



PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE E DO GÊNERO SOBRE A
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS E
BIOMARCADORES SALIVARES

Piracicaba
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE E DO GÊNERO SOBRE A
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS E
BIOMARCADORES SALIVARES

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Patricia Oliveira de Lima e orientada pela Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Assinatura do Orientador

Piracicaba
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

L628i Lima, Patricia Oliveira de, 1986-
Influência do estresse e do gênero sobre a produção de compostos sulfurados voláteis e biomarcadores salivares / Patricia Oliveira de Lima. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Halitose. 2. Esgotamento profissional. 3. Ciclo menstrual. 4. Proteínas e peptídeos salivares. I. Marcondes, Fernanda Klein, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of stress and gender on the volatile sulfur compounds and salivary biomarkers production

Palavras-chave em inglês:

Halitosis

Burnout, professional

Menstrual cycle

Salivary proteins and peptides

Área de concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Fernanda Klein Marcondes [Orientador]

Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Leonardo Rigoldi Bonjardim

Luciano José Pereira

Francisco Carlos Groppo

Data de defesa: 25-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata PATRICIA OLIVEIRA DE LIMA aprovada.

Profa. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Profa. Dra. CHRISTIE RAMOS ANDRADE LEITE PANISSI

Prof. Dr. LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

Prof. Dr. LUCIANO JOSÉ PEREIRA

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

RESUMO

Além de doenças orais, o estresse e o ciclo menstrual também têm sido relacionados à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV), principais gases responsáveis pela halitose. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre alterações emocionais, associadas a atividades acadêmicas, e produção de CSV, por meio da determinação do nível de estresse, fluxo salivar, concentrações salivares de cortisol, IgA secretória (IgAs), proteínas totais, beta-defensina – 2 (β -defensina-2), atividade de alfa-amilase e expressão das proteínas mucinas 5B e 7 e lactoferrina, na cavidade oral, em mulheres (na fase menstrual do ciclo reprodutivo) e homens dos 4 anos do curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP). Os dados da análise psicológica mostraram que o estresse associado às atividades acadêmicas varia entre os anos do curso. Mulheres apresentaram maiores concentrações bucais de CSV e metil mercaptana (CH_3SH), menor fluxo salivar, maiores concentrações salivares de proteínas totais e IgAs e menor expressão salivar de mucinas 5B e 7 em relação aos homens. Em relação ao ano do curso, homens e mulheres cursando o terceiro ano do curso apresentaram maiores valores de CSV, sulfeto de hidrogênio (H_2S), alfa-amilase e mucina 5B, em relação a alunos cursando o primeiro ano. Não houve diferença entre os quatro anos da graduação nas concentrações bucais de CH_3SH e dimetil sulfeto, concentrações salivares de proteínas totais, IgAs e cortisol e valores de fluxo salivar. Alunos do terceiro ano apresentaram menores concentrações salivares de β -defensina -2, em relação a alunos do primeiro ano. Alunas cursando o terceiro e quarto anos do curso de graduação apresentaram maior expressão salivar de lactoferrina, em relação às alunas do primeiro e segundo anos. Houve correlação significativa entre os valores de CSV e H_2S , em ambos os gêneros. Nas mulheres, observou-se correlação direta entre estresse e CSV e estresse e alfa-amilase e, nos homens, entre estresse e MUC5B. Os resultados confirmam dados anteriores, reforçando a influência do estresse sobre a produção de CSV e sugerem que a β -defensina -2, mucina 5B e lactoferrina podem estar envolvidas na associação entre estresse e produção de CSV.

Palavras-chave: Halitose. Esgotamento profissional. Ciclo menstrual. Proteínas e peptídeos salivares.

ABSTRACT

Oral diseases, stress and menstrual cycle have been related to the production of volatile sulfur compounds (VSC), main gases responsible for halitosis. The aim of this study was to evaluate the relationship between emotional alterations associated with academic activities and production of VSC. The following parameters were determined: stress levels, salivary flow, salivary concentrations of cortisol, secretory IgA (SIgA), total protein and beta-defensin-2 (β -defensin -2), alpha-amylase activity, and the expression of the proteins mucin 5B and 7 and lactoferrin, in the oral cavity. Women, during menstrual phase of the reproductive cycle, and men, enrolled at Piracicaba Dental School, University of Campinas, participated in the study. The data of psychological analysis showed that the stress associated with academic activities varies between years of the course. Women showed higher oral concentrations of VSC and methyl mercaptan (CH_3SH), lower salivary flow, higher concentrations of total protein and SIgA and lower salivary expression of mucins 5B and 7 compared to men. Men and women in the third year of undergraduate course presented higher values of VSC, hydrogen sulfide (H_2S), alpha-amylase and mucin 5B compared to students in the first year. There was no difference on the oral concentrations of CH_3SH and dimethyl sulphide; salivary proteins, SIgA and cortisol concentrations and salivary flow values between the four years of the undergraduate course. Men scholars in the third year of the undergraduate course showed lower salivary concentrations of β -defensin-2 compared to the first year. Women scholars in the third and fourth years of the undergraduate course presented higher lactoferrin expression compared to students in the first and second years. There was significant correlation between VSC and H_2S in both gender. In women, it was observed correlation between stress and VSC and between stress and alpha-amylase. In men, stress and MUC5B presented positive correlation. The results confirm previous data strengthening the stress influence on the VSC production. Moreover, suggest that the proteins beta-defensin-2, mucin 5B and lactoferrin may be involved in the association between stress and VSC production.

Key Words: Halitosis. Burnout, Professional. Menstrual cycle. Salivary proteins and peptides.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
EPIÍGRAFE.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. PROPOSIÇÃO.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO 1 (COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA).....	59
ANEXO 2 (QUESTIONÁRIO AVALIAÇÃO DOS FATORES DE ESTRESSE).....	60

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Deborah e Luiz, por todo o apoio ao longo dessa jornada, não medindo esforços para que eu concluísse mais uma etapa da minha vida; por serem meus maiores admiradores e por se orgulharem dos meus feitos. Obrigada pelo amor dispensado diariamente e pelo simples abraço que conforta os meus momentos mais difíceis.

Ao Du, meu noivo, conselheiro, amigo; pelo amor que me concedes todos os dias, por ter compreendido meus períodos de ausência; por ter me apoiado durante um ano inteiro de distância, em que realizei o estágio nos Estados Unidos, sempre me incentivando a ser forte e a vencer os obstáculos que me enfraqueciam. Obrigada por me admirar, por se orgulhar de mim e por me incentivar sempre na busca de meus sonhos. Jamais teria vencido sem você.

Ao meu irmão, Luis Fernando, por ser meu grande amigo e conselheiro; por me orientar nos momentos de indecisão e estar ao meu lado sempre, independente do caminho por mim escolhido.

À minha avó Iolanda, onde quer que esteja, por orgulhar-se da minha profissão e dos meus estudos e por continuar abençoando minhas escolhas e meu caminho.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora e Orientadora Fernanda Klein Marcondes, pela paciência, solicitude, apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram à execução e conclusão deste trabalho. Admiro a dedicação que tem com seus alunos, a preocupação com a qualidade de seus projetos e a competência no exercício de seu ofício. Obrigada pelas críticas, elogios e sugestões que contribuíram para que eu sempre oferecesse o melhor de mim para a concretização desse sonho.

Espero ter correspondido à altura. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos e iluminado meu caminho; por sempre me oferecer condições e forças para lutar e alcançar os objetivos pretendidos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela infraestrutura adequada à difusão do conhecimento, permitindo a realização deste trabalho, e por tão calorosamente ter me acolhido durante os dez anos de estada nessa casa.

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

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida para que o sonho do estágio no exterior pudesse ser realizado.

Aos voluntários, que cederam parte de seu tempo, contribuindo com a realização deste trabalho.

Ao aluno de iniciação científica, Augusto Rodrigues Lima, por todo o apoio e auxílio no desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor David T. Wong, da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA), que carinhosamente me recebeu e acolheu em seu laboratório durante o estágio, entregando em minhas mãos um de seus projetos para que eu o desenvolvesse, acreditando em meu potencial, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal e possibilitando a concretização de um sonho.

À Eliete, secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas e Elisa, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e às funcionárias Ana Paula, Raquel e Érica, da Coordenadoria de Pós-Graduação, por toda a atenção dispensada e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos grandes amigos feitos na UCLA: Julie, Maha, Noe e Laurel pelos ensinamentos, pela amizade, pelos momentos de descontração; por tornarem meus dias longe de casa menos difíceis e dolorosos. Nossa amizade será eternizada em meu coração. Obrigada por serem minha família Americana e os melhores amigos que eu poderia ter.

À Deanna, minha *roommate* de Los Angeles, uma senhora de coração imenso e um exemplo de vida, com quem pude dividir muitas experiências e aprendizados durante o ano de 2013. Obrigada pela paciência em me ouvir, por sempre estender seu ombro amigo para me confortar e por ser a melhor amiga e companheira com quem eu poderia dividir o mesmo lar.

À Professora Juliana Clemente Napimoga que, pacientemente, me ensinou a técnica do Western Blot, orientando-me na padronização e concretização de minhas análises.

Aos meus amigos da Fisiologia: Andrea, Augusto, Cris, Fabi, Monaliza, Nádia e Rafa

pela amizade e companheirismo; pelo apoio mútuo durante todos esses anos de vida acadêmica na FOP, tornando meus dias mais alegres.

À Eliane e Feliciano, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas conversas e gargalhadas trocadas nos corredores. Obrigada pelo carinho e amizade.

Às faxineiras da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo sorriso no rosto a todo momento, o qual nos contagia e irradia nossos dias. Obrigada pela amizade e carinho dispensados.

Aos colegas da Farmacologia: Lívia Galvão, Clayton, Camilinha, Luiz, Bruno e Luciano pelos momentos de descontração.

A todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertold Brecht

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

β - defesin 2 – Beta-defensina 2

CH₃SH – Metil mercaptana

(CH₃)₂S – Dimetil sulfeto

CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina

CSV – Compostos sulfurados voláteis

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

H₂S – Sulfeto de hidrogênio

IgAs - Imunoglobulina A secretória

NPH - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

ppb – partes por bilhão

SNS- Sistema Nervoso Simpático

VRSCWT- Video Recorded Stroop Color Word Test

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 o mau hálito seja considerado um problema de saúde pública, muitas vezes médicos e dentistas carecem de informações acerca da etiologia e terapêutica apropriadas que permitam um correto diagnóstico e tratamento da doença.

A microbiota anaeróbica do biofilme lingual, especialmente do dorso posterior da língua, é a principal responsável pela liberação de compostos sulfurados voláteis (CSV), os quais estão diretamente envolvidos na ocorrência de halitose (Messadi & Younai, 2003). Além disso, a halitose também está associada à gengivite e doença periodontal (Yaegaki & Sanada, 1992; Seeman *et al.*, 2014). Entretanto, alguns pacientes queixam-se de tal desordem sem evidência de doença oral ou causa clínica que justifiquem a sua ocorrência. Diante disso, o estresse tem sido sugerido como um fator que pode favorecer o surgimento do mau hálito (Queiroz *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006, Lima *et al.*, 2013).

Considerando que o uso da saliva para o diagnóstico de doenças e alterações bucais tem crescido extensivamente, o estudo das alterações na composição da saliva é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento de CSV induzido por alterações emocionais. A coleta de saliva é um método não invasivo e por isso apresenta maior aceitação pelos pacientes, em relação à coleta de sangue (Yoshizawa *et al.*, 2013).

Na saliva é possível a dosagem de diferentes substâncias tais como hormônios (cortisol), enzimas (alfa-amilase, lisozima), imunoglobulinas (imunoglobulina A), proteínas (mucinas, lactoferrina e beta-defensina) e DNA (David & Gerald, 2007). A concentração salivar de cortisol permite avaliar a atividade secretória do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sendo por isso aceito como um marcador de estresse, enquanto a alfa-amilase tem sido proposta como biomarcador do estresse, por ser um indicador da atividade simpática (Rohleder *et al.*, 2006; Nater & Rohleder, 2009).

Ainda em relação à importância dos componentes salivares na proteção da cavidade oral, a beta-defensina é um peptídeo antimicrobiano que compõe o sistema imune

inato, considerado a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos, e exibe propriedades antimicrobiana e imunomodulatória (Ghosh *et al.*, 2007, Jarczack *et al.*, 2013). Nesse sentido, é conhecido que o estresse psicológico pode afetar o sistema imune inato, alterando a resposta imune (Cohen & Herbert, 1996; Mc Ewen, 2000). Aberg *et al.* (2007) observaram que o estresse psicológico reduziu a expressão epidermal de beta-defensina, aumentando a susceptibilidade a infecções.

O estresse, bem como sua relação com saúde e bem-estar, entre estudantes da área de saúde, tem sido muito estudado nas últimas décadas. O estresse acadêmico, originado durante o processo de treinamento educacional, muitas vezes conduz ao estresse ocupacional durante o exercício da profissão, podendo favorecer a ocorrência de depressão, ansiedade e diminuição da eficácia profissional (Freeman *et al.*, 1995; Heath *et al.*, 1999). Diferenças de gênero também têm sido relatadas frente ao estresse causado por atividades acadêmicas. Essas diferenças sexuais na resposta do eixo HPA possivelmente estão relacionadas à diferenças de sensibilidade dos receptores de glicocorticoides aos hormônios sexuais (Bourke *et al.*, 2012).

Neste contexto, é conhecido que as oscilações hormonais características do ciclo menstrual podem alterar a homeostasia bucal e interferir em tratamentos odontológicos, como tem se observado através do aumento de exsudato gengival, descamação de células epiteliais da cavidade oral (Loe & Silness, 1963; Lindhe & Attsfröm, 1967) e também pela produção de CSV (Queiroz *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2013) e surgimento da halitose (Tonzetich *et al.*, 1978). Entretanto, essas relações ainda não estão esclarecidas.

Assim, com o objetivo de complementar estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, no presente estudo avaliamos a relação entre produção de CSV, estresse associado a atividade acadêmicas e alteração na concentração e expressão salivar de biomarcadores, em homens e em mulheres (na fase menstrual).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O mau hálito é um termo usado para descrever um odor desagradável exalado no ar expirado. Sua origem deve-se à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV), especialmente H_2S , CH_3SH , e $(CH_3)_2S$, na cavidade bucal. Estes compostos resultam da degradação proteolítica, por bactérias orais gram-negativas, de aminoácidos que contêm enxofre e estão presentes em restos alimentares, saliva, sangue e células epiteliais descamadas (Rosenberg *et al.*, 1991; Rosenberg & Mc Culloch, 1992; Springfield *et al.*, 2001).

A mensuração dos CSV pode ser feita por meio de monitores de sulfeto e por cromatografia gasosa (Yaegaki & Coil, 2000). Os monitores de sulfeto apresentam baixo custo, fácil manuseio e pequenas dimensões, facilitando seu uso na prática clínica, destacando-se, dentre eles, o Halímetro[®]. Já os cromatógrafos gasosos permitem a separação e quantificação dos gases, porém estes aparelhos exigem a presença de pessoal qualificado e alto custo de instalação, inviabilizando seu uso na prática clínica. Recentemente, um cromatógrafo portátil (Oral ChromaTM) tem sido utilizado para avaliar as concentrações de CSV na cavidade oral (Aizawa *et al.*, 2005).

Na maioria dos casos, a halitose tem origem na cavidade oral (cerca de 90%), sendo que em 40% destes casos deve-se à formação de saburra lingual, principalmente no terço posterior do dorso da língua (Springfield *et al.*, 2001; Calil *et al.*, 2008). A halitose de origem extra-oral está relacionada à inflamação nasal, sinusite crônica, e em casos raros, a doenças sistêmicas tais como *diabetes mellitus*, cirrose hepática e úlceras gastrointestinais (Calil & Marcondes, 2012).

Entretanto, embora a maioria dos casos de halitose seja de origem bucal, o estresse também tem sido sugerido como um agente etiológico do mau hálito, já que muitas vezes o paciente não apresenta nenhuma evidência clínica de patologias bucais ou desordens sistêmicas que justifiquem sua causa. Diante disso, alguns estudos têm avaliado a influência das alterações emocionais (estresse e ansiedade) sobre a produção de CSV (Kurihara & Marcondes, 2002; Queiroz *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006; Lima *et al.*, 2013).

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 (Sanders & Lushington, 2002; Alzahem *et al.*, 2011). 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, frequentes avaliações, problemas financeiros para realizar o curso e tempo limitado para o lazer, conduzindo a desordens de ansiedade e depressão (Vitaliano *et al.*, 1984; Newbury-Birch *et al.*, 2002; Bérzin, 2007). Além disso, características de personalidade, como perfeccionismo severo, comum em profissionais da saúde, têm sido também relacionadas ao maior risco de desordens psicológicas nestes profissionais, tornando-os mais ansiosos em comparação com a população em geral (Henning *et al.*, 1998).

Barbería *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. Fernandes *et al.*, (2007) observaram correlação positiva entre disfunção têmporo-mandibular e ansiedade nos alunos de um curso de Graduação em Odontologia, sendo o maior nível de ansiedade observado em alunos que cursavam do 5º ao 7º semestre. Estes autores observaram que o aumento da ansiedade, nos semestres intermediários do curso, estava associado às características de personalidade dos estudantes, às expectativas futuras ou a circunstâncias pessoais dos estudantes e também ao estresse gerado por situações específicas do atendimento clínico de pacientes. Além disso, 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.

É conhecido que algumas características individuais podem influenciar a resposta às alterações emocionais, como por exemplo, o gênero, ciclo reprodutivo e a idade (Bánky *et al.*, 1994; Horan, 2000). Alguns autores relataram que os hormônios sexuais apresentam potentes efeitos na manutenção da integridade dos tecidos periodontais e que as mudanças hormonais podem resultar em um aumento do fluido gengival, fornecendo nutrientes para microrganismos anaeróbios gram-negativos (Güncü *et al.*, 2005; Koreeda *et al.*, 2005). Assim, há evidências na literatura de que há influência das oscilações hormonais, características do ciclo menstrual, sobre a homeostasia bucal, sendo que alguns estudos têm

demonstrado que estas podem influenciar a produção de CSV em mulheres (Tonzetich *et al.*, 1978; Queiroz *et al.*, 2002; Calil & Marcondes, 2006).

Neste contexto, alguns estudos observaram que ocorre aumento da produção de CSV durante as fases pré-menstrual (Calil *et al.*, 2008) e menstrual do ciclo reprodutivo (Prout & Houps, 1970; Tonzetich, 1978; Calil *et al.*, 2008), o qual foi relacionado ao aumento no número de bactérias na cavidade oral durante a menstruação, podendo promover alterações na permeabilidade gengival durante o ciclo menstrual, conduzindo a um acréscimo na produção de CSV. Além disso, Tonzetich (1978) sugere uma exacerbação da descamação epitelial da mucosa oral que ocorre no período menstrual do ciclo reprodutivo. Calil *et al.* (2008) sugeriram que a progesterona poderia estar relacionada ao aumento da produção de CSV por efeitos na microcirculação, produção de colágeno e processo inflamatório gengival. Porém, os mecanismos envolvidos na relação entre hormônios sexuais e produção de CSV não está esclarecido. Diante disso, é válido ressaltar a importância de se avaliar a influência dos hormônios sexuais e sua relação com o estresse crônico associado a atividades acadêmicas e produção de CSV em voluntários do gênero feminino.

Ainda em relação às alterações emocionais, o estresse age sobre o sistema límbico, levando ao aumento na liberação de glicocorticóides (cortisol) pelo córtex da adrenal (Kar & Blair, 1991) e, simultaneamente, ativando o sistema nervoso simpático, resultando em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas. Estas, juntamente com o cortisol, agem em receptores nas células imunes sanguíneas, produzindo diversos efeitos regulatórios que resultam na diminuição das funções imunes do organismo (Ader *et al.*, 2001). Embora recentes estudos tenham evidenciado que o estresse pode comprometer as defesas do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas (Hunzeker *et al.*, 2004; Vitlic *et al.*, 2014), os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos.

A saliva contém vários tipos de peptídeos antimicrobianos que apresentam importante papel na imunidade inata, como peroxidases, lactoferrina, lisozima e histatina (Mandel, 1987; Levy, 1996). Em situações de hipossalivação, como aquelas induzidas por terapia de radiação de cabeça e pescoço, ou mesmo em indivíduos com síndrome de Sjögren, algumas proteínas salivares podem ter suas concentrações aumentadas, como observado para a lactoferrina, ou diminuídas, conforme relatado para a mucina MUC5B (Almståhl *et al.*,

2001). Por serem antibacterianas, alterações nos níveis dessas proteínas também poderiam favorecer o acúmulo de microrganismos e, conseqüentemente, a produção de CSV.

As mucinas são glicoproteínas com baixa solubilidade, alta viscosidade, elasticidade e aderência (Almståhl *et al.*, 2001) e a sua interação com diversos microrganismos tem sido demonstrada em vários trabalhos (Murray *et al.*, 1992; Veerman *et al.*, 1997). Em relação à associação dessas proteínas às alterações emocionais, Bosch *et al.* (2003) observaram aumento na secreção de mucinas na saliva de indivíduos submetidos a uma situação de estresse experimental. Nesse sentido, especula-se que a indução de estresse e ansiedade possam provocar um aumento das concentrações de mucinas (Tárzia, 2003) e estas, por sua vez, poderiam contribuir para o aumento de microrganismos e de substratos responsáveis pela maior produção de CSV.

Um grupo de peptídeos que medeiam a resposta imune inata foi detectado na década de 90: as defensinas (Mathews *et al.*, 1999; Mizuwaka *et al.*, 1998). Defensinas são divididas em duas subfamílias – as α -defensinas e as β -defensinas. As últimas são produzidas, principalmente, por células epiteliais de muitos órgãos, como pele, olhos, útero e mucosas nasal e oral (Abiko & Saitoh, 2007), exibindo atividade antimicrobiana, incluindo bactérias relacionadas à doença periodontal e halitose, apresentando, assim, grande relevância para a saúde e doenças da mucosa oral (Abiko *et al.*, 2003).

Beta-defensinas têm demonstrado atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e certos vírus encapsulados (Smet & Contreras, 2005; Yadava *et al.*, 2006). Também tem sido demonstrada sua ação antiviral por inibir a infecção do vírus HIV-1 em células imunocompetentes (Quiñones-Mateu *et al.*, 2003). Além disso, podem aumentar a imunidade adaptativa por agir como coadjuvantes de células T, células dendríticas imaturas, células B, neutrófilos e macrófagos (Yang *et al.*, 1999; Tani *et al.*, 2000).

Três subtipos de β -defensinas foram isolados dos tecidos orais humanos: β -defensinas-1 são geralmente expressas constitutivamente por células epiteliais, sendo que os tipos -2 e -3 são somente expressos por células epiteliais após serem estimulados pelo processo inflamatório ou após terem sido expostos a microrganismos (O'Neil *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2007).

Em relação ao espectro de ação das β -defensinas, as do tipo 1 apresentam alta

atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e ao fungos. O tipo 3 apresenta potente ação contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Já as β -defensinas-2 apresentam um grande efeito bactericida contra espécies gram-negativas e fungos, mas uma fraca ação bacteriostática contra espécies gram-positivas (Abiko *et al.*, 2003).

A expressão alterada das β -defensinas tem sido observada em doenças inflamatórias orais. Verificou-se que bactérias relacionadas à doença periodontal (algumas delas também relacionadas à produção de CSV), tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* aumentaram a expressão de β -defensinas em queratinócitos orais (Dommisch *et al.*, 2005; Ouhara *et al.*, 2006). Recentemente, Pereira *et al.* (2013) observaram que indivíduos com periodontite apresentaram maior concentração de β -defensina-2 quando comparados a indivíduos saudáveis, porém este aumento não foi correlacionado com a frequência de bactérias que causam a doença periodontal.

Atualmente, numerosos fatores têm sido relatados por contribuir para o desenvolvimento de doenças orais, por exemplo, idade, fumo, doenças sistêmicas e estresse. O estresse psicológico pode afetar o sistema imune através de uma *down-regulation* da resposta do sistema imune inato. Esse mecanismo é regulado primariamente pela liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea (Yang & Glaser, 2002). Nesse sentido, alguns estudos observaram que a administração de glicocorticoides exógenos pode interferir nas concentrações de beta-defensinas, reduzindo (Varoga *et al.*, 2008) ou estimulando (Terai *et al.*, 2004; Witthöft *et al.*, 2005) a sua produção em diferentes células humanas; porém, seus efeitos em células epiteliais ainda necessitam ser esclarecidos. Portanto, associadamente às proteínas salivares, a β -defensina parece apresentar importante função na proteção da cavidade oral.

Diante disso, este estudo busca avaliar se o estresse crônico associado a atividades acadêmicas influencia a produção de CSV, avaliando os fatores salivares envolvidos nessa relação, através da expressão de mucinas, concentração da β -defensina -2 e de outras proteínas salivares, considerando também a influência do gênero, já que as oscilações hormonais, características do ciclo menstrual, podem exacerbar estas respostas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre alterações emocionais, associadas a atividades acadêmicas, e produção de CSV, e avaliar fatores envolvidos na relação entre estresse e produção de CSV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Identificar a ocorrência de alterações emocionais relacionadas a atividades acadêmicas em alunos, durante um curso de graduação em Odontologia, por meio de avaliação psicológica, mensuração do fluxo salivar, e dosagem de marcadores salivares de estresse: cortisol e alfa-amilase;
- 3.2.2 Determinar a concentração bucal CSV, em alunos, durante um curso de graduação em Odontologia;
- 3.2.3 Determinar a concentração salivar de imunoglobulina A secretória (IgAs), proteínas totais e de β -defensina 2 e expressão das proteínas lactoferrina e mucinas MUC5B e MUC7, na cavidade oral, em alunos, durante um curso de graduação em Odontologia;
- 3.2.4 Avaliar se o ciclo menstrual interfere nos parâmetros acima indicados, por meio da realização deste estudo em mulheres (na fase menstrual do ciclo) e homens.
- 3.2.5 Determinar se há correlação entre a produção de CSV e os fatores salivares avaliados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Este projeto, antes de ser iniciado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (CEP – FOP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob o número de registro nacional no Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (SISNEP) 0107.0.167.000-07 (Anexo 1). Por tratar-se de continuação de estudo anterior, a data do protocolo é anterior ao início desta tese. A coleta de dados ocorreu entre 2010 e 2011.

Os voluntários foram selecionados entre alunos do curso de Graduação em Odontologia da FOP - UNICAMP. Após a seleção, os voluntários receberam um material informativo contendo a explicação dos procedimentos que seriam utilizados, as recomendações para o dia do teste, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Neste termo, foram explicados os objetivos e justificativas para a realização do estudo, os riscos e benefícios aos quais estariam expostos, e demais itens descritos nas Diretrizes do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96). Após a leitura do documento, foram esclarecidas todas as dúvidas dos voluntários, que posteriormente assinaram duas vias do termo. Uma das vias foi entregue ao voluntário e a outra foi entregue à pesquisadora. Foi também garantido ao voluntário o direito de se recusar em participar do estudo em qualquer momento, sem nenhum prejuízo, e lhe foi informado o telefone dos pesquisadores para a solução de quaisquer dúvidas que pudessem surgir posteriormente.

4.2 Seleção dos Voluntários

Todos os voluntários que se dispuseram a participar do estudo eram saudáveis, sem alterações bucais ou sistêmicas. Os parâmetros cardiovasculares avaliados (pressão arterial sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca) apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade, em homens e mulheres e não apresentaram diferenças entre os anos do curso de graduação e gênero.

Alunos do primeiro ao quarto anos (mulheres, na fase menstrual do ciclo, e homens), com faixa etária entre 17 e 26 anos, do curso de Graduação em Odontologia da

FOP – UNICAMP foram convidados a participar deste estudo. Participaram do estudo 79 alunos e 56 alunas do curso de graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, sendo 24 alunos do primeiro ano, 19 alunos do segundo ano, 18 alunos do terceiro ano e 18 alunos do quarto ano. Em relação ao gênero feminino, participaram 18 alunas do primeiro ano, 14 alunas do segundo ano, 13 alunas do terceiro ano e 11 alunas do quarto ano do mesmo curso de graduação.

Os voluntários selecionados foram aqueles que não apresentaram doenças periodontais, cáries, língua saburrosa, próteses, aftas e/ou ulcerações, alterações sistêmicas e/ou naso-faríngeas e respiração bucal, não eram fumantes e nem faziam uso de medicamentos, já que todos esses fatores podem favorecer a produção dos CSV no hálito. A tabela 1 mostra o desenvolvimento do processo de seleção dos voluntários, até a obtenção do número final, após a exclusão dos voluntários que não atendiam aos requisitos.

Tabela 1. Número de voluntários de cada ano do curso de graduação, considerando o número de matrículas e motivos para não participação no estudo.

	Ano da Graduação							
	1º ano		2º ano		3º ano		4º ano	
	H	M	H	M	H	M	H	M
Alunos matriculados	27	60	23	56	21	52	29	42
Recusaram a participar	2	19	3	23	1	19	6	14
Usuários de medicamentos	1	5	-	4	1	5	2	2
Fumantes	-	-	1	-	1	1	3	-
Mulheres com ciclo irregular	-	5	-	3	-	-	-	-
Usuárias de CO	-	13	-	12	-	14	-	15
Participantes no estudo	24	18	19	14	18	13	18	11

H = homens; M= mulheres; CO = contraceptivos orais

Para avaliação das condições bucais do paciente, antes de se submeterem ao experimento, foi realizada anamnese e exame clínico intra-oral minucioso em cada voluntário. Neste, observou-se a condição periodontal, através de um índice de placa e gengival, sendo que os voluntários com mais de 10% de placa foram excluídos da amostra. Neste exame também foi avaliada a presença e o grau de saburra lingual dos voluntários, seguindo-se o seguinte índice (Miyazaki *et al.*, 1995; Calil *et al.*, 2008):

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

Todos os voluntários receberam limpadores linguais e instrução de higienização da língua. Aqueles que apresentassem grau 2 ou 3 de saburra foram instruído a higienizar a língua de forma correta e retornarem, no prazo de 10 dias, para novo exame clínico e avaliação de inclusão na pesquisa. Todos os voluntários se enquadraram na pesquisa em relação a esse critério.

Para as mulheres, o período de seleção teve início seis meses antes do experimento para a determinação da duração do ciclo menstrual e de suas fases. Foram selecionadas aquelas que apresentaram regularidade no ciclo, sem a administração de qualquer anticoncepcional oral ou injetável.

O número de alunos selecionados foi estabelecido após assessoria estatística, de acordo com o número de homens e mulheres efetivamente matriculados em cada ano do curso de Graduação em Odontologia, a fim de considerarmos a população real de alunos matriculados em cada período do curso, durante os anos de 2010 e 2011. Os alunos que foram avaliados no ano de 2010, não foram avaliados no ano seguinte, ou seja, apenas novos alunos foram incluídos na pesquisa.

Os voluntários passaram por avaliação clínica realizada por uma psicóloga para determinação do nível de ansiedade, estresse e outras alterações emocionais, bem como de fatores relacionados.

4.3 Delineamento experimental

Em data pré-determinada, cada voluntário (a) foi solicitado (a) 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 da concentração bucal de CSV. Em seguida, as amostras de saliva foram centrifugadas (a 4000g por 10 minutos, à temperatura de 4°C) e armazenadas em freezer para posterior determinação da atividade de alfa-amilase, das concentrações de cortisol, proteínas totais, beta-defensina 2, IgAs e da expressão de mucinas e lactoferrina. Os voluntários do gênero masculino se submeteram a novas avaliações da pressão arterial e frequência cardíaca, medida de CSV e coletas de saliva, 7 e 15 dias após, no mesmo horário, para maior precisão

na avaliação do nível de estresse, evitando-se, desta forma, avaliação única.

Em relação às mulheres, como em estudo anterior confirmamos que o ciclo menstrual influencia, em situação basal, a produção bucal de CSV, sendo que mulheres nas fases pré-menstrual e menstrual apresentaram maiores concentrações de CSV do que mulheres na fase folicular e homens (Calil *et al.*, 2008), participaram deste estudo mulheres na fase menstrual, com ciclo regular. Como a realização de três medidas próximas, com intervalo de uma semana, implicaria em fases diferentes do ciclo reprodutivo, para as mulheres, as coletas foram realizadas duas vezes, com intervalo de aproximadamente um mês entre elas (conforme o ciclo menstrual, regular, de cada voluntária). Em cada mês, durante três dias consecutivos, a saliva foi coletada para maior precisão na determinação da concentração salivar de cortisol. Assim, as avaliações em voluntárias do gênero feminino 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.

O curso de Odontologia da FOP/UNICAMP é semestral, ou seja, as disciplinas se modificam do primeiro para o segundo semestre do curso de graduação. Considerando-se o fato de as disciplinas serem diferentes em cada semestre e que este fator poderia influenciar os níveis de estresse a que os alunos foram submetidos, padronizamos temporalmente os experimentos para que fossem realizados sempre no segundo semestre de cada ano.

Como a medida de CSV requer uma padronização, que consiste em condição de jejum, e sabendo que todos os voluntários iniciam suas aulas às 8:00h da manhã, foi feita avaliação e coleta de amostras de no máximo três voluntários por dia, para evitar atrasos em suas atividades acadêmicas. Cuidado foi tomado para que a coleta de dados não ocorresse em dias de prova ou atividades que induzissem ansiedade, tais como seminários e atividade clínica, conforme indicação dos próprios voluntários. Terminado o experimento, foi oferecido um café da manhã completo nas dependências do departamento de Ciências Fisiológicas da FOP- UNICAMP.

4.4 Caracterização do Ciclo Menstrual

Participaram do estudo apenas mulheres que não faziam uso de contraceptivos orais e apresentavam regularidade no ciclo menstrual. Considerando-se que um ciclo menstrual regular apresenta-se dentro de um período entre 24 e 34 dias, este intervalo de tempo foi utilizado em nosso estudo como critério para regularidade do ciclo menstrual.

A determinação do ciclo menstrual foi realizada pelo método do calendário. Optamos por este método por ser preciso, quando há regularidade do ciclo menstrual, e por eliminar as coletas de sangue, já que todo procedimento invasivo seria mais um agente estressor no protocolo experimental.

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

Foi solicitado à cada voluntária que entrasse em contato com os pesquisadores no primeiro dia do fluxo menstrual. Desta maneira, se as mesmas não apresentassem atividades clínicas, exames, provas ou quaisquer avaliações que pudessem aumentar os níveis de estresse, um agendamento seria feito para que as avaliações ocorressem no segundo ou terceiro dia de fluxo menstrual. Caso contrário, as avaliações eram transferidas para o mês seguinte.

4.5 Medida do Fluxo Salivar

Foi feita a coleta de saliva não estimulada, de acordo com Tárzia (2003). O voluntário foi orientado a deglutir a saliva, que se encontrava na boca, e em seguida depositar no frasco, mantido em gelo, 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 proteínas salivares (-

70°C).

4.6 Medida dos Compostos Sulfurados Voláteis (CSV)

Todos os voluntários 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, loção após barba e outros compostos com derivados alcoólicos, no dia do experimento.

A mensuração dos CSV foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso, o Oral Chroma™ (Oral Chroma™, Abilit Corporation, Osaka, Japão). Para essas medidas, uma seringa foi inserida na cavidade oral dos voluntários, pedindo-lhes que a segurassem com os lábios sem que encostassem a língua em sua extremidade, durante o tempo de 1 minuto. Após esse tempo o êmbolo da seringa foi puxado e o ar coletado da cavidade oral dos voluntários até a marca de 1mL, sendo que metade desse conteúdo foi descartada, e, com a ajuda da seringa, 0,5 mL de ar coletado foi inserido no aparelho. Após 8 minutos de leitura, os CSV foram mensurados em: sulfeto de hidrogênio (H₂S), metil mercaptana (CH₃SH) e dimetil sulfeto (CH₃)₂S (Hanada *et al.*, 2002).

Imediatamente após a inserção do ar coletado na seringa no Oral Chroma™, medidas dos CSV também foram realizadas utilizando-se um Halímetro® (*Halímetro RK17K, n de série H15248*, Interscan Co), de acordo com o protocolo descrito por Calil & Marcondes (2006) e Lima *et al.* (2012). Primeiramente, foi solicitado que o voluntário permanecesse com a boca fechada por um minuto. Em seguida, uma cânula de plástico foi introduzida na cavidade bucal e assim o voluntário permaneceu com a boca entreaberta, aproximadamente 1,5 cm. Recebeu orientações para não mover a língua e os lábios durante a coleta e assim evitar que os mesmos tocassem a cânula e interrompessem a sucção do ar bucal pelo aparelho. A respiração foi interrompida durante a coleta, sendo que o voluntário foi orientado a expirar o ar e retornar a respirar caso sentisse algum desconforto. O ar expirado foi 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 valor expresso em ppb através de um monitor digital. Foram anotados dois valores, e

posteriormente, feita uma média.

4.7 Avaliação Psicológica

Os voluntários foram solicitados a comparecer a uma avaliação clínica com uma psicóloga, a qual foi realizada, durante o horário de almoço, no período entre as duas avaliações em que foram realizadas as coletas de amostras, para as mulheres, ou no período entre as três coletas realizadas para os homens, ou seja, dentro de um intervalo de 30 dias para as mulheres e de 21 dias no caso dos homens, visando assim uma melhor caracterização do nível de estresse, ansiedade e outras alterações emocionais. Foi utilizado um questionário para avaliação dos fatores de estresse, elaborado por uma psicóloga, a fim de investigar a origem do estresse presente em cada ano da graduação (Anexo 2).

4.8 Dosagens Bioquímicas

A concentração salivar de cortisol e a atividade de alfa-amilase foram determinadas por ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se kits comerciais (Salimetrics, State College, PA, USA). Todas as amostras foram determinadas em duplicata. O kit para determinação de cortisol é acompanhado por uma placa sensibilizada com anticorpos monoclonais para cortisol. O cortisol presente em padrões e amostras compete com o cortisol ligado à enzima “peroxidase de rábano silvestre” pelos sítios de ligação de anticorpos. Após incubação, os componentes não ligados são lavados e eliminados da placa. O reagente tetrametilbenzidina (TMB) é utilizado para mensurar a ligação entre cortisol e peroxidase, produzindo uma coloração azul. Ácido sulfúrico é então adicionado à solução a fim de pará-la, resultando na coloração amarela. A densidade óptica é lida, através da intensidade de coloração, em um comprimento de ondas de 450 nm. Os coeficientes de intra e inter-ensaio foram de 3,65% e 6,41%, respectivamente (Chard, 1990; Kosaka *et al.*, 2014).

Os níveis de alfa-amilase foram mensurados através de uma técnica colorimétrica. O princípio desse teste é baseado na utilização de um substrato cromogênico, o 2-cloro-p-nitofenol, ligado à maltotriose. A reação enzimática da alfa-amilase nesse substrato, produz 2-cloro-p-nitofenol, o qual pode ser medido pelo espectrofotômetro a um

comprimento de onda de 405 nm. Para essa mensuração, a placa e a solução de substrato devem estar previamente aquecidos a uma temperatura de 37°C. As amostras de saliva foram diluídas com um diluente de alfa-amilase, fornecido pelo fabricante. Adicionou-se 8 µL dos controles e das amostras diluídas à placa aquecida e, imediatamente, foram adicionados 320 µL da solução de substrato de alfa-amilase sobre as amostras. Misturou-se a reação até o tempo de 1 minuto após a adição da primeira amostra e realizou-se a primeira leitura no leitor de placas. A placa foi retornada ao agitador e uma nova leitura foi realizada no tempo exato de 3 minutos após o início do procedimento. A atividade de alfa-amilase é diretamente proporcional à absorbância medida e o cálculo foi realizado baseando-se no resultado da subtração das absorbâncias obtidas nas duas medidas (primeiro e terceiro minutos). Os coeficientes de intra e inter-ensaio foram de 6,7% e 5,8%, respectivamente (Granger *et al.*, 2006).

IgA secretória também foi determinada por ELISA utilizando-se kit comercial da Salimetrics (Shirtcliff *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2013). Essa metodologia exige uma pré-diluição dos padrões, controles e amostras em tubos de microcentrifuga com um reagente para diluição, fornecido pelo kit, adicionando-se 4 mL de diluente para 10 µL dos padrões, controles, zero e amostras de saliva. Em seguida, 50 µL de conjugado foi adicionado às amostras e, após agitação, as mesmas foram incubadas durante o intervalo de tempo de 90 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, 50 µL de cada solução adicionada aos tubos, foi transferida para a placa e um novo período de incubação, sob agitação, de 90 minutos foi realizado. Após uma sequência de seis lavagens, 50 µL de TMB foi adicionado em cada pocinho e a placa foi agitada por 5 minutos a 500 rpm. Finalmente, 50 µL da solução STOP foi adicionada a cada pocinho e, após agitação de 3 minutos, a leitura foi realizada utilizando-se um comprimento de onda de 450 nm, dentro de um intervalo de 10 minutos. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A quantificação de IgAs na saliva foi realizada plotando-se os resultados relativos a absorbância de cada amostra com uma curva de calibração construída a partir de concentrações conhecidas. O coeficiente de intra e inter-ensaios foram de 5,32% e 8,93%, respectivamente.

A concentração total de proteínas na saliva foi determinada pelo método de Micro BCA, utilizando-se kit comercial (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) (Huang *et al.*, 2010).

Inicialmente, 150 µl de cada padrão ou amostra desconhecida foram adicionados, em duplicata, em cada poço da placa. Em seguida, adicionou-se 150 µl da solução WR em cada poço contendo amostras ou padrões e misturou-se a placa na mesa agitadora por 30 segundos. A placa foi, então, coberta e aquecida a 37°C, durante o período de 2 horas. Após o resfriamento da placa, em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em absorbância próxima à 562 nm (540-590) no leitor de placas. O cálculo da concentração foi feito em arquivo do Excel, plotando-se os resultados relativos à absorbância de cada amostra com uma curva de calibração.

A quantificação da β-Defensina 2 na saliva foi realizada através de ensaio imunoenzimático ELISA, o qual baseia-se na especificidade da reação antígeno-anticorpo (Forte *et al.*, 2010). Inicialmente, 100 µl (0,25 µg/ml) de anticorpo específico (anti β-Defensina 2) foram adicionados a cada poço de uma placa de poliestireno (96 poços) para sensibilização da mesma. Após este procedimento, a placa foi incubada por um período de 14 horas (overnight). Em seguida, a placa foi lavada (0,05% Tween-20 em PBS) e 300 µl de solução de bloqueio (1% BSA em PBS) foram adicionados em cada poço. O tempo de incubação para esta etapa foi de 1 hora. Após nova lavagem, 100 µl das amostras foram adicionados nos respectivos poços. Posteriormente ao período de incubação (2 horas) e lavagem da placa, 100 µl do anticorpo de detecção (0,5 µg/ml) foram adicionados em cada poço, e esta placa foi incubada por 2 horas. Ao final do procedimento de lavagem, 100 µl de Avidin-horseradish peroxidase - Avidin-HRP (diluído 1:2000 em PBS) foram adicionados. Finalmente, após 30 minutos de incubação, a placa foi lavada e 100 µl de uma solução contendo o substrato enzimático ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) foram adicionados a cada poço. O desenvolvimento de cor em cada poço foi monitorado com o emprego de um leitor de ELISA (comprimento de onda: 405 nm). A quantificação de β-Defensina 2 na saliva foi realizada plotando-se os resultados relativos a absorbância de cada amostra com uma curva de calibração construída a partir de concentrações conhecidas dos respectivos antígenos (8-1000 pg/ml). Todo o experimento foi executado em duplicata.

4.9 Expressão das Proteínas Salivares por Western Blot

O método para determinação das expressões de três proteínas salivares (MUC5B ou MG1, MUC7 ou MG2, e lactoferrina) foi realizado por Western Blot. Foram utilizados 80 µg de saliva de cada voluntário. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS a 10%, a 40 mA, preparados com o auxílio de uma cuba mini-vertical para corrida dos géis (BioRad). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a 50 V, com auxílio de aparato de cuba mini-vertical para transferência de géis (BioRad), overnight no caso das mucinas, e durante 2 horas no caso da lactoferrina. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas, overnight, com tampão de bloqueio TBST (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20), contendo 5% de leite desnatado. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Santa Cruz) em TBST com 5% de leite, durante o período de 2 horas, em temperatura ambiente e sob agitação. Após 6 lavagens de 5 minutos com TBST, as membranas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação, com anticorpo IgG purificado anti-rabbit conjugado com peroxidase (Santa Cruz) em TBST com 5% de leite desnatado. Após nova série de 6 lavagens, as reações com anticorpo secundário foram então reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham Pharmacia, EUA). Para isso, as membranas foram lavadas, durante 1 minuto, em temperatura ambiente, com a solução de detecção de ECL e a seguir expostas ao mesmo filme de raios X, durante 1 minuto. Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução foram capturadas em scanner de densitometria (BioRad GS-700, Imaging Densitometer), para obtenção das medidas de intensidade das bandas reativas. Após a densitometria de todas as bandas, cada banda (corresponde à proteína de um voluntário) teve subtraído o valor do seu respectivo controle, a alfa-tubulina, resultando no valor final (Clemente-Napimoga *et al.*, 2009).

Os tempos de corrida, transferência e as diluições para os anticorpos, para cada proteína, estão expostos na tabela 2.

Tabela 2. – Detalhamento de massas, tempos, concentrações e peso molecular das proteínas cujas metodologias foram realizadas através da técnica de Western Blot.

Proteínas	Concentração das proteínas	Tempo de corrida	Tempo de transferência	Diluição do Ac 1º	Diluição do AC 2º	Peso molecular
MUC7	80 µg de proteína	3 horas	Overnight, em geladeira	1:800	1:5000	198 KDa
MUC5B	80 µg de proteína	3 horas	Overnight, em geladeira	1: 800	1:5000	1000 KDa
Lactoferrina	80 µg de proteína	2 horas	2 horas	1: 1000	1:5000	78 KDa

4.10 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com modelo linear generalizado misto apropriado para experimentos com dois fatores (gênero e ano) e interação. Quando houve efeito significativo do ano ou da interação entre gênero e ano, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer para as comparações múltiplas de médias. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, por diagramas para estudo da distribuição e pelos coeficientes de assimetria e curtose e quando foram identificados problemas, medidas mitigadoras, tais como, a modificação do modelo para adequação da distribuição dos dados e a exclusão de dados discrepantes foram avaliadas para que se obtivessem estatísticas exatas ou, no mínimo, aproximações satisfatórias. Todos os cálculos estatísticos foram efetuados por meio do sistema SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary:NC:USA; 2010). Para a análise de correlação foi utilizada ANOVA bifatorial, seguido do teste de Fisher LSD. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os dados obtidos no questionário de Avaliação dos Fatores de Estresse mostraram que homens do 3º ano apresentaram maior estresse do que aqueles do 1º ano ($p < 0,05$; Figura 1A), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os homens nos demais anos. Entre as mulheres, aquelas do 1º ano se mostraram menos estressadas que as demais ($p < 0,05$; Figura 1A), sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 2º, 3º e 4º anos. A comparação entre os gêneros, considerando um mesmo ano, mostrou que apenas as mulheres do 2º ano apresentaram maior estresse que os homens ($p < 0,05$; Figura 1A), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os gêneros nos demais anos.

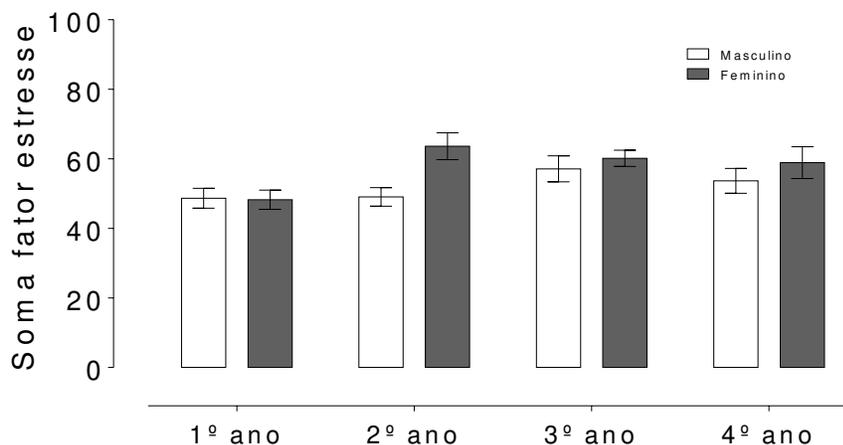


Figura 1. Valores da soma da escala de estresse em função do ano de graduação e do gênero dos alunos. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão.

Os resultados referentes aos compostos sulfurados voláteis mostraram que houve efeito significativo do gênero, sendo que as alunas apresentaram maior concentração bucal de CSV em relação aos alunos, independentemente do ano cursado ($p < 0,05$; Figura 2A). Também houve efeito significativo do ano do curso de graduação ($p < 0,05$; Figura 2A), sendo que alunos e alunas do primeiro ano da graduação apresentaram menores concentrações bucal de CSV em relação a alunos e alunas cursando o segundo, terceiro e

quarto anos, sem diferença significativa entre os demais anos. Para os resultados referentes ao H₂S, mensurado pelo Oral Chroma™, houve efeito significativo do ano cursado ($p < 0,05$; Figura 2B), tendo sido observado que, independentemente do gênero, alunos e alunas cursando o segundo e terceiro anos do curso apresentaram maiores concentrações bucais de H₂S em comparação com alunos do primeiro ano do curso ($p < 0,05$; Figura 2B). E alunos do terceiro ano do curso apresentaram maiores valores de H₂S em relação a alunos cursando o quarto ano ($p < 0,05$; Figura 2B). Não houve efeito do fator gênero para o H₂S ($p > 0,05$; Figura 2B).

Não houve efeito significativo do ano do curso de graduação na concentração bucal de CH₃SH ($p > 0,05$; Figura 2C). Houve efeito significativo do gênero nesta variável, sendo que mulheres apresentaram média de CH₃SH maior que homens ($p < 0,05$; Figura 2C), independente do ano cursado.

Em relação ao gás (CH₃)₂S não foi observado efeito significativo dos fatores ano do curso de graduação ($p > 0,05$; Figura 2D), gênero ($p > 0,05$; Figura 2D) ou de interação entre estes fatores.

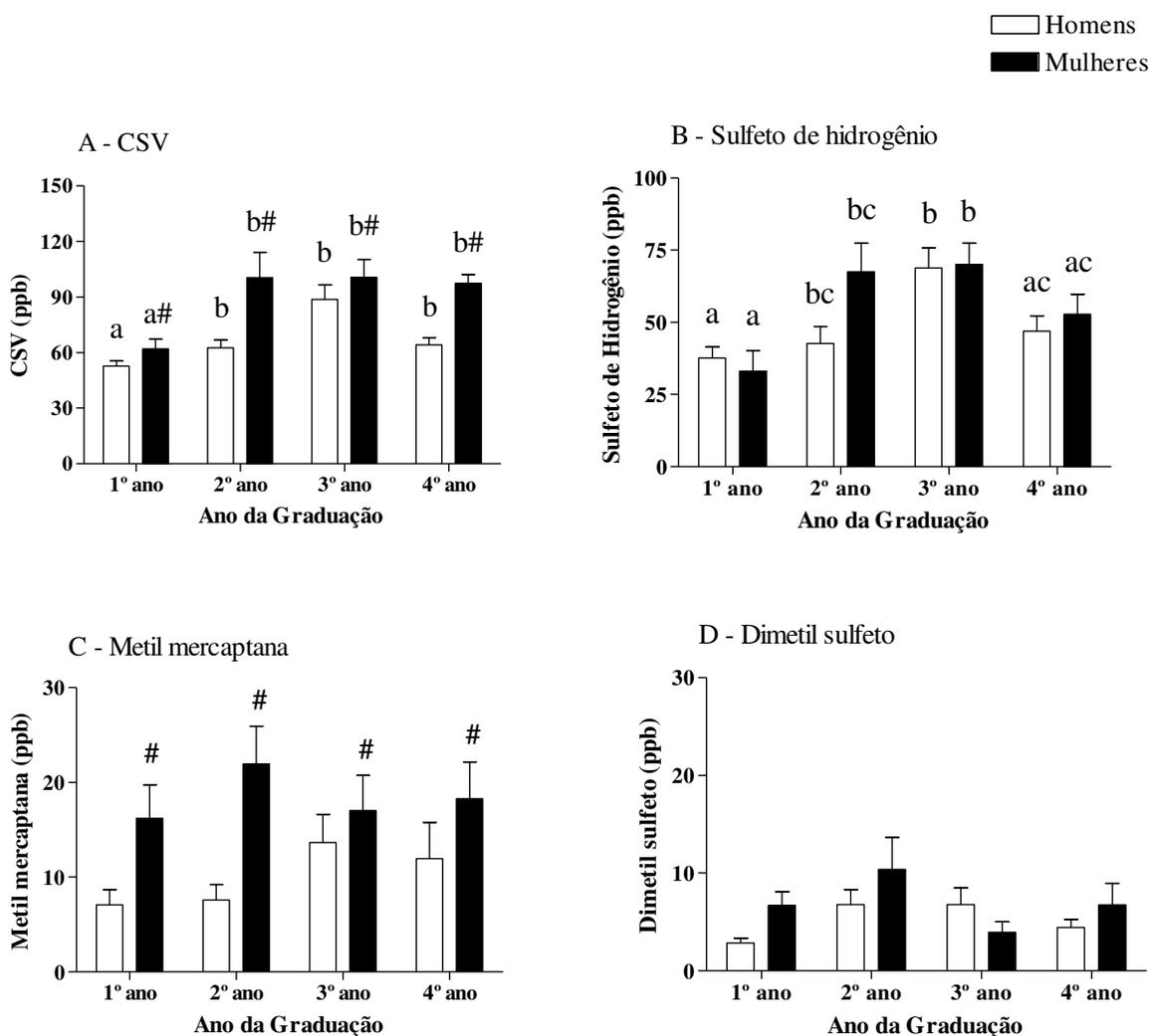


Figura 2. Concentração bucal de compostos sulfurados voláteis (A), sulfeto de hidrogênio (B), metil mercaptana (C) e dimetil sulfeto (D) de alunos dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP)/UNICAMP. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre os anos do curso de graduação, dentro dos grupos de homens e de mulheres. # indica diferença entre homens e mulheres, em cada ano.

Os resultados referentes ao fluxo salivar e à concentração salivar de proteínas totais mostraram efeito significativo somente do fator gênero, sendo que homens apresentaram maior fluxo salivar ($p < 0,05$; Figura 3A) e menores concentrações salivares de

proteína total ($p < 0,05$; Figura 3B), em comparação às mulheres, independente do ano do curso.

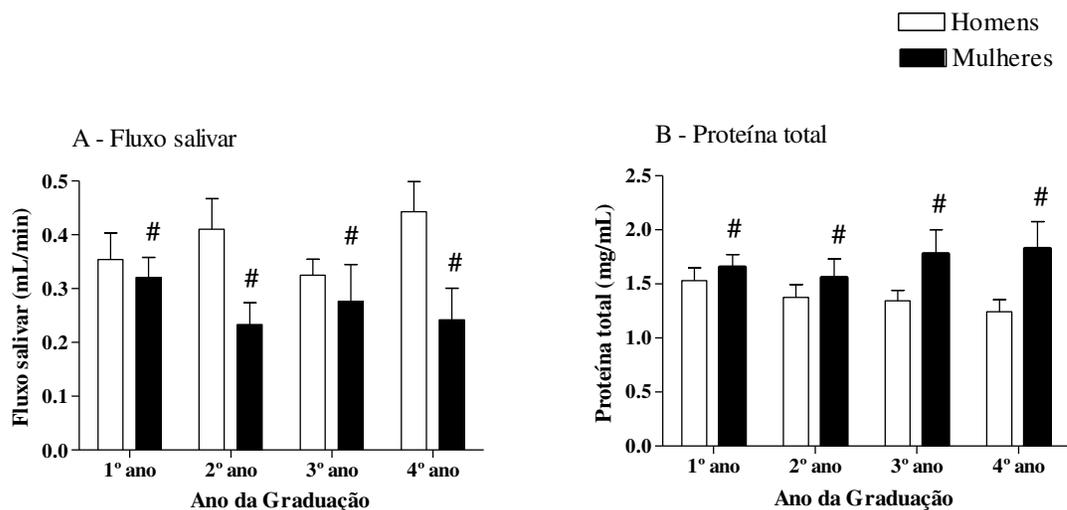


Figura 3. Fluxo salivar (A) e concentração bucal de proteínas totais (B) de alunos dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. # indica diferença entre homens e mulheres, em cada ano.

Não houve diferença significativa na concentração salivar de cortisol de alunos ou alunas entre os quatro anos do curso de graduação ($p > 0,05$; Figura 4A). Também não foi observada diferença entre os gêneros para esta variável ($p > 0,05$; Figura 4A).

Com relação à atividade salivar de alfa-amilase, houve efeito significativo do fator ano do curso de graduação ($p < 0,05$; Figura 4B). Alunos e alunas do terceiro e quarto anos do curso de graduação apresentaram maior atividade salivar de alfa-amilase, em comparação com os alunos do primeiro ano ($p < 0,05$; Figura 4B). Não houve diferença significativa do fator gênero para esta variável ($p > 0,05$; Figura 4B).

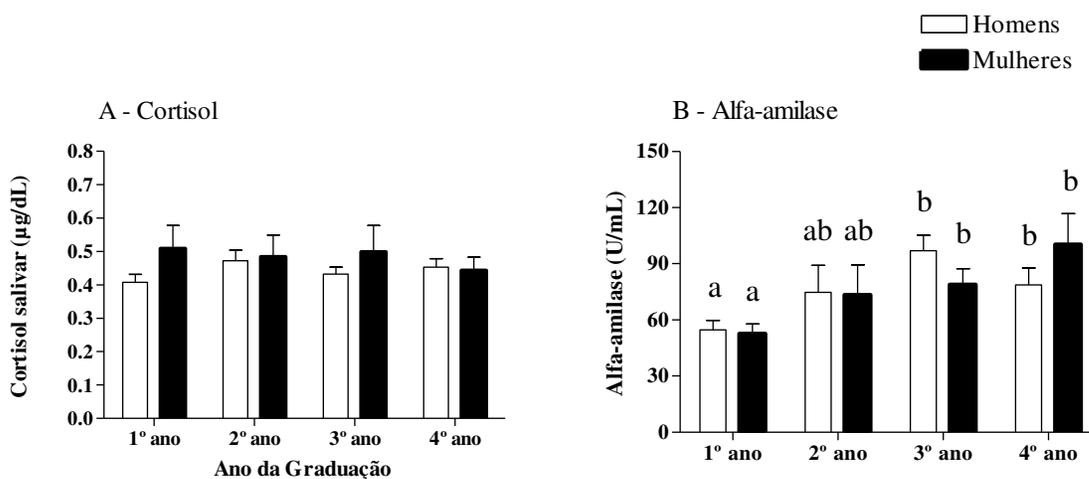


Figura 4. Concentração salivar de cortisol (A) e atividade de alfa-amilase (B) de alunos dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre os anos do curso de graduação, dentro dos grupos de homens e de mulheres.

Houve efeito significativo somente do fator gênero para a concentração de IgA salivar. Mulheres apresentaram maiores valores em relação aos homens ($p < 0,05$; Figura 5A), independentemente do ano do curso. Não foi observado efeito do fator ano do curso para a IgAs ($p > 0,05$; Figura 5A).

Em relação à concentração salivar de β -defesina-2, foi evidenciada interação significativa entre os fatores ano do curso e gênero. Alunos cursando o terceiro ano do curso apresentaram menores concentrações salivares de β -defesina-2 em relação a alunos cursando o primeiro ano do curso ($p < 0,05$; Figura 5B), sem diferença entre os anos do curso nas concentrações salivares de β -defesina-2 das alunas ($p > 0,05$; Figura 5B). Não houve influência do fator gênero para esta variável ($p > 0,05$; Figura 5B).

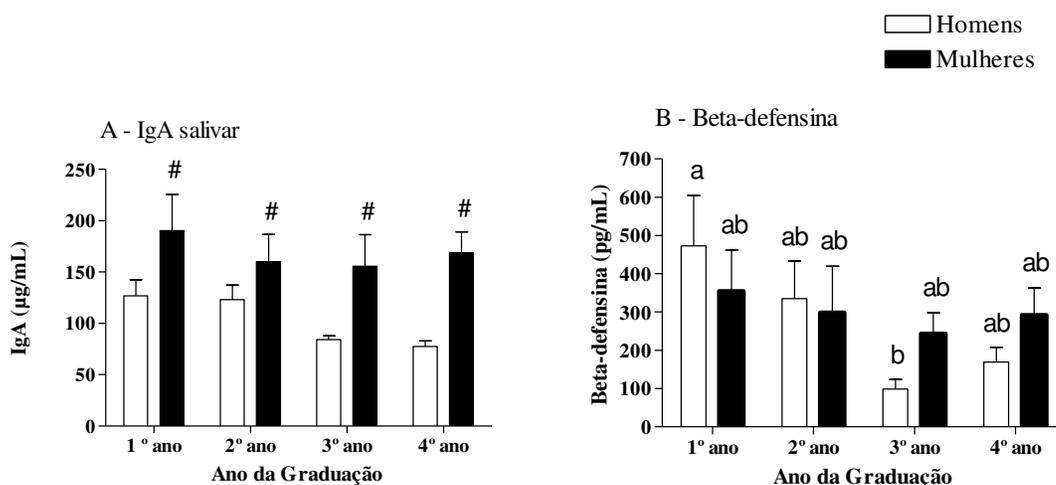


Figura 5. Concentração salivar de IgA secretória (A) e β -defensina (B) de alunos dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre os anos do curso de graduação, dentro dos grupos de homens e de mulheres. # indica diferença entre homens e mulheres, em cada ano.

Os resultados referentes à expressão de mucina 5B, avaliada por Western Blot (unidades densitométricas), apresentaram efeito significativo dos fatores gênero ($p < 0,05$; Figura 6A) e ano do curso ($p < 0,05$; Figura 6A). Independentemente do ano cursado, os alunos apresentaram maior expressão de mucina 5B em relação às alunas ($p < 0,05$; Figura 6A). Alunos e alunas cursando o terceiro ano do curso apresentaram maiores valores de mucina 5B em relação aos demais anos do curso ($p < 0,05$; Figura 6A).

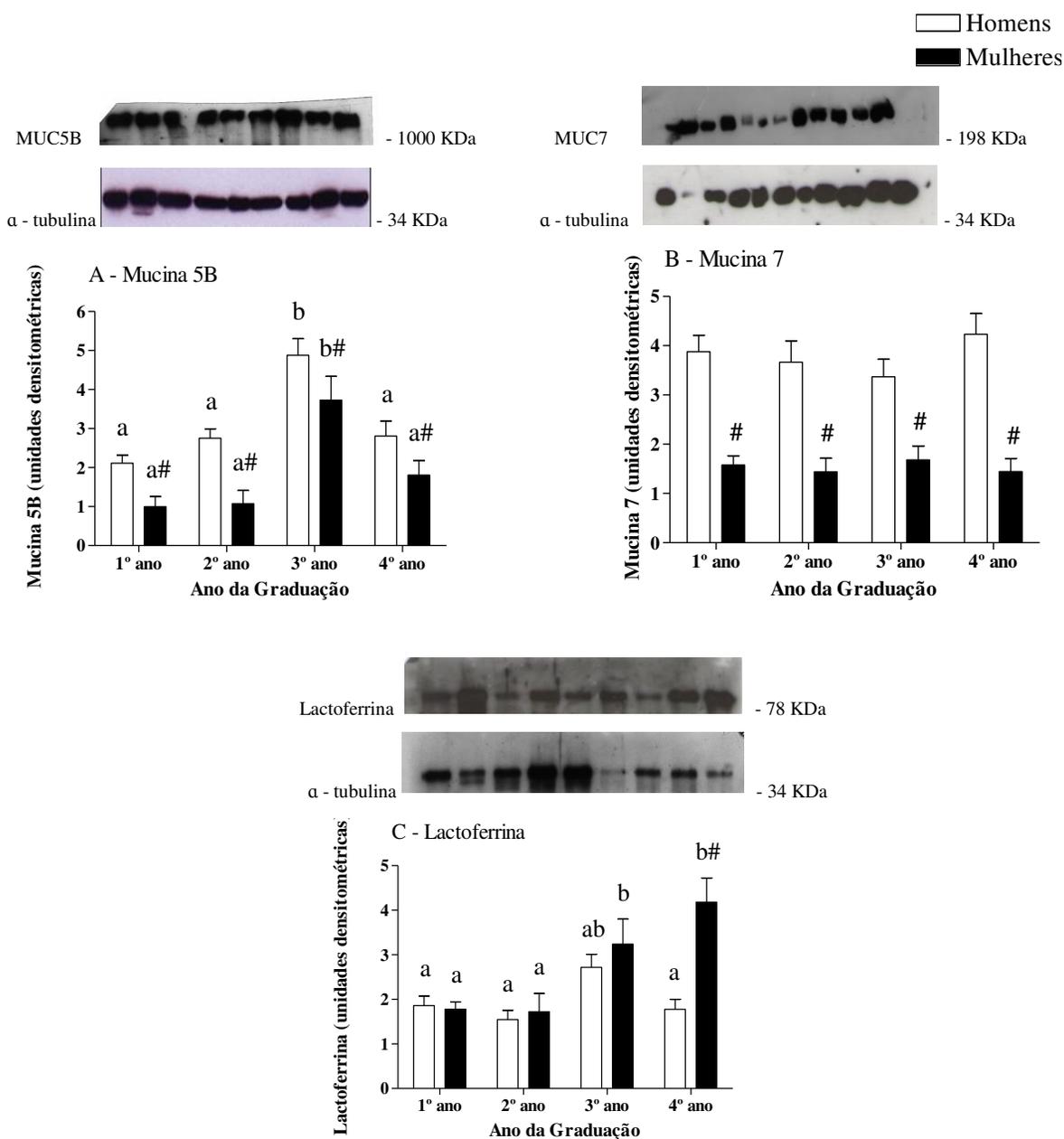


Figura 6. Expressão salivar de mucina 5B (A), mucina 7 (B) e de lactoferrina (C) de alunos dos quatro anos da graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP)/UNICAMP. N (homens) = 24 voluntários do primeiro, 19 voluntários do segundo, 18 voluntários do terceiro e 18 voluntários do quarto ano da graduação. N (mulheres) = 18 voluntárias do primeiro, 14 voluntárias do segundo, 13 voluntárias do terceiro e 11 voluntárias do quarto ano da graduação. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças entre os anos do curso de graduação, dentro dos grupos de homens e de mulheres. # indica diferença entre homens e mulheres, em cada ano.

Os alunos apresentaram maior expressão de mucina 7 em relação às alunas ($p < 0,05$; Figura 6B), sem diferença significativa entre os anos do curso ($p > 0,05$; Figura 6B).

Houve interação significativa entre os fatores gênero e ano do curso de graduação na expressão da proteína lactoferrina. Mulheres apresentaram maiores valores que os homens apenas no quarto ano do curso ($p < 0,05$; Figura 6C), sem diferença nos demais anos. Alunas cursando o primeiro e segundo anos do curso apresentaram menor expressão dessa proteína em comparação às alunas cursando o terceiro e quarto anos do curso em Odontologia ($p < 0,05$; Figura 6C). Não foram observadas diferenças na expressão dessa proteína entre os quatro anos do curso para os alunos ($p > 0,05$; Figura 6C).

A correlação de Spearman mostrou que houve correlação entre os fatores estresse, avaliado pelo questionário, e CSV (30%) e também entre estresse e alfa-amilase (35%) somente no gênero feminino. Os resultados também mostraram que houve uma associação direta entre os fatores CSV e sulfeto de hidrogênio em 82% para as mulheres e em 76% para os homens. Em homens, ainda foi observada correlação direta entre estresse e expressão da MUC5B (29%). As correlações são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Correlação de Spearman dos parâmetros avaliados em relação ao estresse e aos CSV.

	Estresse		CSV (ppb)	
	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
CSV (ppb)	0.307 p = 0.0226	0.089 p = 0.438	-	-
Sulfeto de Hidrogênio (ppb)	0.39 p = 0.0032	0.143 p = 0.2122	0.819 p < 0.0001	0.764 p < 0.0001
Metilmercaptana (ppb)	0.058 p = 0.6717	0.181 p = 0.1125	0.543 p < 0.0001	0.446 p < 0.0001
Dimetil sulfeto (ppb)	0.059 p = 0.6666	0.049 p = 0.6693	0.297 p = 0.0276	0.195 p = 0.0869
Fluxo salivar (mL/min)	-0.138 p = 0.3145	-0.058 p = 0.6165	-0.076 p = 0.5795	0.054 p = 0.6397
Proteína total (mg/mL)	0.235 p = 0.0837	0.003 p = 0.9796	-0.061 p = 0.6591	-0.108 p = 0.3447
Cortisol salivar (mg.dL-1)	-0.116 p = 0.4007	-0.097 p = 0.396	0.188 p = 0.1686	-0.074 p = 0.5201
Alfa-amilase (U.mL-1)	0.349 p = 0.009	-0.005 p = 0.9655	0.108 p = 0.4316	0.168 p = 0.1424
IgA (mg.mL-1)	-0.026 p = 0.8523	-0.282 p = 0.0124	0.042 p = 0.7588	-0.119 p = 0.3009
Beta-defensina (pg.mL-1)	-0.219 p = 0.1089	-0.088 p = 0.4448	-0.193 p = 0.1576	-0.056 p = 0.6264
Mucina 5B (mg.mL-1)	0.094 p=0.4929	0.289 p = 0.0102	0.153 p = 0.2658	0.101 p = 0.3774
Mucina 7 (mg.mL-1)	0.063 p= 0.6465	-0.021 p=0.8521	0.029 p = 0.8343	-0.222 p = 0.0504
Lactoferrina (mg.mL-1)	-0.036 p = 0.7924	-0.035 p=0.7602	0.109 p = 0.4295	0.083 p = 0.4716

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o nível de estresse e a concentração bucal de CSV variaram entre os quatro anos do curso de graduação em Odontologia, sendo que a elevação da concentração bucal de CSV, H₂S e da concentração salivar de alfa-amilase no terceiro ano foram acompanhados de aumento na expressão de mucina 5B, sem redução do fluxo salivar. Em homens estes efeitos foram acompanhados de redução na concentração salivar de beta-defensina-2 e, em mulheres, de aumento na expressão de lactoferrina.

É conhecido que o ambiente físico e social em que os indivíduos vivem e trabalham apresenta um grande impacto sobre o estado psicológico dos mesmos (McEwen, 2009). Diante disso, o estresse psicológico tem sido alvo de diversos estudos nas última décadas. Este ocorre, frequentemente, quando há percepção de se ter muitas responsabilidades e poucas possibilidades de decisões e controle (Lipp, 2001).

As escolas médicas e odontológicas têm sido reconhecidas como fontes de estresse durante a formação de seus estudantes, o que pode afetar o bem-estar físico e mental nessa população. O estresse e o desconforto psicológico acentuado são considerados motivos frequentes de comportamentos prejudiciais à saúde física e psicológica (tabagismo, má alimentação, abuso de álcool e substâncias psicoativas nesses estudantes (Newbury-Birch & Lowry, 2002).

No presente estudo foi possível observar um aumento do estresse em alunos do terceiro ano em comparação a alunos do primeiro do curso e também do segundo, terceiro e quarto anos do curso em relação ao primeiro, no caso das voluntárias. Isso poderia estar relacionado ao fato de que no terceiro ano os alunos apresentam maior número de atividades, cursando disciplinas clínicas além de aulas teóricas, provas, seminários, laboratórios e atividades extras, sendo que essa carga de atividades começa a se intensificar já no segundo ano do curso. Já no quarto ano, os maiores desgastes poderiam estar relacionados às preocupações relativas ao final do curso, como inseguranças em relação ao mercado de trabalho e perspectivas futuras.

Dentre os fatores de estresse, foi citado pelos alunos e alunas dificuldade com o excesso de disciplinas e administração do tempo de estudo. Além disso, alguns fatores de estresse crescentes ao longo do curso, como a dificuldade em se relacionar com os

professores e em conciliar estudo e lazer também foram observados. Entretanto, os alunos relatam satisfação com o curso, o que demonstra o reconhecimento dos mesmos pela formação que estão recebendo e poderia indicar uma possível condução ao desenvolvimento de estratégias de enfrentamento do estresse, apesar das dificuldades apontadas.

Nesse contexto, um estudo realizado na escola de Odontologia de Trinidad investigou a origem de estresse e distúrbios psicológicos de 94 alunos, através de questionários, e observou que o estresse é crescente ao longo dos anos do curso, atingindo os maiores níveis nos anos clínicos, sendo que alunos cursando o primeiro ano da graduação apresentaram os menores níveis de estresse. Entretanto, contrariamente aos nossos, os resultados indicaram que os níveis de estresse foram associados a distúrbios psicológicos somente em estudantes do gênero masculino, independente do ano do curso (Naidu *et al.*, 2002). Assim, os resultados desse trabalho indicam que a relação entre distúrbios psicológicos e altos níveis de estresse também é dependente do gênero.

Lazarus (1966) sugere uma complexa interação entre avaliação cognitiva, recursos psicológicos e respostas, sugerindo que a maneira como os estudantes lidam com a intensa demanda educacional pode ser o determinante primário para distúrbios psicológicos. Desta forma, não é o estressor em si, mas a maneira como o aluno lida com ele, que determina o impacto dos distúrbios causados pelo estresse.

Em relação à influência do estresse sobre a homeostasia bucal, nossos dados confirmam os obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Kurihara & Marcondes, 2002; Queiroz *et al.*, 2002; Calil *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2013) em que observamos aumento dos CSV em voluntários saudáveis submetidos a testes indutores de ansiedade. Dentre esses estudos, Kurihara & Marcondes (2002) observaram aumento nas concentrações de CSV em ratos de laboratório submetidos a estresse por imobilização ou natação. Em humanos, foi demonstrado aumento dos CSV no dia de um exame acadêmico, quando comparado com as concentrações desses compostos na semana anterior e posterior ao exame (Queiroz *et al.*, 2002). Em dois outros estudos foi ainda observado que a aplicação de um estímulo ansiogênico, o Video Recorded Stroop Color Word Test (VRSCWT), também aumentou a concentração bucal de CSV, em homens e mulheres saudáveis (Calil & Marcondes, 2006; Lima *et al.*, 2013). Assim, os resultados do presente estudo reforçam as evidências sobre a

influência de fatores emocionais na produção destes compostos.

Também observamos, em estudo anterior, que em uma situação de ansiedade, eliciada pelo VRCTW, ocorreu um aumento dos CSV totais, mensurados pelo Halímetro[®], bem como de H₂S, mensurado pelo Oral Chroma[™], sem alterações nos valores de metil mercaptana e dimetil sulfeto, em relação à situação basal. Foi ainda observado que o composto mensurado pelo Oral Chroma[™] que apresentou o comportamento mais próximo ao dos CSV, mensurados pelo Halímetro[®], foi o H₂S (Lima *et al.*, 2013). Nesse sentido, Sopapornamorn *et al.* (2006) avaliaram um monitor de sulfetos portátil, comparando-o a análise realizada por cromatografia gasosa, em pacientes portadores e não-portadores de doença periodontal, e observaram que o coeficiente de correlação entre os dois aparelhos foi maior para o H₂S, em comparação aos dois outros gases, em ambos os grupos, reforçando a possibilidade de se encontrar boas correlações entre dois diferentes métodos de avaliação dos CSV. Diante disso, os resultados obtidos estão de acordo com este estudo anterior e sugerem que o H₂S deve ser o principal gás responsável pelo aumento dos CSV frente a situações estressantes em indivíduos saudáveis, sem doenças bucais.

A sensação de boca seca é um dos sintomas associados ao estresse, mediada pelo SNS, que pode também causar alterações nas concentrações e funções de alguns componentes da saliva, tais como alfa-amilase, cromogranina A, cortisol e imunoglobulinas, particularmente a IgAs (Matos-Gomes *et al.*, 2010). Entretanto, o aumento na concentração de CSV observado no presente estudo não pode ser explicado pela redução no fluxo salivar, já que não houve alteração nesse parâmetro entre os alunos cursando os quatro anos do curso.

O efeito inibitório do estresse sobre o fluxo salivar encontra ainda grandes controvérsias na literatura. De acordo com Bosch *et al.* (2003), a ansiedade pode tanto diminuir como aumentar o fluxo salivar, dependendo do tipo de estímulo. Houve redução do fluxo salivar em resposta ao tratamento odontológico (Morse *et al.*, 1983) e a exames acadêmicos (Queiroz *et al.*, 2002). Por outro lado, Bosch *et al.* (2003) observaram aumento do fluxo salivar em resposta a um vídeo exibindo procedimentos cirúrgicos, enquanto outros autores não observaram alteração de fluxo salivar em resposta a situações estressantes (Calil & Marcondes, 2006; Rohleder *et al.*, 2006; Naumova *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013). Porém, poucos estudos têm avaliado a relação entre estresse crônico e secreção de saliva, sendo que

Hugo *et al.* (2008) relataram que o estresse crônico, associado à pacientes que cuidam de parentes com demência, foi associado à redução do fluxo salivar.

Tenovuo & Lagerlöf (1994) relataram que valores de fluxo salivar abaixo de 0,1 mL/min são considerados como quadros de hipossalivação e que, valores entre 0,1 e 0,25 mL/min são considerados como baixos. Porém, as taxas consideradas normais são amplas e incluem indivíduos com salivação baixa, mas que não se queixam de sensação de boca seca. Desta forma, nossos resultados demonstram que o fluxo salivar, embora possa exercer grande influência sobre a produção de CSV, já que sua redução enfraquece os mecanismos de limpeza da cavidade oral, predispondo-a à ação das bactérias gram-negativas (Messadi, 1997), não é o único fator responsável pelo seu aumento e outras proteínas salivares parecem estar envolvidas na sua produção.

Além do fluxo salivar, as proteínas salivares são essenciais para a saúde oral, e têm sido consideradas marcadores da saúde oral e sistêmica, apresentando, inclusive, um importante papel na aquisição e manutenção da microbiota oral (Rudney, 1995; Spielmann & Wong, 2011). Além disso, a secreção dessas proteínas está sob controle do sistema nervoso autônomo, sendo modulada pelo estresse, levando à produção de uma saliva mais viscosa, a qual pode estar relacionada com o odor na cavidade oral frente a situações estressantes (Bosh *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que o estresse não promoveu alteração na concentração das proteínas salivares totais, já que não observamos nenhuma diferença neste parâmetro entre os alunos dos quatro anos do curso, nem em homens e nem em mulheres. Entretanto, foi observada alteração de proteínas salivares específicas de grande importância para a saúde bucal, sendo elas a MUC5B e a lactoferrina. Houve aumento na expressão da MUC5B em alunos e alunas no terceiro ano curso em relação aos demais anos e, em alunas do terceiro e quarto anos do curso, também foi evidenciado aumento na expressão da proteína lactoferrina em relação a alunas do primeiro e segundo anos.

Quando na sua forma livre na saliva, as mucinas aglutinam microrganismos, sendo que sua presença em grandes quantidades favorece a aderência e proliferação de bactérias específicas (Tabak *et al.*, 1982). Um estudo mais recente observou que as mucinas salivares, na presença de bactérias gram-positivas ou de β -galactosidase, são amplamente

degradadas e, posteriormente, utilizadas por bactérias orais gram-negativas para a produção dos CSV, favorecendo o mau odor bucal (Sterer & Rosenberg, 2006). Portanto, o aumento na expressão de mucina 5B poderia favorecer a produção desses compostos causadores do mau odor através do favorecimento da agregação e aderência de microrganismos que metabolizam as moléculas de enxofre.

Veerman *et al.* (1997) observaram uma correlação entre o aumento na expressão da mucina 5B e a aderência à bactéria *H.pylori*, sendo que um carboidrato específico desta proteína poderia ser o responsável por esta ligação. Além disso, outro estudo demonstrou que o microrganismo *S. sanguis* também pode se ligar à mucina 5B (Murray *et al.*, 1992). É possível que a ligação com os microrganismos responsáveis pelo mau hálito a esta proteína também ocorra, favorecendo a produção de CSV. Desta forma, nossos resultados sugerem que o aumento na produção da mucina salivar 5B pode contribuir para a produção de CSV frente ao estresse.

A formação de complexos heterotípicos ocorrem com certa frequência na saliva e um complexo entre MUC5B e IgAs tem sido sugerido por favorecer o mecanismo de limpeza da cavidade oral. Nesse sentido, Soares *et al.* (2003) observaram que as proteínas mucina 5B e lactoferrina formam um complexo heterotípico *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, ainda não está bem estabelecido se essa interação é benéfica ou maléfica para a homeostasia da cavidade oral, sendo que, embora os autores sugiram que este complexo possa melhorar as propriedades desses componentes salivares no ambiente oral, é possível também que favoreça a agregação e proliferação de microrganismos específicos.

Ainda considerando as proteínas salivares e sua relação com a manutenção da saúde oral, estudos têm demonstrado que as beta-defensinas apresentam um importante papel na manutenção da saúde oral (Dommisch *et al.*, 2005; Ouhara *et al.*, 2006). Foi observado que aumento na expressão de β -defensina -2, em tecidos gengivais inflamados, na presença de patógenos periodontais, pode estar relacionado ao desenvolvimento de doença periodontal e outras doenças inflamatórias orais (Dommisch *et al.*, 2005).

Estudos clínicos têm sugerido que haja relação entre doença periodontal e estresse (Breivik *et al.*, 1996; Genco, 1996). Considerando-se que a maioria das bactérias responsáveis pela doença periodontal são as mesmas que causam o mau hálito, uma redução

desse peptídeo antimicrobiano poderia explicar essa associação. Varoga *et al.*, (2008) observaram redução na expressão desse peptídeo após a administração de corticóides exógenos. Aberg *et al.* (2007) demonstraram que o estresse psicológico induzido em camundongos, por exposição à luz e barulho, inibiu a produção epidérmica de beta-defensina, aumentando a severidade de infecções nesses animais. Nossos resultados mostraram que houve redução na expressão de beta-defensina -2 em alunos, mas não em alunas, cursando o terceiro ano do curso em relação a alunos cursando o primeiro ano da graduação. Isso poderia estar relacionado às flutuações hormonais características do ciclo menstrual, mas não há estudos relacionando ciclo menstrual à produção de beta-defensinas na literatura e, portanto, mais estudos na área são necessários.

Desta forma, considerando-se que a relação entre as proteínas salivares, o estresse e a produção de CSV ainda não está bem esclarecida e que há escassos relatos na literatura sobre a relação entre estresse e beta-defensinas, os resultados referentes a este peptídeo, aqui obtidos, podem auxiliar a compreender e elucidar os mecanismos relacionados à associação entre estresse e produção de CSV.

Com relação ao estresse, o sistema límbico, ao ser estimulado, além de estimular o Sistema Nervoso Simpático (SNS), ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), estimulando a secreção de glicocorticóides (Guyton & Hall, 1997). O núcleo paraventricular do hipotálamo, por meio da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) estimula a glândula adenohipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que entra na circulação geral e estimula o córtex da adrenal a secretar glicocorticóides (Guyton & Hall, 1997).

Neste estudo, observamos que não houve alteração significativa nos valores de cortisol entre os quatro anos da graduação. Tem sido relatado que as concentrações na saliva e no sangue não são completamente lineares. Observou-se que a proporção de cortisol salivar em comparação ao cortisol total sanguíneo é de aproximadamente 1 a 2% em suas menores concentrações, alcançando taxas de 8 a 9% em suas maiores concentrações (Hellhammer *et al.*, 2009). Esses autores ainda relatam que para se detectar um aumento nas concentrações de cortisol salivar de apenas 5 nmol/L é necessário que as concentrações de cortisol total plasmáticas aumentem de 200 a 400 nmol/L.

Além disso, Levine *et al.* (2007) relataram que aproximadamente 30% do cortisol é enzimaticamente convertido em cortisona na saliva, o que resulta em menores níveis de cortisol livre na saliva em comparação ao plasma. Desta forma, embora muitos estudos relatem boas correlações entre as concentrações de cortisol no sangue e na saliva, a ausência de alteração do cortisol salivar no presente estudo pode ser explicada pelo fato de o estresse relacionado a atividades acadêmicas não ter sido sensível o suficiente para eliciar uma alteração nas concentrações de cortisol salivares. Porém, não é possível afirmar que não tenha ocorrido alteração na concentração sanguínea de cortisol.

Entretanto, embora os valores de cortisol não tenham sofrido alteração frente ao estresse, foi observado um aumento na atividade salivar de alfa-amilase, em alunos e alunas cursando o terceiro e quarto anos da graduação quando comparados a alunos e alunas do primeiro ano do curso, resultado este que, em conjunto com a avaliação psicológica, por meio de questionários, indicam um aumento dos níveis de estresse em alunos inseridos em atividades clínicas e pré-clínicas, em comparação aos alunos cursando o primeiro ano do curso.

Já foram relatados aumentos significativos na atividade salivar de alfa-amilase em resposta a outras situações ansiogênicas, tais como exame acadêmico (Bosch *et al.*, 1996), apresentação de vídeos com cenas desagradáveis (Bosch *et al.*, 2003) e estressores laboratoriais (Granger *et al.*, 2006). Porém, Wolf *et al.* (2008) observaram que o estresse crônico por asma, em crianças, diminuiu as concentrações de alfa-amilase e Bosh *et al.* (2003) não encontraram alterações na atividade de alfa-amilase salivar após um teste de memória. Assim, as diferenças de respostas podem estar relacionadas às características do estímulo estressor e do sujeito.

Ehlert *et al.* (2006) relataram que não há correlação entre adrenalina, noradrenalina e alfa-amilase, indicando que o aumento da alfa-amilase frente a uma situação estressante reflete a liberação de noradrenalina central e não a secreção periférica de noradrenalina. Nater *et al.* (2007) relatam que a alfa-amilase como um marcador do SNS independe de outros fatores, enquanto que os níveis de adrenalina, noradrenalina e os valores de pressão arterial e frequência cardíaca podem ser influenciados por muitos fatores, como por exemplo, postura e punção venosa. Além disso, Veen *et al.* (2008) compararam pacientes

com desordem de ansiedade social e pacientes sem tal desordem, e concluíram que pacientes que sofriam com tal desordem apresentaram maiores níveis de alfa-amilase, mas não de cortisol em comparação ao grupo controle.

Alterações na atividade da alfa-amilase salivar têm sido relatadas em numerosos estudos, conforme mencionado acima. Entretanto, poucos estudos têm avaliado a relação entre estresse crônico e atividade da alfa-amilase. Nesse sentido, Nater *et al.* (2007) encontraram que há um impacto do estresse crônico na reatividade da variação diurna da alfa-amilase, sendo que os voluntários que apresentaram maior nível de estresse crônico, mostraram maiores atividades momentâneas da alfa-amilase salivar. Além disso, nesse estudo, assim como no nosso, não foi observada relação entre a concentração salivar de cortisol e a atividade de alfa-amilase, ou seja, sua produção é independente do ritmo diurno do cortisol livre (Nater *et al.*, 2007).

Outro estudo condizente com o nosso foi o conduzido por Stegeren *et al.* (2008), o qual avaliou a influência de dois estressores distintos, psicológico (apresentação de figuras aversivas) e físico (imersão do braço em tanques contendo água e cubos de gelo), sobre as produções de cortisol e alfa-amilase salivares. Os resultados deste estudo mostraram que a alfa-amilase salivar apresentou aumento em sua atividade frente aos dois tipos de estressores, enquanto que o cortisol aumentou somente frente a uma situação de estresse físico. Portanto, os eixos HPA e SNS respondem diferentemente de acordo com o tipo de estressor.

Nesse sentido, Herman & Cullinan (1997) relataram que o controle central da secreção de glicocorticoides é regulado principalmente por uma seleta população de neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH). Estressores envolvendo uma intensa ameaça física são transmitidos diretamente para o NPH via projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico. Contrariamente, estressores psicológicos, os quais requerem interpretação por estruturas encefálicas superiores parecem ser mediados via sistema límbico (Herman & Cullinan, 1997).

Diante disso, o fato de termos observado, nesse estudo, um aumento da alfa-amilase, sem aumento do cortisol, provavelmente ocorre pela ativação de mecanismos distintos e de diferentes sensibilidades dos sistemas envolvidos na resposta ao estresse ao

mesmo estímulo estressor e, desta forma, ressaltamos a importância em se utilizar diferentes métodos de avaliação em pesquisas envolvendo estresse.

É preciso ressaltar que, no presente estudo, participaram apenas voluntários matriculados regularmente no curso, ou seja, que não apresentavam dependências, repetindo pela segunda vez alguma disciplina e o ano já cursado. Isso pode explicar o fato de alguns mecanismos relacionados ao estresse não terem sido ativados, pois sugere que os alunos estão sabendo, de certa forma, enfrentar a situação e que o organismo está mantendo sua homeostasia, já que estão avançando no curso.

Apesar do exposto acima, a aplicação de intervenções voltadas para a condução do estresse na educação tem sido pouco explorada. Por isso, sua detecção precoce juntamente com a identificação dos fatores de estresse próprios de situações de ensino, pode ser útil no sentido de prevenir a instalação e o agravamento do problema em futuros profissionais e possibilitar medidas preventivas por parte de educadores e também terapêuticas em instituições de ensino superior.

Outro resultado relacionado ao fator gênero, observado em nossos trabalho, mostrou que mulheres apresentaram maiores valores de CSV totais e também de metil mercaptana em relação aos homens. O aumento de CSV na fase menstrual do ciclo também foi observado por Queiroz *et al.* (2002), Calil *et al.* (2008) e Lima *et al.* (2013) e, provavelmente, estão relacionados a um aumento da descamação epitelial da mucosa oral (Tonzetich *et al.*, 1978) e/ou a um aumento no número de bactérias na cavidade oral durante esse período do ciclo reprodutivo (Prouts & Hopps, 1970). Além disso, os tecidos gengivais e periodontais possuem receptores para os hormônios sexuais femininos, estrógeno e progesterona, conduzindo a um aumento da permeabilidade vascular (Mariotti, 1994).

O aumento dos CSV, neste caso, parece ter participação do fluxo salivar. Observamos, no presente estudo, que homens apresentaram maiores valores desta variável, quando comparados às mulheres, assim como observado em outros estudos (Inoue *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009). A explicação para essa diferença observada entre os gêneros é devido ao fato de mulheres apresentarem menores dimensões das glândulas parótida e submandibular, em relação aos homens (Scott, 1975), sendo este parâmetro correlacionado ao peso corporal e índice de massa corpórea (Inoue *et al.*, 2006). Desta forma, considerando-

se que o fluxo salivar auxilia os mecanismos de limpeza da cavidade oral, um maior fluxo salivar produzido no gênero masculino, poderia auxiliar na eliminação de microrganismos responsáveis pelo mau hálito, conduzindo a uma menor produção de CSV nesse sexo.

Além disso, é importante levar em consideração a importância das diferenças sexuais sobre as proteínas salivares. Os resultados de nosso estudo mostraram que mulheres apresentaram maiores valores de IgAs e de proteína total em comparação aos homens. Gómez *et al.* (1993) compararam mulheres nas fases folicular e lútea do ciclo menstrual e observaram que a concentração da proteína IgAs foi ligeiramente maior na fase folicular quando comparada à fase lútea. Estes autores também observaram que, independentemente da fase do ciclo menstrual, mulheres apresentaram maiores concentrações dessa proteína em comparação aos homens. Essas diferenças estão relacionadas à influência dos hormônios sexuais e estudos têm relatado correlação entre o hormônio estrogênio e a concentração de IgA salivar, sendo que essa associação parece variar ao longo do ciclo menstrual (Gómez *et al.*, 1993; Anders, 2010).

Entretanto, apesar de menores concentrações de IgAs e proteína total terem sido apresentadas pelos voluntários do gênero masculino, maiores expressões das mucinas 5B e 7 foram observadas nesse sexo, em comparação às mulheres. Embora a estrutura e função das mucinas salivares humanas tenham sido bem estudadas na literatura, pouco é conhecido sobre sua quantificação na saliva total e os fatores que influenciam a sua secreção. Rayment *et al.* (2000) observaram diferenças causadas pelo gênero nos níveis de MUC5B, mas não de MUC7. Nesse sentido, os hormônios sexuais parecem apresentar um importante papel na modulação dos mecanismos estruturais das mucinas. Um bom entendimento sobre a função dos hormônios sexuais sobre a produção destas pode ser observado através das mudanças na viscosidade e secreção do muco ao longo do período menstrual. A máxima produção de muco ocorre nos dias que antecedem a ovulação, devido aos altos níveis de estrogênio. Durante o período menstrual, ocorre a descamação do endométrio, e conseqüente eliminação do muco. Portanto, durante e após essa fase do ciclo menstrual, o muco cervical é muito pouco ou ausente (Chantler & Debruyne, 1976; Silverthorn, 2002). Diante disso, pode-se concluir que influências similares parecem apresentar importante papel na cavidade oral, levando as mulheres a produzirem menores quantidades de mucinas durante essa fase do ciclo. Portanto,

embora a MUC5B salivar apresente um importante papel no aumento dos CSV frente ao estresse, ela parece não possuir relação com o aumento dos CSV em mulheres, durante a fase menstrual do ciclo reprodutivo, sendo que outros mecanismos devem estar envolvidos.

Assim, os resultados sugerem que as alterações hormonais decorrentes do ciclo menstrual feminino causam um desequilíbrio nas concentrações de proteínas salivares específicas na cavidade oral, limitando as mesmas a realizarem suas funções originais de manutenção da homeostasia oral. Este desequilíbrio, associado às menores taxas de fluxo salivar, em mulheres, conduzem a um aumento no número de bactérias e descamação epitelial, conduzindo a um aumento da produção de CSV.

O presente estudo evidencia a importância da saliva e de seus constituintes para a manutenção do equilíbrio homeostático da cavidade oral. A saliva, baseada em suas vantagens e facilidades de manuseio e custo, oferece uma excelente origem de biomarcadores que podem ser utilizados como ferramentas úteis para o diagnóstico e monitoramento de doenças. Desta forma, nossos achados ressaltam o fundamental papel das proteínas salivares, capazes de demonstrar a influência dos hormônios sexuais sobre a cavidade oral, especialmente em mulheres, e também a ação destas frente ao estresse, cujas alterações nas concentrações contribuem para a produção de CSV. Portanto, mais estudos deveriam considerar a utilização da saliva e seus constituintes em trabalhos envolvendo a relação entre o equilíbrio da homeostasia oral e a produção de CSV.

7 CONCLUSÃO

- 7.1 O estresse relacionado a atividades acadêmicas promove aumento da concentração bucal de CSV, em indivíduos saudáveis;
- 7.2 Este aumento na produção de CSV não está relacionado à redução do fluxo salivar;
- 7.3 A redução da β -defensina-2 e aumento de lactoferrina e mucina 5B parecem estar relacionadas ao aumento na produção bucal de CSV, em situações estressantes;
- 7.4 As alterações nas concentrações de proteínas salivares sofrem influência do gênero do indivíduo.

REFERÊNCIAS*

Aberg KM, Radek KA, Choi EH, Kim DK, Demerjian M, Hupe M, et al. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest.* 2007; 117: 3339-49.

Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc.* 2003; 36(4): 247-52.

Abiko Y, Saitoh M. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(30): 3065–72.

Ader R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. 3. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001.

Aizawa F, Kishi M, Moriya T, Takahashi M, Inaba D, Yonemitsu M. The analysis of characteristics of elderly people with high VSC levels. *Oral Dis.* 2005; 11(Suppl 1): 180-2.

Almståhl A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(6): 345–52.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Alzahem AM, Molen HT, Alaujan AH, Schmidt HG, Zamakhshary MH. Stress among dental students: a systematic review. *Eur J Dent Educ.* 2011; 15(1): 8-18.

Anders SM. Gonadal steroids and salivary IgA in healthy young women and men. *Am J Hum Biol.* 2010; 22(3): 348-52.

Bánky Z, Nagy GM, Halász B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology.* 1994; 59(1):63-71.

Barbería E, Fernández-Frías C, Suárez-Clúa C, Saavedra D. Analysis of anxiety variables in dental students. *Int Dent J.* 2004; 54(6): 445-9.

Bérzin MGR. Características da formação profissional, prática clínica e perfil biopsicossocial de cirurgiões-dentistas e médicos que atuam na área de dor orofacial [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2007.

Bosch JA, Brand HS, Ligtenberg TJ, Bermond B, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen AV. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosom Med.* 1996; 58(4): 374–82.

Bosch JA, Geus EJ, Veerman EC, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen AV. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom Med.* 2003; 65(2): 245–58.

Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN. Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Horm Behav.* 2012; 62(3): 210-8.

Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104(4): 327-34.

Calil CM, Marcondes FK. Influence of anxiety on the production of oral volatile compounds. *Life Sci.* 2006; 79: 660-64.

Calil CM, Lima PO, Bernardes CF, Groppo FC, Bado F, Marcondes FK. Influence of gender and menstrual cycle on volatile sulphur compounds production. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(12):1107-12.

Calil CM, Marcondes FK. Prevenção em saúde bucal através do diagnóstico precoce e tratamento da halitose. In: Maria Salete Sandini Linden, João Paulo de Carli, Ricardo Cauduro, Adair Luiz Stefanello Busatto. (Org.). *Multidisciplinariedade na Saúde Bucal.* 5a.ed.Porto Alegre: RGO; 2012. v. 1 p. 12-20.

Chantler E, Debruyne E. Factors regulating the changes in cervical mucus in different hormonal states. In: Elstein M, Parke DV, editores. *Mucus in Health and Disease.* New York: Plenum Press; 1976. p. 131-42.

Chard T. *An introduction to radioimmunoassay and related techniques.* 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1990.

Clemente-Napimoga JT, Pellegrini-da-Silva A, Ferreira VH, Napimoga MH, Parada CA, Tambeli CH. Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. *Eur J Pharmacol.* 2009, 617(1-3): 41-7.

Cohen S, Herbert TB. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol.* 1996; 47: 113-42.

David SQK, Gerald CHK. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med.* 2007; 64(3): 202-10.

Domisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jespen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(3): 186–90.

Ehlert U, Erni K, Hebisch G, Nater U. Salivary alpha-amylase levels after yohimbine challenge in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(12): 5130-3.

Fernandes AUR, Garcia AR, Zuim PRJ, Cunha LDAP, Marchiori AV. Desordem temporomandibular e ansiedade em graduandos de odontologia. *Cien Odontol Bras.* 2007; 10(1): 70-7.

Forte LF, Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Campos MV, Cogo K, Costa FO, Franco GC. Psychological stress has no association with salivary levels of β -defensin 2 and β -defensin 3. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(10): 765-9.

Freeman R, Main JRR, Burke FJT. Occupational stress and dentistry: theory and practice: Part 1. Recognition. Br Dent J. 1995; 178(6): 214-7.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol 1996; 67: 1041-9.

Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, Feng Z, Mc Cormick TS, Weinberg A. Quantification of human β -defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. Clin Chem. 2007; 53(4): 757-65.

Gómez E, Ortiz V, Saint-Martin B, Boeck L, Díaz-Sánchez V, Bourges H. Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. Am J Reprod Immunol. 1993; 29(4): 219-23.

Granger DA, Kivlighan KT, Blair C, El-Sheik M, Mize J, Lisonbee, JA *et al.* Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships. J Soc Pers Relat. 2006; 23(2): 267–90.

Güncü GN, Tözüm TF, Caglayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium – review of literature. Aust Dent J. 2005; 50(3): 138-45.

Guyton AC, Hall JE. O sistema nervoso autonômico; a medula supra-renal. In: Tratado de Fisiologia Médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997; 693-703.

Hanada M, Koda H, Onaga K, Tanaka K, Okabayashi T, Itoh T, et al. Portable oral malodor analyzer using highly sensitive In₂O₃ gas sensor combined with a simple gas chromatography system. *Anal Chim Acta*. 2002; 475(1-2): 27-35.

Heath JR, Macfarlane TV, Umar MS. Perceived sources of stress in dental students. *Dent Update*. 1999; 26(3): 94-8.

Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(2): 163-71.

Henning K, Ey S, Shaw D. Perfectionism, the imposter phenomenon and psychological adjustment in medical, dental, nursing and pharmacy students. *Med Educ*. 1998; 32(5): 456-64.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997; 20(2): 78-84.

Horan MA, Barton RN, Lithgow G. Biology of aging and stress. In: FINK G, editor. *Encyclopedia of stress*. San Diego: Academic Press; 2000. p. 111-7.

Huang T, Long M, Huo B. Competitive binding to cuprous ions of protein and BCA in the bicinchoninic acid protein assay. *Open Biomed Eng J*. 2010; 4:271-78.

Hugo FN, Hilgert JB, Corso S, Padilha DMP, Bozzetti MC, Bandeira DR, et al. Association of chronic stress, depression symptoms and cortisol with low saliva flow in a sample of south-Brazilians aged 50 years and older. *Gerodontology*. 2008; 25(1): 18-25.

Hunzeker J, Padgett DA, Sheridan PA, Dhabhar FS, Sheridan JF. Modulation of natural killer cell activity by restraint stress during an influenza A/PR8 infection in mice. *Brain Behav Immun*. 2004; 18(6): 526–35.

Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, et al. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(12): 1055-60.

Jarczak J, Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzałkowska N, Józwick A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, et al. Defensins natural component of human innate immunity. *Hum Immunol*. 2013; 74(9): 1069-79.

Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*. 1999; 20(1): 1-48.

Koreeda N, Iwano Y, Kishida M, Otsuka A, Kawamoto A, Sugano N *et al*. Periodic exacerbation of gingival inflammation during the menstrual cycle. *J Oral Sci*. 2005; 47(3): 159-64.

Kosaka M, Sumita YI, Otomaru T, Taniguchi H. Differences of salivary cortisol levels between long-term and short-term wearers of dento-maxillary prosthesis due to head and neck cancer resection. *J Prosthodont Res*. 2014; 58(1): 41-7.

Kurihara E, Marcondes FK. Oral concentration of volatile sulphur compounds in stressed rats. *Stress*. 2002; 5(4): 295-8.

Lazarus RS. *Psychological stress and the coping process*. New York: McGraw-Hill, 1966.

Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav*. 2007; 90(1): 43-53.

Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol*. 1996; 56(5): 263–277.

Lima PO, Calil CM, Marcondes FK. Relação entre estresse e compostos sulfurados voláteis: participação do sulfeto de hidrogênio. *Perionews (Sao Paulo)*. 2012; 6:171-9.

Lima PO, Calil CM, Marcondes FK. Influence of gender and stress on the volatile sulfur compounds and stress biomarkers production. *Oral Dis*. 2013; 19(4): 366-73.

Lindhe J, Attsfröm R. Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontal Res*. 1967; 2(3): 194-8.

Lipp MEN. Stress: conceitos básicos. In: LIPP. *Pesquisas sobre estresse no Brasil: saúde, ocupações e grupos de risco*. Campinas: Papyrus, 2001.

Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol. Scand*. 1963; 21: 533.

Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987; 66: 623–27.

Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5(1): 27-53.

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, et al. Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.* 1999; 67(6): 2740-5.

Matos-Gomes N, Katsurayama M, Makimoto FH, Santana LL, Paredes-Garcia E, Becker MA, et al. Psychological stress and its influence on salivary flow rate, total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. *Neuroimmunomodulation.* 2010; 17(6): 396-404.

Mc Ewen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886(1-2): 172-89.

Mc Ewen BS. The brain in the central organ of stress and adaptation. *Neuroimage.* 2009; 47(3): 911-3.

Messadi DV. Oral and nonoral sources of halitosis. *J Calif Dent Assoc.* 1997; 25(2): 127-31.

Messadi DV, Younai FS. Halitosis. *Dermatol Clin.* 2003; 21: 147-55.

Miyazaki H, Sakao S, Katoh Y, Takehara T. Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population. *J Periodontol.* 1995; 66(8): 679-84.

Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, et al. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res.* 1998; 18(6B): 4645-9.

Morse DR, Schacterle GR, Esposito JV, Chod SD, Furst ML, DiPonziano J et al. Stress, meditation and saliva: a study of separate salivary gland secretions in endodontic patients. *J Oral Med.* 1983; 38(4): 150-60.

Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ. Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun.* 1992; 60(1): 31-8.

Naidu RS, Adams JS, Simeon D, Persad D. Sources of stress and psychological disturbance among dental students in the West Indies. *J Dent Educ.* 2002; 66(9): 1021-30.

Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology.* 2007; 32(4): 392-401.

Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. 2009; 34: 486-96.

Naumova EA, Sandulescu T, Al Khatib P, Thie M, Lee WK, Zimmer S, et al. Acute short-term mental stress does not influence salivary flow rate dynamics. PLoS One. 2012; 7(12): e51323.

Newbury-Birch D, Lowry RJ, 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. 2002; 192(11): 646-9.

O'Neil DA, Porter EM, Elawaut E, Andersnon GM, Eckmann L, Ganz T, et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J Immunol. 1999; 163(12): 6718–24.

Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, et al.. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. Infect Immun. 2006; 74(9): 5211–20.

Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA, et al. Influence of periodontal status and periodontopathogens on levels of oral human β -defensin-2 in saliva. J Periodontol. 2013; 84(10):1445-53.

Peretz B, Mann J. Dental anxiety among Israeli dental students: a 4-year longitudinal study. Eur J Dent Educ. 2000; 4(3): 133-7.

Prout RE, Hopps RM. A relationship between human oral bacteria and the menstrual cycle. *J Periodontol.* 1970; 41(2): 98-101.

Queiroz CS, Hayacibara MF, Tabchoury, COM, Marcondes FK, Cury JA. Relationship between stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 337-40.

Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS.* 2003; 17(16): F39–48.

Rayment SA, Liu B, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF. Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. *J Dent Res.* 2000; 79(10): 1765-72.

Rohleder N, Wolf JM, Maldonato EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology.* 2006; 43(6): 645–52.

Rosenberg M., Kulkarni, GV, Bosy A, Mc Culloch CA. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *J Dent Res.* 1991;.70(11) 1436-40.

Rosenberg M, Mc Culloch CA. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J Periodontol.* 1992; 63(9): 776-82.

Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995; 6(4): 343-67.

Sanders AE, Lushington K. Effect of perceived stress on student performance in dental school. *J Dent Educ*. 2002; 66(1): 75-81.

Scott J. Age, sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol*. 1975; 20(12): 885-7.

Seemann R, Conceicao MD, Filippi A, Greenman J, Lenton P, Nachnani S, et al. Halitosis management by the general dental practitioner-results an international consensus workshop. *J Breath Res*. 2014; 8(1): 017101.

Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*. 2001; 26(2):165-73.

Silverthorn DU. Reprodução Feminina. In: *Fisiologia Humana - uma abordagem integrada*. 2. ed. São Paulo. Editora Manole; 2002. p. 746-53.

Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*. 2005; 27(18): 1337-47.

Soares RV, Siqueira CC, Bruno LS, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. *J Dent Res.* 2003; 82(6): 471-475.

Sopapornamorn, P, Ueno M, Shinada K, Vachirarojpisan T, Kawagushi Y. Clinical application of a VSCs monitor for oral malodour assessment. *Oral Health Prev Dent.* 2006; 4(2): 91-7.

Spielmann T, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011; 17(4): 345-52.

Springfield J, Suarez FL, Majerus GJ, Lenton PA, Furne JK, Levitt MD. Spontaneous fluctuations in the concentrations of oral sulfur-containing gases. *J Dental Res.* 2001; 80(5): 1441-4.

Stegeren AH, Wolf OT, Kindt M. Salivary alpha-amylase and cortisol responses to different stress tasks: impact of sex. *Int J Pshychophysiol.* 2008; 69(1): 33-40.

Sterer N, Rosenberg M. *Streptococcus salivarius* promotes mucin putrefaction and malodor production by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 910-4.

Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol.* 1982; 11(1): 1-17.

Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Salcedo R, Koh CY, Utsunomiya I, et al. Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. *Int Immunol.* 2000; 12(5): 691–700.

Tárzia O. Halitose: um desafio que tem cura. São Paulo: Editora de publicações biomédicas; 2003. p. 111-2.

Tárzia O. Halitose: um desafio que tem cura. São Paulo: Editora de publicações biomédicas; 2003. p. 214.

Tenovuo J, Lagerlöf, F. Saliva. In: Thylstrup A, Fejerskov P, editores. *Textbook of clinical cariology.* 2. ed. Conpenhagen, Dinamarca: Munksgaard; 1994. p. 17-43.

Terai K, Sano Y, Kawasaki S, Endo K, Adachi W, Hiratsuka T, et al. Effects of dexamethasone and cyclosporine A on human beta-defensin in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004; 79(2): 175-80.

Tonzetich J, Preti G, Huggins GR. Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air during the menstrual cycle. *J Int Med Res.* 1978; 6(3):245-54.

Varoga D, Tohidnezhad M, Paulsen F, Wruck CJ, Brandenburg L, Mentlein R, et al. The role of human beta-defensin-2 in bone. *J Anat.* 2008; 213(6): 749-57.

Veen JF, Vliet IM, Derijk RH, Pelt J, Mertens B, Zitman FG. Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2008; 33(10): 1313-21.

Veerman EC, Bank CM, Namavar F, Appelmelk BJ, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV. Sulfated glycans on oral mucin as receptors for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology*. 1997, 7(6): 737-43.

Vitaliano PP, Russo J, Carr JE, Heerwagen JH. Medical school pressures and their relationship to anxiety. *J Nerv Ment Dis*. 1984; 172(12): 730-6.

Vitlic A, Lord JM, Phillips AC. Stress, ageing and their influence on functional, cellular and molecular aspects of the immune system. *Age*. 2014 Feb 25 [divulgado antes da publicação].

Witthöft T, Pilz CS, Fellermann K, Nitschke M, Stange EF, Ludwig D. Enhanced human beta-defensin-2 (hBD-2) expression by corticosteroids is independent of NK-kappaB in colonic epithelial cells (CaCo2). *Dig Dis Sci*. 2005; 50(7): 1252-9.

Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and alpha-amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol*. 2008; 78(1): 20-8.

Yadava P, Zhang C, Sun J, Hughes JA. Antimicrobial activities of human beta-defensins against *Bacillus* species. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 28(2): 132-7.

Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects with and without periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1992; 27(4 Pt 1): 233-8.

Yaegaki K, Coil JM. Examination, classification, and treatment of halitosis; clinical perspectives. *J Can Dent Assoc.* 2000; 66(5): 257-61.

Yamamoto K, Kurihara M, Matsusue Y, Imanishi M, Tsuyuki M, Kirita T. Whole saliva flow rate and body profile in healthy young adults. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(5): 464-9.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999; 286(5439): 525-8.

Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(2-3): 315-24.

Yoshizawa JM; Schafer CA, Schafer JJ; Farrell JJ; Paster BJ; David DTW. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4): 781-91.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis", protocolo nº 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.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "A study about the relation between emotional changes and the production of volatile sulfur compounds", register number 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.</p>		
 Prof. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>		

ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE ESTRESSE



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



QUESTIONÁRIO

Este questionário faz parte da pesquisa de Doutorado “**Estudo da relação entre alterações emocionais e produção de compostos sulfurados voláteis**”, conduzida por Patrícia Lima e visa obter informações sobre sua atividade e seu dia-a-dia como estudante de odontologia. Por isso, solicitamos que responda sinceramente todas as perguntas. Sua privacidade será preservada e as informações aqui obtidas terão finalidade exclusiva de pesquisa.

1 - Identificação _____

2 - Você reside com: família () amigos/colegas () sozinho ()

3 - Recebe alguma bolsa ? Sim () Não () Qual ? _____

4 - Está satisfeito com o curso? Sim () Não () Mais ou menos ()

5 - Já pensou em desistir do curso? Sim () Não ()

6 - Desenvolve alguma atividade fora da faculdade? Sim () Não ()

Qual? _____

7 - Possui alguma doença crônica? Sim () Não ()

Qual? _____ Há quanto tempo? _____

8 - Possui algum familiar com doença crônica? Sim () Não ()

Quem? _____ Doença (s): _____

9 - Consome regularmente algum medicamento? Sim () Não ()

Qual? _____ Há quanto tempo? _____

O quadro abaixo apresenta 20 fatores de estresse que podem estar presentes, em maior ou menor grau, no dia a dia da vida acadêmica. Leia cada um dos fatores e assinale abaixo do número que corresponde ao seu nível de estresse.

1 Nada estressante 2 Pouco estressante 3 Razoavelmente estressante 4 Estressante 5 Muito estressante					
FATORES DE ESTRESSE NO ENSINO	1	2	3	4	5
1. Dificuldade para administrar tempo de estudo					
2. Dúvida sobre escolha profissional					
3. Dificuldade na assimilação do conteúdo das aulas					
4. Não poder fazer o que gosto					
5. Dificuldade de adaptação ao curso e cidade					
6. Pouco preparo teórico para ingressar na atividade prática					
7. Excesso de disciplinas para cursar					
8. Realizar provas e trabalhos de aula					
9. Falta de motivação para os estudos					
10. Dificuldade de se expor diante de colegas ou professores					
11. Dificuldade de relacionamento com professores					
12. Relação com aspectos ou normas da escola					
13. Pouca expectativa de colocação profissional futura					
14. Dificuldade de relacionamento com colegas					
15. Dificuldade de conciliar estudo e vida familiar					
16. Dificuldade de conciliar estudo e lazer					
17. Dificuldade financeira para adquirir material de estudo					
18. Falta de uma pessoa para dividir dificuldades					
19. Necessidade e falta de atividade relaxante					
20. Falta de retorno positivo do que executa como estudante					
	Total parcial				

Deseja fazer algum comentário? _____

AGRADECEMOS SUA COLABORAÇÃO