress, relaxation, and saliva: a pilot study involving endodontic patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 52(3):308-313, 1981.

NANKOVA, B.B.; RIVKIN, M.; KELZ, M.; NESTLER, E.J.; SABBAN, E.L. Fos-related antigen 2: potential mediator of the transcriptional activation in rat adrenal medulla evoked by repeated immobilization stress. **J. Neurosci.**, 20(15):5647-5663, 2000.

NESSE, R.M.; YOUNG, E.A. Evolutionary origins and functions of the stress response. *In*: FINK, G. (Ed.) **Enciclopedia of stress.** 2: 79-84, 2000.

PLATT, J.E.; STONE, E.A. Chronic restraint stress elicits a positive antidepressant response on the forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.**, 82:179-181, 1982.

PORSOLT, RD, LEPICHON, M & JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.** 266: 730- 32, 1977.

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: 337-340, 2002.

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

RODRIGUEZ ECHANDIA, E.L.; GONZALES, A.S.; CABRERA, R.; FRACCHIA, L.N. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. **Physiol. Behav.**, 43(6):789-795, 1988.

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

ROSENBERG, M.; KULKARNI, G.V.; BOSY, A.; McCULLOCH C.A.G. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. **J Dent Res**, Washington, v.70, n.11, p. 1436-1440, Nov.1991.

ROSENBERG, M.; McCULLOCH, C.A. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. **J Periodontal**, Chicago 63(9): 776-782, 1992.

SCHUBERT, M.M.; IZUTSU, K.T. Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. **J Dent Res**, 66: 680-688, 1987.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, London, 138(1):32, 1936.

SPADARI-BRATFISCH, R.C.; NUNES, I.S.; VANDERLEI, L.C.M. & MARCONDES, F.K. Evidence for β 2-adrenoceptors in right atria from female rats

submitted to footshock stress. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, 77(6): 432-440, 1999.

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**, v.80, n.5, p.1441-1444, 2001.

THIERRY, B.; STERU, L.; CHERMAT, R.; SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? **Behavioral and Neural Biology**, 41(2), 180-189, 1984.

TORRELAS, A.; GUAZA, C.; BORRELI, J.; BORREL, S. Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. **Physiol. Behav.**, 26(1): 129-133-1981.

VAN DEN BROEK A, FEENSTRA L, BAAT C. A review of the current literature on etiology and measurement methods of halitosis. **J. Dentistry**, 35: 627–635, 2007.

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

VOGEL, W.H. & JENHSH, R. Chronic stress and plasma catecholamines and corticosterone levels in male rats. **Neurose.**, 87:183-188, 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.**, 105(5part2):534-537, 1997a.

WALER, S.M. The effect to some metal ions on volatile sulfur compounds originating from the oral cavity. **Acta. Odontol. Scand.**, 55(4):261-264, 1997b.

WILLNER P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacol Ther.**, 45(3): 425-55, 1990.