



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação do estresse e sua relação com os níveis de cortisol
sanguíneo, amilase salivar e desempenho cognitivo em
executivos de um grupo empresarial**

Aluno: Renata Roland Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**UBERLÂNDIA
2011**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do estresse e sua relação com os níveis de cortisol
sanguíneo, amilase salivar e desempenho cognitivo em
executivos de um grupo empresarial**

Aluno: Renata Roland Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica. Área:
Bioquímica.**

**UBERLÂNDIA
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T266a Teixeira, Renata Roland, 1983-
2012 Avaliação do estresse e sua relação com os níveis de cortisol
 sanguíneo, amilase salivar e desempenho cognitivo em executivos
 de um grupo empresarial / Renata Roland Teixeira. -- 2012.
 67 f. : il.

 Orientador: Foued Salmen Espindola.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Bioquímica - Teses. 2. Estresse ocupacional - Teses. I. Espin-
 dola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
 grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do estresse e sua relação com os níveis de cortisol
sanguíneo, amilase salivar e desempenho cognitivo em
executivos de um grupo empresarial**

ALUNO: Renata Roland Teixeira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espindola
(Orientador)

Examinadores:

Fernanda Klein Marcondes
Isabel de Paula Antunes David
Françoise Vasconcelos Botelho
Nadia Carla Cheik

Data da Defesa: 11/07/2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Foued Salmen Espindola

Dedicatória

*A minha família e amigos que com gestos ou
palavras de amor e confiança me incentivaram sempre.*

Com carinho, dedico a vocês o meu trabalho, esforço e dedicação.

Agradecimentos

À Deus, que me ilumina com seu amor e sabedoria, obrigada por me proteger e conceder a graça da realização de tantos objetivos e sonhos durante esses quatro anos.

Aos meus pais, Hugo Tormin Teixeira e Olívia Aparecida Roland, que eu amo muito e que me ensinaram a buscar o conhecimento e sempre se alegram com as minhas conquistas, obrigada por terem sempre me apoiado e incentivado e por compreenderem minha ausência em muitos momentos.

À minha irmã, Juliana Roland Teixeira, que eu admiro muito e que ensina a viver com mais alegria, obrigada pelo carinho e pela incalculável ajuda durante a tese, é muito bom saber que posso contar sempre com você. Agora é a sua vez, o mestrado está começando!

Aos meus familiares, obrigada pelas orações, demonstrações de amor e palavras de confiança para que eu terminasse mais essa etapa.

Ao meu esposo, Jean Tofoles Martins Bernardes, que eu admiro e que me ensina a ser uma pessoa melhor, te agradeço por tudo, você participou do trabalho e sabe como foi o dia-a-dia desse processo em casa e no laboratório. Obrigada pela parceria, confiança, compreensão, paciência, amor e ajuda. Como você diz, é uma fase e vai passar. Está passando.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, por me apresentar o caminho da ciência, pela confiança que depositou em mim, pelas oportunidades oferecidas. Obrigada pela parceria que construímos nesses dez anos de história, pelas contribuições ao projeto, experimentos e na elaboração da tese. Fico muito feliz de mais uma vez estarmos concretizando uma etapa de trabalho e dedicação.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, Profa. Dra. Isabel de Paula Antunes David, Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho, Profa. Dra. Nadia Carla Cheik, Profa. Denise Vaz de Macedo e Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva, por terem prontamente aceitado o convite para participarem da banca, as contribuições de vocês serão de extrema importância para o fechamento desse trabalho.

À psicóloga do Programa de Acompanhamento da Saúde dos Executivos do grupo empresarial, Aparecida Maria de Souza Borges Cruvinel, obrigada por compartilhar das nossas hipóteses, intermediar a parceria entre a empresa e a Universidade e possibilitar a realização do trabalho.

Aos executivos que participaram da pesquisa, obrigada pelas amostras cedidas, pela receptividade e interesse. A colaboração de vocês foi fundamental para a realização desse trabalho.

À minha amiga e companheira de laboratório, Tatiane Vanessa da Silva Santos, obrigada pela oportunidade de ter te conhecido, pela alegria de termos trabalhado juntas, pela dedicação em dias, noites e madrugadas no laboratório e pelas orações e palavras de otimismo. Tenho a felicidade de nessa fase turbulenta de nossas vidas, meu doutorado e seu mestrado, ter construído a nossa grande amizade.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório, Miguel Maurício Díaz, obrigada pela ajuda na organização e análise das amostras, pelas excelentes contribuições científicas e tradução. Agradeço também pelas trocas de experiências e por ter me permitido conhecer o seu modo de pensar e ver a vida, aprendi muito com você.

À minha amiga e companheira de laboratório, Olga Lucia Bocanegra, obrigada pela ajuda nos experimentos, pela paciência, pelos conselhos e pela viagem muito divertida à Foz do Iguaçu. Foi uma grande alegria ter conhecido e trabalhado com você, agradeço por ter me deixado participar da sua vida, espero que você continue aqui. Vai ser muito triste se você for embora.

Agradeço aos amigos (Daniel, Valquíria, Douglas, Fabiana, Araújo, Glória, Laidson, Jaqueline, Fábio, Tatiane, Tatiana, Eduardo, Janaína e vários outros), vocês são a família que a gente escolhe, companheiros de gargalhadas e choros, de histórias e problemas, alegrias, passeios e viagens. Vocês fizeram com que essa fase fosse mais divertida e alegre. Todos sempre me apoiando. Obrigada pelo carinho.

Ao meu amigo, Prof. Sílvio Júnior, parceiro de trabalho com os alunos da graduação, obrigada pelo carinho, pela preocupação que tem comigo, pelas conversas e troca de experiências na educação e na vida. Agradeço também, especialmente, a D. Ivalda, mãe do Sílvio, pela revisão gramatical da tese.

À Profa. Luciana Beatriz Oliveira Bar de Carvalho, por ter percebido o meu potencial e me incentivado a participar do processo seletivo para o Banco de Avaliadores do MEC, obrigada por ter aberto meus olhos para outros caminhos dentro da minha formação. Hoje tenho um diferencial devido à experiência ímpar nas avaliações dos cursos de graduação.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), Neire, Renato e Artur, agradeço pelo importante auxílio no início do trabalho. Em especial, Neire, Simone e Alice, obrigada pelas vezes que, na minha ausência, vocês ajudaram o Prof. Foued no andamento do Laboratório.

À Paula Cristina, Paula Santos e Rafael, obrigada pela ótima receptividade no Laboratório de Nanobiotecnologia, pelos conhecimentos adquiridos, pelas trocas de experiências, por toda ajuda que me prestaram durante os experimentos (que infelizmente não estão presentes na tese, mas serão publicados, com certeza!) e pela amizade construída. Adorei conhecer vocês e poder, por um período, ter feito parte desse trio.

A todos os meus alunos, obrigada por me ensinarem a ensinar e pela paciência nesses últimos dias. Nesses quatro anos, tive a oportunidade de lecionar desde o ensino fundamental até a pós-graduação e essas experiências fizeram com que eu me apaixonasse por ser professora.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), Ismair e Zilá, agradeço por facilitarem o meu trabalho da melhor forma possível.

Ao secretário da PPGB, Gerson Fraissat, obrigada pela paciência, pelas palavras de paz e disponibilidade sempre que precisei.

Aos funcionários e professores do Instituto de Genética e Bioquímica e da Universidade Federal de Uberlândia, agradeço pela colaboração e disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço por ter acreditado na nossa proposta e ter aprovado o projeto “Biomarcadores do estresse físico e psicológico” (APQ 01347/08).

A todos vocês o meu sincero e eterno agradecimento. Muito obrigada.

A vitória não está somente na chegada, no fim, no objetivo alcançado ...

*A vitória está nos erros e acertos,
nos problemas resolvidos,
nas alegrias vivenciadas,
nos desafios superados,
no que foi aprendido durante o caminho percorrido,
e em cada conquista que nos leva sempre à frente.*

*A vitória acontece quando percebemos que cada minuto valeu a pena
e a chegada é só o começo de um outro objetivo.*

Renata Roland Teixeira

SUMÁRIO

Apresentação.....	01
Capítulo 1: Fundamentação Teórica	03
1. O mundo do trabalho e o estresse psicológico	04
2. Estresse: Processo Biológico	06
3. Biomarcadores do estresse psicológico	10
Amilase Salivar	10
Cortisol Sanguíneo	14
4. Referências Bibliográficas	16
 Capítulo 2: Chronic stress impairs cognitive performance and alters Autonomic Nervous System reactivity in business executives.....	 29
Resumo	30
Abstract	31
1. Introduction	32
2. Material and Methods	33
2.1. Subjects	33
2.2. Biological variables	34
2.3. Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults	34
2.4. The Stroop Color-Word Test	35
2.5. Statistical analysis	35
3. Results	36
3.1. Cortisol and incidence of psychological stress	36
3.2. Influence of chronic psychological stress on cognitive performance ..	36
3.3. Reactivity of salivary alpha-amylase towards acute stressor test	37
4. Discussion	37
Acknowledgments.....	39
Declaration of interest	39
References.....	40
 Figures.....	 46
Figure 1. Serum cortisol in stressed and non-stressed subjects.....	46

Figure 2. Incidence of Stress in executives assessed by means of Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (ISSSL).....	47
Figure 3. Cognitive performance of stressed and non-stressed subjects on the Stroop Color-Word Test.....	48
Figure 4. Reactivity of salivary amylase in stressed and non-stressed subjects before and after the Stroop test.....	49

Apresentação

O mundo do trabalho está cada vez mais competitivo e as inovações e transformações do mercado atingem diretamente as relações de trabalho, a produtividade e a qualidade de vida. Profissionais que ocupam cargos gerenciais, como os executivos, possuem uma maior incidência de estresse devido às características intrínsecas à profissão. O estresse é definido como um estado de desequilíbrio agudo ou crônico, desencadeado pela exposição a episódios desafiadores (estressores extrínsecos ou intrínsecos). A resposta adaptativa ao estresse consiste em uma série de alterações fisiológicas e comportamentais, resultantes da interação entre o ambiente e as informações processadas pelo Sistema Nervoso Central. A partir do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e o Sistema Nervoso Autônomo, o organismo produz os hormônios responsáveis pela resposta ao estresse, tais como as catecolaminas e os glicocorticóides que alteram o funcionamento das células. No entanto, quando estimulada de forma crônica, a resposta adaptativa ao estresse pode se tornar mal-adaptativa com consequências potencialmente deletérias. O estresse acomete o indivíduo de forma integral, comprometendo uma variedade de funções fisiológicas como a regulação do metabolismo, crescimento, reprodução e imunidade, assim como influencia o desenvolvimento da personalidade, comportamento e o desempenho cognitivo. O indivíduo quando está sob estresse pode vivenciar quatro estágios: fase de alerta, resistência, quase-exaustão e exaustão, sendo que cada uma delas apresenta sintomas específicos. Várias pesquisas têm comprovado a influência existente entre o estresse psicológico e alterações do cortisol sanguíneo, da amilase salivar humana e de aspectos cognitivos como memória e atenção. Dessa forma, a utilização de biomarcadores do estresse tem ganhado popularidade na pesquisa biomédica e psicológica. Sendo assim, o desenvolvimento desse trabalho tem como objetivos quantificar o cortisol plasmático em indivíduos que estão vivenciando alguma fase do estresse crônico, verificar as alterações da atividade da amilase salivar humana frente a uma fonte de estresse e avaliar o desempenho cognitivo de executivos que apresentam estresse psicológico crônico.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. O mundo do trabalho e o estresse psicológico

A globalização do mercado se caracteriza pela competitividade, agilidade dos negócios no mundo corporativo e capacidade de gerar e absorver inovações (PEREIRA; BRAGA; MARQUES, 2008). Dessa forma, o desenvolvimento de múltiplas habilidades por parte dos profissionais insere uma cultura empresarial na qual as pessoas trabalham por mais horas, a fim de atingir o sucesso profissional e as recompensas materiais (FARAGHER; CASS; COOPER, 2005). Zanelli (2010) salientam que a responsabilidade de apresentar bons resultados, a globalização, a modernização tecnológica e a competitividade são fatores que incrementam os níveis de estresse.

Algumas profissões tendem a ser mais estressantes em função de suas características intrínsecas, como é o caso dos executivos (PEREIRA; BRAGA; MARQUES, 2008; PAIVA; COUTO, 2008). Esses profissionais vivem em estado de permanente tensão e têm dificuldade para relaxar e manter o equilíbrio entre horário de trabalho e de descanso, criando uma situação de estresse, que pode ser excessiva e crônica (LUNDBERG, 1999a; MOTA; TANURE; CARVALHO NETO, 2008).

Estudo realizado com gerentes de bancos constatou que 89% dos profissionais investigados apresentavam um quadro de estresse. Além disso, o sexo feminino apresenta maior índice de estresse (PEREIRA; BRAGA; MARQUES, 2008). A competitividade do ambiente organizacional e a grande flexibilidade de horários são agravantes para as executivas equilibrarem a vida profissional e a pessoal (CUNNINGHAM; MURRAY, 2005; LUNDBERG; FRANKENHAEUSER, 1999b).

A compreensão do estresse na organização é necessária uma vez que o líder estressado de uma equipe pode gerar estresse em seus subordinados (ZANELLI, 2010). Além disso, executivos estressados podem apresentar falta de criatividade e diminuição da assertividade, aumentando os índices de decisões erradas, presenteísmo e absenteísmo (LOEPPKE et al., 2009).

O estresse excessivo no ambiente organizacional afeta as relações interpessoais e a produtividade. Os sintomas físicos e comportamentais desencadeados pela resposta ao estresse tornam esses profissionais vulneráveis

a diversas patologias e algumas podem se manifestar mais prematuramente, como a hipertensão, doenças dermatológicas e distúrbios do sistema imunológico (QUICK et al., 1998; LOEPPKE et al., 2009), prejudicando a carreira desse profissional (LIPP, 1996).

O estresse é definido como uma reação do organismo frente a qualquer situação de tensão aguda ou crônica, com a finalidade de manter a homeostasia e adaptar o organismo a uma nova condição (SELYE, 1936). Essa reação produz uma mudança no comportamento físico e emocional do indivíduo, resultando em uma resposta de adaptação psicofisiológica, que pode ser negativa ou positiva no organismo (KOOLHAAS et al., 2011). As diferentes respostas ao estresse dependem do tipo de agente estressor, características pessoais e circunstâncias específicas que esse indivíduo está vivenciando. Dessa forma, um agente estressor para um indivíduo pode não desencadear uma resposta em outro indivíduo (COHEN; HELBERT, 1996; LIPP, 2000).

Lipp (2000) descreveu que o indivíduo quando está sob estresse pode vivenciar quatro estágios, fase de alarme, resistência, quase-exaustão e exaustão, sendo que cada uma delas possui sintomas específicos. A fase de alarme é caracterizada pelo aumento da produção de catecolaminas e glicocorticóides, despertando no indivíduo a vontade de buscar, agir, realizar e planejar (SEYLE, 1936; LIPP, 2000). O aumento da intensidade, duração e frequência dos fatores estressantes acentua a resposta adaptativa pela busca da homeostase física e mental, iniciando-se a fase de resistência (LIPP; MALAGRIS, 2001; GAAB et al., 2003). Essa fase é decisiva para a progressão do estado de estresse, de forma que se o equilíbrio continuar prejudicado, poderá se desenvolver a fase de quase-exaustão. Nesta fase, prevalece uma sensação de desgaste e cansaço, sendo que os órgãos mais vulneráveis começam a funcionar em desequilíbrio com o organismo, surgindo algumas patologias (GOLDSTEIN, 2010). Nesse momento, se os estímulos estressores não forem removidos ou enfrentados de forma positiva, o indivíduo inicia a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se susceptível a patologias graves como depressão, hipertensão, doença arterial coronariana, infarto, úlceras pépticas e câncer (LIPP, 2004; LUNDBERG, 1999c; HOLMES, 1997).

Dessa forma, o estresse pode ser definido como um estado de desequilíbrio desencadeado pela exposição a episódios desafiadores (estressores extrínsecos ou intrínsecos) (CHROUSOS; GOLD, 1992). Para restabelecer o equilíbrio, o organismo inicia uma resposta adaptativa ao estresse que consiste de uma série de alterações fisiológicas e comportamentais, pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

2. Estresse: Processo Biológico

A resposta fisiológica ao estresse é resultante da interação entre o ambiente e as informações processadas pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (MAYER, 2000; HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001). A partir do eixo HPA e o SNA, o organismo produz os mediadores responsáveis pela resposta ao estresse, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), glicocorticóides (GCs) e as catecolaminas (C) - epinefrina (E), norepinefrina (NE) e acetilcolina (A) (TSIGOS; CHROUSOS, 2002; HOLMES, 1997).

No indivíduo submetido a uma situação de estresse, ocorre ativação do hipotálamo, o qual recebe e integra as informações neurais e humorais e estimula o SNA (ALMEIDA, 2010). A ativação do SNA provê um mecanismo de resposta rápida que controla a reação do organismo ao estressor (STRATAKIS; CHROUSOS, 1995), estimulando a medula da glândula adrenal. A subsequente secreção de catecolaminas promove o aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial, do metabolismo celular e da atividade mental (CHROUSOS; GOLD, 1992; ALMEIDA, 2010).

Por outro lado, o hipotálamo também ativa o eixo HPA. Na região paraventricular hipotalâmica, neurônios expressam e secretam o CRH, que estimula a expressão gênica da pró-opiomelanocortina (POMC) em células corticotróficas da pituitária, originando o ACTH. Esse hormônio é responsável por estimular a secreção de GCs pelo córtex da glândula adrenal (SAPOLSKY, ROMERO; MUNCK, 2000; HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001). Os GCs influenciam no metabolismo celular, estimulando a síntese protéica, gliconeogênese, lipólise e exercem várias funções sobre o SNC (ALMEIDA, 2010; STRATAKIS; CHROUSOS, 1995).

Os glicocorticóides liberados pelo córtex adrenal, em resposta ao ACTH, exercem uma retroalimentação negativa sobre a pituitária e os neurônios produtores de CRH no hipotálamo. A retroalimentação inibitória dos glicocorticóides limita a exposição dos tecidos a estes hormônios, minimizando seus efeitos catabólicos, lipogênicos, anti-reprodutivos e imunossupressores (TSIGOS; CHROUSOS, 2002) e protegendo o organismo contra possíveis efeitos deletérios devido à estimulação crônica da resposta adaptativa ao estresse (McEWEN, 1998; TANNENBAUM et al., 2002).

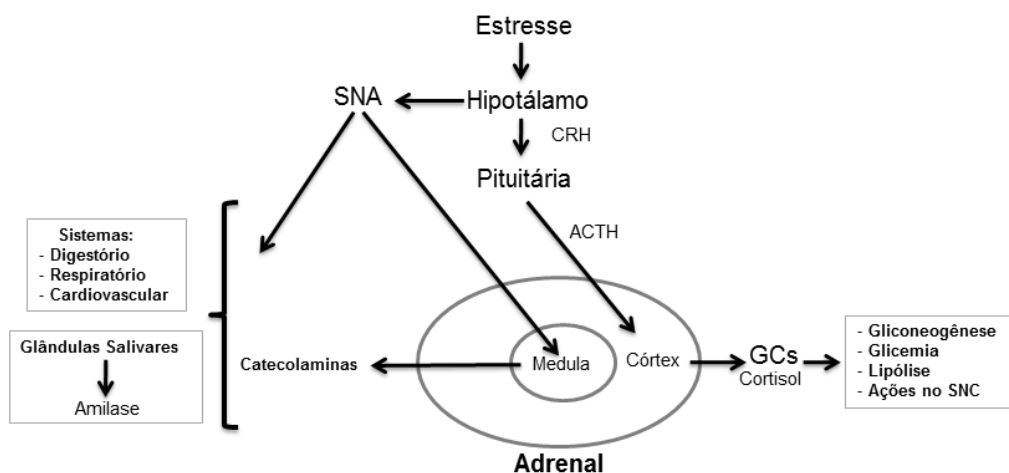


Fig. 01: Estimulação do eixo HPA e SNA em uma situação de estresse. Adaptado de Lipp (2010).

Algumas pesquisas têm demonstrado que regiões do cérebro responsáveis por funções cognitivas são influenciadas por hormônios gerados em situações de estresse (SMEETS; DZIOBEK; WOLF, 2009; KLOET et al., 1998). Após um estímulo emocional, cortisol e catecolaminas atuam sinergicamente no aumento da ativação da amígdala, estrutura relacionada a aspectos cognitivos e emocionais (VAN STEGEREN et al., 2007). Entretanto, altos níveis desses hormônios no organismo apresentam efeitos negativos na saúde somática, na resposta adaptativa ao estresse e no desempenho cognitivo (HAMMERFALD et al., 2006; GAAB et al., 2003; SCHOLZ et al., 2009), prejudicando a capacidade de atenção, concentração, memória e organização do raciocínio (HOLMES, 1994).

Os GCs se ligam a receptores neuronais presentes em estruturas do sistema límbico, como o hipocampo e a amígdala, e modificam a transcrição gênica, desempenhando um papel crítico na adaptação comportamental, aprendizado,

atenção e memória (JOELS, 2001). Além disso, o estresse provoca uma desativação dos componentes do sistema límbico, incluindo hipocampo, hipotálamo e o córtex frontal, sendo que a intensidade dessa desativação está correlacionada com o aumento da secreção de cortisol (LUPIEN; LEPAGE, 2008). Dessa forma, um aumento suprafisiológico de GCs, seja por administração exógena ou resultante de estresse, causa um impacto negativo nas funções cognitivas (DE KLOET, 2000; McEWEN, 2000).

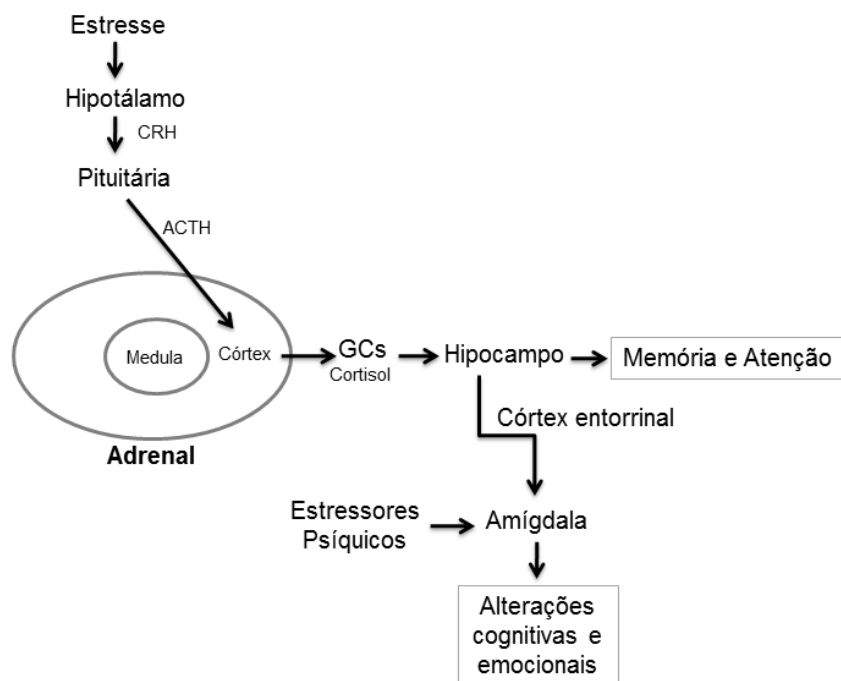


Fig. 02: Estimulação do eixo HPA e Sistema Límbico em uma situação de estresse. Adaptado de Lipp (2010).

Várias pesquisas têm utilizado testes psicológicos (testes aritméticos, *Stroop Color-Word test*, *Trier Social Stress Test*, entre outros) para confirmar a relação entre estresse e prejuízo das funções cognitivas. Para realizar uma atividade mental estruturada, o organismo precisa selecionar e processar os diversos estímulos do ambiente e produzir uma resposta comportamental. Essa habilidade seletiva é determinada pela atenção (DAVID et al., 2005).

O *Stroop Color-Word test* é um teste que permite obter informações sobre a atenção necessária para o processamento simultâneo de estímulos conflitantes. No teste de Stroop, é apresentada ao voluntário uma lista de palavras contendo o nome das cores, sendo que as mesmas estão impressas em cores diferentes, por

exemplo, a palavra AZUL, impressa em tinta vermelha, e o indivíduo deverá pronunciar em voz alta o nome da cor em que a palavra está impressa (STROOP, 1935). Dessa forma, o teste de Stroop avalia a atenção seletiva necessária para ignorar algumas características do ambiente e suprimir uma resposta automática/habitual ou um estímulo irrelevante - distrativo (leitura da palavra) em função da execução da tarefa-alvo (nomeação da cor) (SLOTNICK; SCHWARZBACH; YANTIS, 2003).

O efeito Stroop é conhecido como a interferência que ocorre entre dois estímulos conflitantes (leitura da palavra e nomeação da cor), sendo que o mesmo se manifesta somente quando não há tempo suficiente para gerar mecanismos cognitivos, como a ativação do córtex pré-frontal, que possam suprimir o estímulo irrelevante - distrativo (DAVID et al., 2011).

Uma vez que os GCs e catecolaminas secretadas durante a resposta ao estresse influenciam o SNC, o teste de Stroop tem sido utilizado para verificar a influência do estresse e dos mediadores da resposta ao estresse na atenção seletiva. Dessa forma, Brown et al. (2004) verificaram que pacientes em tratamento crônico com corticoesteróides apresentam volume hipocampal reduzido e deficiência de atenção no teste de Stroop.

Além disso, uma dose única de cortisol aumenta o número de erros durante o teste de Stroop, associada a uma mudança da atividade neural. Entretanto, não afeta o desempenho em um teste de memória episódica. Dessa forma, o cortisol possui efeitos específicos em diferentes processos neuropsicológicos e o efeito do aumento agudo do cortisol é diferente de repetidas e persistentes alterações na concentração desse hormônio, sendo que, nesse caso, a memória é prejudicada (HSU et al., 2003; GOMEZ et al., 2009).

Quando os sujeitos são submetidos a várias sessões do mesmo estressor psicossocial (teste de Stroop), no primeiro momento, o nível de cortisol, catecolaminas e ACTH encontram-se elevados. Entretanto, após 8 dias de teste, os níveis de ACTH e cortisol são menores, enquanto que as alterações das catecolaminas não são significativas. Sendo assim, ACTH, cortisol e catecolaminas possuem padrões de habituação diferentes. Esses dados aumentam as evidências de que o envolvimento do eixo HPA e do SNA pode ser

diferente durante a resposta ao estresse psicológico crônico (GERRA et al., 2001).

Visto que o estresse acomete o indivíduo de forma integral, comprometendo uma variedade de funções fisiológicas essenciais como a regulação do metabolismo, reprodução e imunidade, assim como influencia o comportamento e o desempenho cognitivo, fazem-se necessários métodos para o diagnóstico do estresse. Atualmente, existem vários testes psicológicos que analisam grandes fatores estressantes, vivenciados nos últimos meses, pequenos problemas vivenciados no dia-a-dia e aspectos cognitivos e emocionais apresentados pelo indivíduo. Outros métodos estão relacionados com as análises de medidas fisiológicas pelas técnicas eletrodérmicas, procedimentos eletromiográficos e medidas cardiovasculares, além de análises do nível de catecolaminas plasmáticas, atividade da amilase salivar (ativação do sistema simpático) e glicocorticóides (eixo HPA) presentes em amostras de sangue, urina e saliva.

3. Biomarcadores do estresse psicológico

Amilase Salivar

Pesquisas recentes têm comprovado a influência existente entre os fatores geradores de estresse psicológico com alterações de componentes salivares, tais como amilase salivar (NATER et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2004). A utilização de componentes salivares como diagnóstico de várias patologias é de grande interesse médico-científico (MALAMUD, 2011), principalmente pela facilidade no procedimento de coleta, que não é invasivo, não necessita de profissional qualificado para execução, não causa dor e nem incômodo, como ocorre nas coletas de sangue.

A saliva é uma secreção glandular essencial na manutenção da saúde dos tecidos orais. Esse fluido corporal é derivado das secreções das glândulas salivares parótida, submandibular e sublingual, glândulas salivares menores, fluidos gengivais e substâncias filtradas do sangue (EDGAR, 1992; AMERONGEN; VEERMAN, 2002). A secreção salivar é controlada pelo sistema

nervoso autônomo via sistemas de transdução de sinal que estimulam mecanismos de transporte de íons e de proteínas secretoras. Os volumes de saliva produzidos variam dependendo do tipo e intensidade da estimulação (DODDS; JOHNSON; YEH, 2005).

A saliva é constituída por água e uma mistura complexa de proteínas e enzimas, hormônios, íons e outros compostos (HUQ et al., 2007; DENNY et al., 2008; SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). O conteúdo protéico presente na saliva não só desempenha um papel importante para manter a homeostase da cavidade oral, mas também como possível marcador biológico para detecção de doenças humanas como cânceres, diabetes, patologias bucais, algumas síndromes e estresse psicológico (HU et al., 2007; DOWLING, 2008; DODDS; DODDS, 1997; LAMSTER et al., 2003; RYU et al., 2006; VAN STEGEREN; WOLF; KINDT, 2008).

A amilase salivar humana (HSA) é uma enzima produzida pelas células acinares serosas das glândulas parótidas e submandibulares. A HSA é uma proteína da família das hidrolases, encontrada na saliva nas formas glicosilada (aproximadamente 62 kDa) e não-glicosilada (aproximadamente 55 kDa) (RAMASUBBU et al., 1996). A função principal da HSA é catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas do amido em maltose e dextrinas. Com relação à secreção da amilase, resultados de pesquisa em modelos experimentais revelaram que as duas vias do sistema nervoso autônomo atuam de modo dependente, isto é, a ativação simpática e parasimpática levam a um aumento dos níveis de amilase. O estresse físico (exercício, exposição a ambientes com pressão elevada ou temperaturas baixas), o estresse psicológico ou intervenções de relaxamento podem causar variações nos níveis de amilase salivar e do conteúdo de proteína total na saliva (STEERENBERG et al., 1997; WALSH et al., 1999; CHATTERTON et al., 1996; BOSCH et al., 1996; YAMAGUCHI et al., 2004; NATER et al, 2005, BORTOLINI et al, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Vários testes padronizados de estresse psicológico têm sido utilizados para investigar a correlação do estresse com a atividade da amilase. O potencial da amilase como marcador de atividade adrenérgica pode ser de interesse substancial para o diagnóstico bioquímico do estresse humano, uma vez que a medida da amilase, em amostras de saliva, possibilita a investigação paralela dos

dois principais sistemas neuroendócrinos de estresse (NATER et al., 2005; BOSCH et al., 1996; YAMAGUCHI et al., 2004).

van Stegeren et al. (2006) realizaram um estudo utilizando um grupo experimental que ingeriu propranolol (betabloqueador adrenérgico) e outro grupo controle- placebo, submetidos a uma situação de estresse e repouso. Enquanto o grupo placebo apresentou um aumento substancial de HSA subsequente ao teste de estresse, a resposta da enzima para o grupo que ingeriu o propranolol foi atenuada. Esses estudos indicam que o sistema nervoso autônomo tem função importante na secreção da HSA, uma vez que essa enzima é altamente sensível às mudanças relacionadas ao estresse. Além disso, a secreção de amilase é regulada por inervação autonômica da glândula salivar (PROCTOR; CARPENTER, 2007) e pode ser estimulada sem aumentar o fluxo salivar (ROHLEDER et al., 2006). Dessa forma, a determinação da atividade da HSA sob condições psicológicas estressantes é cada vez mais utilizada em estudos biocomportamentais (GRANGER et al., 2007; NATER et al., 2005).

No contexto psicológico, a atividade da HSA aumenta em resposta a sessões de vídeos estressantes (TAKAI et al., 2004; BOSCH et al., 2003), resolução de tarefas aritméticas (NOTO et al., 2005; GOI et al., 2007), salto de pára-quedas (CHATTERTON et al., 1997), combate a incêndios florestais (FATKIN; KING; HUDGENS, 1990), apresentação oral em público (FILAIRE et al., 2009) e simulação de direção no trânsito (YAMAGUCHI; WAKASUGI; SAKAKIMA, 2006).

As amostras de saliva podem ser coletadas de glândulas salivares específicas ou como saliva total, considerando a produção de saliva de toda a boca. Existem vários métodos para a coleta de saliva, como as técnicas baseadas na salivação passiva, técnica de cuspe e aquelas que utilizam materiais absorventes, como o algodão, Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e Orapette (Trinity Biotech, Dublin, Irlanda) ou polímero inerte, *Salimetrics Oral Swab* (Salimetrics LLC, EUA), sendo que todas essas coletas podem ser classificadas em coletas estimuladas ou não-estimuladas (ROHLEDER; NATER, 2009; GRANGER et al., 2007).

O salivette consiste de um tubo de plástico que contém um bastão de algodão e tem sido o dispositivo mais utilizado para coleta de saliva. Os

participantes são instruídos a colocar o bastão de algodão na boca por intervalos que variam de 1 a 5 minutos. Nesse momento, os voluntários podem ser instruídos a mastigar o bastão de algodão para estimular o fluxo salivar (saliva estimulada) ou manter o algodão na boca e deixar que o mesmo absorva a saliva (saliva não estimulada). Além disso, pode ser solicitado que os participantes movimentem o salivette de forma circular para coleta de saliva total, ou que posicionem o salivette em uma área específica da boca para coletar saliva de uma determinada região (ROHLEDER; NATER, 2009).

A maior vantagem do salivette é a facilidade de coleta, o conforto e menor constrangimento do voluntário, aumentando a possibilidade de participação nos protocolos de estudo. Além disso, o algodão funciona como um filtro e após a extração da saliva por centrifugação obtém-se um líquido livre de contaminantes e componentes da mucosa bucal (ROHLEDER; NATER, 2009), sendo que esse ponto pode ser uma desvantagem dependendo do estudo a ser realizado (GRANGER et al., 2007).

Outra desvantagem do salivette é que não se pode excluir completamente a estimulação causada por esse material absorvente, mesmo em situações em que o participante é instruído para não mastigar o algodão (ROHLEDER; NATER, 2009). Além disso, Zimmermann (2008) e Granger, et al. (2007) questionam a baixa taxa de recuperação da saliva após a centrifugação, um mililitro de saliva total, sendo que esse caso pode ser compensado por técnicas de dosagens que utilizam poucos microlitros de amostra.

Para a coleta de saliva não estimulada, a técnica mais utilizada é a de salivagem passiva descrita por Navazesh (1993). Os participantes são instruídos, inicialmente, a engolir a saliva e depois coletar toda a saliva secretada em um determinado tempo que varia de 2 a 5 minutos. Essa coleta pode ser realizada pelo método de cuspe, no qual o participante cospe toda a saliva produzida nesse período em um tubo de coleta; método de sucção, no qual a saliva acumulada é aspirada de dentro da boca do participante ou pelo método de drenagem, no qual o participante permite que a saliva escorra sob o lábio para dentro de um tubo de coleta sem qualquer movimentação (ROHLEDER; NATER, 2009). A maior vantagem da coleta de saliva não estimulada é a representatividade da combinação da saliva produzida por todas as glândulas (GRANGER et al., 2007).

O método de cuspe possui algumas variações nas quais a saliva coletada é estimulada por substâncias químicas, como o ácido cítrico ou por estimulação mecânica, pela mastigação de parafina ou parafilme. A vantagem é a adequação específica do volume de saliva para o experimento. Entretanto, a estimulação do fluxo salivar altera a contribuição de cada glândula na produção da saliva total, além de ativar a secreção de proteínas (ROHLEDER; NATER, 2009).

A desvantagem desses métodos é a pouca praticidade, o desconforto e o constrangimento dos participantes e a necessidade de treinamento para a coleta da amostra. Além disso, a saliva coletada não passa por nenhum processo de separação dos detritos celulares da mucosa bucal e contaminantes, o que pode interferir nas dosagens (ROHLEDER; NATER, 2009), não obstante que, dependendo do estudo, essa característica pode ser uma vantagem.

Outro método, recentemente disponibilizado no mercado, é o SCS (*Saliva Collection System*, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Áustria), um sistema de coleta de saliva em base líquida. Inicialmente, os participantes realizam uma limpeza da cavidade bucal com uma solução específica para uniformização das condições de coleta e, posteriormente, são instruídos a colocar a solução tamponada, à base de ácido cítrico, na cavidade bucal por 2 minutos para a extração da saliva (RAGGAM et al.; 2008a). Gröschl et al. (2008) testaram esse novo sistema de coleta para a análise de esteróides, peptídeos e medicamentos, enquanto Raggam et al. (2008b) quantificaram o material genético viral presente na saliva, obtendo resultados confiáveis e reprodutíveis. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para determinar os possíveis interferentes nesse sistema de coleta.

Cortisol Sanguíneo

Tradicionalmente, a avaliação do cortisol mostrou-se um método útil para acessar a reatividade do eixo HPA relacionado à resposta ao estresse (KIRSCHBAUM; HELLHAMMER, 1994). O cortisol livre ou biologicamente ativo, por difusão passiva, pode ser transferido para a saliva e alguns estudos evidenciam a correlação entre nos níveis de cortisol plasmático e salivar. Sendo assim, a quantificação do cortisol salivar tem sido utilizada em estudos

biocomportamentais já que a coleta de saliva é um método indolor, simples e não invasivo (CALIXTO et al.; 2002; DAVIS; GRANGER, 2009). Entretanto, é necessário averiguar a influência do método de coleta da saliva na quantificação dos biomarcadores salivares (GRANGER et al., 2007). Recentemente, a empresa *Salimetrics* disponibilizou no mercado um dispositivo de coleta de saliva específico para as dosagens de cortisol salivar.

Dados da literatura revelam que a resposta do eixo HPA e níveis de cortisol são alterados de forma diferente de acordo com os estressores psicossociais (DICKERSON; KEMENY, 2004). Os níveis desse hormônio estão associados positivamente ao estresse da vida em geral e ao estresse no trabalho. Entretanto, as dosagens diminuem em resposta a fadiga, esgotamento ou exaustão e na Síndrome do Estresse Pós-traumático (CHIDA; STEPTOE, 2009).

Bellingrath e Kudielka (2008) verificaram que professores estressados cronicamente devido a condições de trabalho desfavoráveis apresentam um aumento dos níveis de cortisol em resposta a um teste agudo (*Trier Social Stress Test*), demonstrando uma hipereatividade do eixo HPA (CHANDOLA; HERACLIDES; KUMARI, 2010). Por outro lado, nas situações de *burnout* os níveis de cortisol basal não são alterados. Entretanto, após a administração de corticoesteróide ocorre uma significativa supressão do cortisol, apontando para uma alteração da sensibilidade do *feedback* negativo do eixo HPA (BELLINGRATH; WEIGL; KUDIELKA, 2008).

Além disso, o estresse excessivo ou o tratamento prolongado com corticoesteróides provoca uma resposta alterada do eixo HPA que pode aumentar a susceptibilidade à doenças inflamatórias crônicas, como a dermatite atópica (BUSKE-KIRSCHBAUM; HELLHAMMER, 2003; BUSKE-KIRSCHBAUM et al., 2002), assim como está relacionado a maiores índices de depressão e déficits de memória e atenção seletiva (BROWN et al., 2004; CORNELISSE; van STEREGEN; MARIAN, 2011).

4. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, O.M.M.S. A resposta neurofisiológica ao stress. In: LIPP, M.E.N. **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2010. p. 25-30.

AMERONGEN, A.V.; VEERMAN, E.C. Saliva: the defender of the oral cavity. **Oral Diseases**, v. 8, p.12–22. 2002.

BELLINGRATH, S.; KUDIELKA, B.M. Effort-reward-imbalance and overcommitment are associated with hypothalamus—pituitary—adrenal (HPA) axis responses to acute psychosocial stress in healthy working schoolteachers. **Psychoneuroendocrinology**. v. 33, p. 1335-1343. 2008.

BELLINGRATH, S.; WEIGL, T.; KUDIELKA, B.M. Cortisol dysregulation in school teachers in relation to burnout, vital exhaustion, and effort–reward-imbalance. **Biological Psychology**. v. 78, p. 104-113. 2008.

BORTOLINI, M.J.; DE AGOSTINI, G.G.; REIS, I.T.; LAMOUNIER, R.P.; BLUMBERG, J.B.; ESPINDOLA, F.S. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. **Research Quarterly Exercise & Sport**. v. 80, n. 3, p. 604-10. 2009.

BOSCH, J.A.; BRAND, H.S.; LIGTENBERG, T.J.; BERMOND, B.; HOOGSTRATEN, J.; AMERONGEN, A.V. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. **Psychosomatic Medicine**. v. 58, n. 4, p. 374 – 382. 1996.

BOSCH, J.A.; DE GEUS, E.J.; VEERMAN, E.C.; HOOGSTRATEN, J.; AMERONGEN, A.V. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. **Psychosomatic Medicine**. v. 65, n. 2, p. 245-58. 2003.

BROWN, S.E.; WOOLSTON, J.D.; FROL, A.; BOBADILLA, L.; KHAN, D.A.; HANCZYC, M.; RUSH, A.J.; FLECKENSTEIN, J.; BABCOCK, E.; CULLUM, C.M. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. **Biological Psychiatry**. v. 55, p. 538–545. 2004.

BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; GEIBEN, A.; HÖLLIG, H.; MORSCHHÄUSER, E.; HELLHAMMER, D. Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 87, n. 9, p. 4245-51. 2002.

BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; HELLHAMMER, D.H. Endocrine and immune responses to stress in chronic inflammatory skin disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 992, p. 231-40. 2003.

CALIXTO, C.; MARTINEZ, F.E.; JORGE, S.M.; MOREIRA, A.C.; MARTINELLI, C.E.Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. **Journal of Pediatrics**. v. 140, n. 1, p. 116-8. 2002.

CHANDOLA, T.; HERACLIDES, A.; KUMARI, M. Psychophysiological biomarkers of workplace stressors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 35, n. 1, p. 51-7. 2010.

CHATTERTON, R.T.; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; ELLMAN, A.B.; HUDGENS, G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. **Clinical Physiology**. v. 16, n. 4, p. 433-448. 1996.

CHATTERTON, R.T.; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; HUDGENS, G.A. Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 82, n. 8, p. 2503–2509. 1997.

CHIDA, Y.; STEPTOE, A. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. **Biological Psychology**. v. 80, n. 3, p. 265-78. 2009.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. v. 267, n. 9, p. 1244-1252. 1992.

COHEN, S.; HELBERT, T.B. Psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual Review of Psychology**. v. 47, p. 113-142. 1996.

CORNELISSE, S.; van STEREGEN, A.H.; JÖELS, M. Implications of psychosocial stress on memory formation in a typical male versus female student sample. **Psychoneuroendocrinology**. v. 36, p. 569-578. 2011.

CUNNINGHAM, C.R.; MURRAY, S.S. Two executives, one career. **Harvard Business Review**. v. 83, n. 2, p. 125-31. 2005.

DAVID, I.A.; VOLCHAN, E.; MENCHISE, C.; ALFRADIQUE, I.; OLIVEIRA, L.; PINHEIRO-MACHADO, W. Influence of temporal manipulations on the magnitude of the “Stroop effect”. **Arquivos Brasileiros de Psiquiatria, Neurologia e Medicina Legal** . v. 99, n. 1, p. 11-17. 2005.

DAVID, I.A.; VOLCHAN, E.; VILA, J.; KEIL, A.; OLIVEIRA, L.; FARIA-JUNIOR, J.P.A.; PERAKAKIS, P.; DIAS, E.C.; MOCAIBER, I.; PEREIRA, M.G.; MACHADO-PINHEIRO, W. Stroop matching task: role of feature selection and temporal Modulation. **Experimental Brain Research**. v. 208, p. 595–605. 2011.

DAVIS, E.P.; GRANGER, D.A. Developmental differences in infant salivary alpha-amylase and cortisol responses to stress. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, n. 6, p. 795-804. 2009.

DE KLOET, E.R. ; VREUGDENHIL, E. ; OITZL, M.S.; JOËLS, M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**. v. 19, p. 269-301. 1998.

DE KLOET, E.R. Stress in the brain. **European Journal of Pharmacology**. v. 29, n. 405, p. 1-3. 2000.

DENNY, P.; HAGEN, F.K.; HARDT, M.; LIAO, L.; YAN, W.; ARELLANNO, M.; BASSILIAN, S.; BEDI, G.S.; BOONTHEUNG, P.; COCIORVA, D.; *et al.* The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland: Saliva Collected as the Ductal Secretions. **Journal of Proteome Research**. v. 7, n. 5, p. 1994–2006. 2008.

DICKERSON, S.S.; KEMENY, M.E. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. **Psychology Bulletin**. v. 130, n. 3, p. 355-91. 2004.

DODDS, M.W.; DODDS, A.P. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**. v. 83, n. 4, p. 465-70. 1997.

DODDS, M.W.J.; JOHNSON, D.A.; YEH, C. Health benefits of saliva: a review. **Journal of Dentistry**. v. 33, p. 223-233. 2005.

DOWLING, P.; WORMALD, R.; MELEADY, P.; HENRY, M.; CURRAN, A.; CLYNES, M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. **Journal of Proteomics**. v. 71, p. 168-175. 2008.

EDGAR, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. **British Dental Journal**. v. 172, p. 305–312. 1992.

FARAGHER, E.B.; CASS, M.; COOPER, C.L. The relationship between job satisfaction and health: a meta-analysis. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 62, p. 105–112. 2005.

FATKIN, L.T.; KING, J.M.; HUDGENS, G.A. Evaluation of stress experienced by Yellowstone Army fire fighters (ARL-TM9-90). **Army Research Laboratory Aberdeen Proving Ground**. MD: USA. 1990.

FILAIRE, E.; DREUX, B.; MASSART, A.; NOURRIT, B.; RAMA, L.M.; TEIXEIRA, A. Salivary alpha-amylase, cortisol and chromogranin A responses to a lecture: impact of sex. **European Journal of Applied Physiology**. v. 106, n. 1, p. 71-77. 2009.

GAAB, J.; BLATTNER, N.; MENZI, T.; PABST, B.; STOYER, S.; EHLERT, U. Randomized controlled evaluation of the effects of cognitive-behavioral stress management on cortisol responses to acute stress in healthy subjects. **Psychoneuroendocrinology**. v. 28, n. 6, p. 767-79. 2003.

GOLDSTEIN, D.S. Adrenal Responses to Stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**. v. 30, n. 8, p. 1433–1440. 2010.

GOI, N.; HIRAI, Y.; HARADA, H.; IKARI, A.; ONO, T.; KINAE, N.; HIRAMATSU, M.; NAKAMURA, K.; TAKAGI, K. Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. **The Journal of Toxicological Sciences**. v. 32, n. 2, p. 121-127. 2007.

GOMEZ, R.G.; POSENER, J.A.; KELLER, J.; DEBATTISTA, C.; SOLVASON, B.; SCHATZBERG, A.F. Effects of major depression diagnosis and cortisol levels on indices of neurocognitive function. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, p. 1012–1018. 2009.

GRANGER, D.A.; KIVLIGHAN, K.T.; FORTUNATO, C.; HARMON, A.G.; HIBEL, L.C.; SCHWARTZ, E.B.; WHEMBOLUA, G.L. Integration of salivary biomarkers

into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens. **Physiology & Behavior**. v. 92, p. 583-590. 2007.

GRÖSCHL, M.; KOHLER, H.; TOPF, H.G.; RUPPRECHT, T.; RAUHA, M. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, p. 478–486. 2008.

GERRA, G.; ZAIMOVIC, A.; MASCETTI, G.G.; GARDINI, S.; ZAMBELLI, U.; TIMPANO, M.; RAGGI, M.A.; BRAMBILLA, F. Neuroendocrine responses to experimentally induced psychological stress in healthy humans. **Psychoneuroendocrinology**. v. 26, p. 91–107. 2001.

HABIB, K.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**. v. 30, p. 695-728. 2001.

HAMMERFALD, K.; EBERLE, C.; GRAU, M.; KINSPERGER, A.; ZIMMERMANN, A.; EHLERT, U.; GAAB, J. Persistent effects of cognitive-behavioral stress management on cortisol responses to acute stress in healthy subjects: a randomized controlled trial. **Psychoneuroendocrinology**. v. 31, n. 3, p. 333-339. 2006.

HOLMES, D.S. Meditation and somatic arousal reduction: A review of the experimental evidence. **American Psychologist**. v. 39, p. 1-10. 1994.

HOLMES, D.S. **Psicologia dos transtornos mentais**. Porto Alegre: Artmed. 1997, 565 p.

HSU, F.C.; GARSIDE, M.J.; MASSEY, A.E.; McALLISTER-WILLIAMS, R.H. Effects of a single dose of cortisol on the neural correlates of episodic memory and error processing in healthy volunteers. **Psychopharmacology**. v. 167, p. 431–442. 2003.

HU, S.; YEN, Y.; ANN, D.; WONG, D.T. Implications of salivary proteomics in drug discovery and development: a focus on cancer drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 12, n. 21/22. 2007.

HUQ, N.L.; CROSS, K.J.; UNG, M.; MYROFORIDIS, H.; VEITH, P.D.; CHEN, D.; STANTON, D.; HE, H.; WARD, B.R.; REYNOLDS, E.C. A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. v. 13, p. 547-564. 2007.

JÖELS, M. Corticosteroids actions in the hippocampus. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 13, n. 8, p. 657-669. 2001.

KIRSCHBAUM, C.; HELLHAMMER, D.H. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. **Psychoneuroendocrinology**. v. 19, n. 4, p. 313-33. 1994.

KOOLHAAS, J.M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; De BOER, S.F.; FLÜGGE, G.; KORTE, S.M.; *et al.* Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 2011.

LAMSTER, I.B.; KAUFMAN, E.; GRBIC, J.T.; WINSTON, L.J.; SINGER, R.E. Beta glucuronidase activity in saliva: Relationship to clinical periodontal parameters. **Journal of Periodontology**. v. 74, p. 353-359, 2003.

LIPP, M.E.N. Stress: conceitos básicos. In: LIPP, M.E.N. **Pesquisas sobre stress no Brasil: saúde, ocupações e grupos de risco**. Campinas: Papirus, 1996. p. 17-31.

LIPP, M.E.N. **Manual do Inventário de Sintomas de Stress para adultos**. São Paulo: Casa do Psicólogo. 2000, 40 p.

LIPP, M.E.N.; MALAGRIS, L.E.N. O stress emocional e seu tratamento. In: Range, B. **Psicoterapias cognitivo-comportamentais: um diálogo com a psiquiatria**. Rio de Janeiro: Artmed, 2001. p. 475-490.

LIPP, M.E.N. Stress emocional: esboço da teoria de temas de vida. In: LIPP, M.E.N. **O stress no Brasil: pesquisas avançadas**. Campinas: Papirus, 2004. p. 17-30.

LIPP, M.E.N. **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas**. São Paulo: Casa do Psicólogo. 2010, 227 p.

LOEPPKE, R.; TAITEL, M.; HAUFLE, V.; PARRY, T.; KESSLER, R.C.; JINNETT, K. Health and productivity as a business strategy: a multiemployer study. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v. 51, n. 4, p. 411-28. 2009.

LUNDBERG, U. Stress responses in low-status jobs and their relationship to health risks: musculoskeletal disorders. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 896, p. 162-172. 1999a.

LUNDBERG, U.; FRANENHAEUSER, M. Stress and workload of men and women in high-ranking positions. **Journal of Occupational Health Psychology**. v. 4, n. 2, p. 142-151. 1999b.

LUNDBERG, U. Coping with Stress: Neuroendocrine Reactions and Implications for Health. **Noise & Health**. v. 1, n. 4, p. 67-74. 1999c.

LUPIEN, S.J.; LEPAGE, M. Stress, memory and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. **Behavioral Brain Research**. v. 127, n. 1-2, p. 137-158. 2008.

MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid. **Dental Clinics of North America**. v. 55, p. 159-178. 2011.

- MAYER, E.A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. **International Journal in Gastroenterology**. v. 47, n. 6, p. 861-869. 2000.
- MCEWEN, B.S. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 840, p. 33-44. 1998.
- MCEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. v. 886, n. 1-2, p. 172-189. 2000.
- MOTA, C.M.; TANURE, B.; CARVALHO NETO, A. Estresse e sofrimento no trabalho dos executivos. **Psicologia em Revista**. v. 14, n. 1, p. 107-130. 2008.
- NATER, U.M.; MARCA, R.L.; FLORIN, L.; MOSES, A.; LANGHANS, W.; KOLLER, M.M.; EHLERT, U. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity-associations with adrenergic activity. **Psychoneuroendocrinology**. v. 31, p. 49-58. 2005.
- NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva: Saliva as a diagnostic fluid. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 694, p. 72-77. 1993.
- NOTO, Y.; SATO, T.; KUDO, M.; KURATA, K.; HIROTA, K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. **Anesthesia & Analgesia**. v. 101, n. 6, p. 1873-1876. 2005.
- OLIVEIRA, N.; BESSA, A.; LAMOUNIER, R.; SANTANA, M.; MELLO, M.; ESPINDOLA, F. Changes in the Salivary Biomarkers Induced by an Effort Test. **International Journal of Sports Medicine**. v. 31, n. 6, p. 377-381. 2010.
- PAIVA, K.C.M.; COUTO, J.H. Qualidade de vida e estresse gerencial “pós-choque de gestão”: o caso da Copasa-MG. **Revista de Administração Pública**. v. 42, n. 6, p. 1189-1211. 2008.

PEREIRA, L.Z.; BRAGA, C.D.; MARQUES, A.L. Estresse no trabalho: Estudo de caso com gerentes que atuam em uma instituição financeira nacional de grande porte. **Revistas de Ciências da Administração**. v. 10, p. 175-196. 2008.

PROCTOR, G.B.; CARPENTER, G.H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 133, p. 3–18. 2007.

QUICK, J.C. Introduction to the measurement of stress at work. **Journal of Occupational Health Psychology**. v. 3, n. 4, p. 291-293. 1998.

RAGGAM, R.B.; SANTNER, B.I.; KOLLROSER, M.; GÖSSLER, W.; SCHMIED, B.; SCHMITT, U.; STELZL, E.; LACKNER, A.; WAGNER, J.; MARTH, E.; KESSLER, H.H. Evaluation of a novel standardized system for collection and quantification of oral fluid. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 46, n. 2, p. 287-291. 2008a.

RAGGAM, R.B.; WAGNER, J.; MICHELIN, B.D.A.; PUTZ-BANKUTI, C.; LACKNER, A.; BOZIC, M.; STAUBER, R.E.; SANTNER, B.I.; MARTH, E.; KESSLER, H.H. Reliable Detection and Quantitation of Viral Nucleic Acids in Oral Fluid: Liquid Phase-Based Sample Collection in Conjunction With Automated and Standardized Molecular Assays. **Journal of Medical Virology**. v. 80, p. 1684–1688. 2008b.

RAMASUBBU, N.; PALOTH, V.; LUO, Y.; BRAYER, G.D.; LEVINE, M.J. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. **Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography**. v. 52, p. 435-46, 1996.

ROHLEDER, N.; WOLF, J.M.; MALDONADO, E.F.; KIRSCHBAUM, C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. **Psychophysiology**. v. 43, p. 645–652. 2006.

ROHLEDER, N.; NATER, U.M. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, p. 469-485. 2009.

RYU, O.H.; ATKINSON, J.C.; HOEHN, G.T.; ILLEI, G.G.; HART, T.C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. **Rheumatology**. v. 45, p. 1077–1086. 2006.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**. v. 21, n. 1, p. 55-89. 2001.

SCHIPPER, R.G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives Oral Biology**. v. 52, p. 1114-1135, 2007.

SCHOLZ, U.; LA MARCA, R.; NATER, U.M.; ABERLE, I.; EHLERT, U.; HORNING, R.; MARTIN, M.; KLIEGEL, M. Go no-go performance under psychosocial stress: beneficial effects of implementation intentions. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 91, n. 1, p. 89-92. 2009.

SEYLE, H.A. Syndrome produced by diverse nervous agents. **Nature**. v. 148, p. 22, 1936.

SLOTNICK, S.D.; SCHWARZBACH, J.; YANTIS, S. Attentional inhibition of visual processing in human striate and extrastriate cortex. **Neuroimage**. v. 19, n. 4, p. 1602-161. 2003.

SMEETS, T.; DZIOBEK, I.; WOLF, T.O. Social cognition under stress: Differential effects of stress-induced cortisol elevations in healthy young men and women. **Hormones and Behavior**. v. 55, p. 507-513. 2009.

STEERENBERG, P.A.; VAN ASPEREN, I.A.; AMERONGEN, A.V.N.; BIEWENGA, J.; MOL, D.; MEDEMA, G. Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. **European of Journal Oral Sciences**. v. 105, p. 305-309. 1997.

STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 771, p. 1–18. 1995.

STROOP, J.R. Studies of interference in serial verbal reactions. **Journal of Experimental Psychology**. v. 18, p. 643–663. 1935.

TAKAI, N.; YAMAGUCHI, M.; ARAGAKI, T.; ETO, K.; UCHIHASHI, K.; NISHIKAWA, Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. **Archives of Oral Biology**. v. 49, n. 12, p. 963-968. 2004.

TANNENBAUM, B.; TANNENBAUM, G.S.; SUDOM, K.; ANISMAN, H. Neurochemical and behavioral alterations elicited by a chronic intermittent stressor regimen: implications for allostatic load. **Brain Research**. v. 25, n. 953, p. 82-92. 2002.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**. v. 53, n. 4, p. 865–71. 2002.

VAN STEGEREN, A.; ROHLEDER, N.; EVERAERD, W.; WOLF, O.T. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. **Psychoneuroendocrinology**. v. 31, p. 137–141. 2006.

VAN STEGEREN, A.H.; WOLF, O.T.; EVERAERD, W.; SCHELTENS, P.; BARKHOF, F.; ROMBOUTS, S.A.R.B. Endogenous cortisol level interacts with noradrenergic activation in the human amygdale. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 87, p. 57–66. 2007.

VAN STEGEREN, A.H.; WOLF, O.T.; KINDT, M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. **International Journal of Psychophysiology**. v. 69, p. 33–40. 2008.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. **Journal of Sports Sciences**. v. 17, p. 129-134. 1999.

YAMAGUCHI, M., KANEMORI, T., KANEMARU, M., TAKAI, N., MIZUNO, Y., YOSHIDA, H. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 20, p. 491–497. 2004.

YAMAGUCHI, M.; WAKASUGI, J.; SAKAKIMA, J. Evaluation of driver stress using biomarker in motor-vehicle driving simulator. **Conference Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**. v. 1, p. 1834 - 1837. 2006.

ZANELLI, J.C. **Estresse nas organizações de trabalho: compreensão e intervenção baseadas em evidências**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 128 p.

ZIMMERMANN, L.K. A salivary collection method for young children. **Psychophysiology**. v. 45, n. 3, p. 353-355. 2008.

Capítulo 2

**Chronic stress impairs cognitive performance and
alters Autonomic Nervous System reactivity in
business executives**

Resumo

O presente estudo analisou a incidência de estresse crônico em executivos de um grupo empresarial (n = 125) e sua relação com os níveis de cortisol sérico, desempenho cognitivo e reatividade do Sistema Nervoso Autônomo após um estressor agudo. O Inventário de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp (ISSL) e o teste *Stroop Color-Word* foram utilizados para determinar a incidência de estresse e desempenho cognitivo, respectivamente. A concentração de cortisol sérico foi determinada por ELISA e a atividade da amilase salivar por um ensaio cinético. Os resultados revelaram que 45% dos sujeitos investigados se encontram em alguma fase do estresse, sendo que destes, 79% estão na fase de resistência. Indivíduos que apresentaram um maior nível de estresse, segundo o ISSL, também possuem maiores níveis de cortisol sérico, mas uma menor reatividade da alfa-amilase salivar após o teste de Stroop. Além disso, após o teste de Stroop foi observado maior tempo de reação e maior número de erros nesses indivíduos. Os resultados sugerem que o estresse psicológico crônico está associado com níveis mais altos de cortisol sérico, menor reatividade da amilase e prejuízo da demanda cognitiva. Sendo assim, a diminuição da atividade simpática, como resultado da exposição crônica ao estresse, e refletida por níveis mais baixos de atividade enzimática pode ter sido responsável por prejuízos na atenção seletiva e desempenho cognitivo.

Palavras-chave: Estresse; *Stroop*; Ambiente de trabalho, Saliva; Cortisol; Amilase.

Abstract

The present study examined the incidence of chronic stress in business executives (n=125) and its relation with levels of serum cortisol, cognitive performance and autonomic reactivity after an acute stressor. Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults and the Stroop Color-Word test were used to determine stress incidence and cognitive performance, respectively. The concentration of cortisol was determined in blood by ELISA and the activity of salivary amylase by a kinetic assay. Results revealed that 45% of the subjects investigated experience some sort of stress, and of them, 79% are in the phase of resistance. Subjects who experienced a higher level of stress also showed a higher concentration of cortisol but a lower reactivity of amylase after the Stroop test. Longer reaction times and higher rates of error after the Stroop test were also observed in these subjects. These results suggest that chronic psychological stress is associated with higher levels of serum cortisol and a lower reactivity of amylase towards cognitive demands. Diminished sympathetic activity, as result of chronic exposure to stress, and reflected by lower levels of amylase activity might have been responsible for impairments in selective attention and cognitive performance.

Keywords: Stress; Stroop test; Workplace; Saliva; Cortisol; Amylase.

1. Introduction

The emergence of global markets, new technologies and the need for outstanding results are factors that significantly increase levels of occupational stress (Faragher et al. 2005). Executive positions, for instance, are particularly stressful and demand long hours of work. Business executives are constantly under pressure and normally find it difficult to unwind and maintain the balance between working hours and rest, even during times set aside for relaxation (Loerbroks et al. 2010). Excessive stress can lead to diminished effectiveness and creativity at work and compromised decision-making and problem-solving abilities (Loeppke et al. 2009).

The stress response is under control of the autonomic nervous system (ANS) and the hypothalamic-pituitary-adreno-cortical (HPA) axis. Cortisol is released into the blood stream as a result of a hormonal cascade initiated in the hypothalamus. The paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus synthesizes and releases corticotropin-releasing-hormone (CRH) into the portal blood circulation. In addition to CRH, vasopressin is co-secreted and stimulates synergistically with CRH the secretion of adreno corticotropic hormone (ACTH) at the level of the anterior pituitary. Via the systemic blood flow, ACTH reaches the adrenal cortex and, subsequently, stimulates the synthesis and secretion of glucocorticoids, like cortisol (for review see Fries et al. 2009).

Activation of the ANS, on the other hand, results in the release of epinephrine and norepinephrine (catecholamines) from the adrenal medulla as well as norepinephrine from nerve terminals of the sympathetic nervous system (Wolf et al. 2008). It was suggested that salivary alpha-amylase (sAA) could be used as an index of ANS activity. The basis of this hypothesis is that the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system innervate salivary glands (Proctor and Carpenter 2007). sAA increases have been reported in response to psychologically stressful conditions, such as experience of a video of medical procedures (Takai et al. 2007), the cold pressor stress test (van Stegeren et al. 2008), a driving simulation (Yamaguchi et al. 2006), arithmetic tasks (Goi et al. 2007) and oral examinations (TSST - Trier Social Stress Test) (Schoofs et al. 2007).

Based on the work of Seyle (1936), Lipp (2000) developed a diagnostic tool for psychological stress composed of four phases; alarm, resistance, almost-exhaustion and exhaustion with specific psychological and physical symptoms ascribed to each phase (Lundberg 1999). On the other hand, several previous studies have used a variety of cognitive tests to assess the relation between stress and cognitive performance.

The Stroop Color-Word test is a psychological tool that demands that the color of a word designating a different color be named. This particular test provides information regarding the ability to process simultaneous stimulus and has been shown to take longer and cause more errors than naming colors of congruent color names (Stroop 1935; MacLeod 1991). The Stroop test has been used as an acute psychological stressor, capable of inducing emotional responses and heightened levels of autonomic activity (Renaud and Blondin 1997).

The present study examined the incidence of chronic stress in business executives by Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults and measures of serum cortisol and determined the influence of such levels of stress on cognitive performance by means of the Stroop test. In order to investigate possible relations between the HPA axis and the ANS system, the reactivity of sAA to the Stroop test was compared between stressed and non-stressed subjects.

2. Material and Methods

2.1. Subjects

Subjects were 125 business executives (95 men and 30 women, age 42.75 ± 9.5 years) from a national company with business in information technology, telecommunications and entertainment. Subjects were recruited during the annual assessment of health held by their company. All the participants were healthy based on clinical and laboratory examinations. None of the subjects smoked, had oral diseases history or were taking regular or incidental medication during the study. All participants gave written consent to the study, which was approved by the Institutional Review Board.

2.2. Biological variables

The concentration for cortisol was determined in serum using a competitive enzyme immune-assay. In the laboratory responsible for the analyses, blood from the antecubital vein ($\pm 2\text{mL}$) was withdrawn into EDTA-coated tubes by a qualified phlebotomist using standardized venipuncture techniques. All collection procedures took place between 07:00 and 08:00h, after 30 minutes of resting and were performed with subjects under fasting conditions (8 hours). Analysis of blood samples were performed immediately after collection.

The day after collection of blood samples, subjects completed the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (ISSL) and were submitted to the Stroop test (see below). Samples of whole saliva were collected immediately before and after the Stroop test. Saliva production was stimulated by chewing a sterile cotton swab (Salivette) for two minutes. Subjects were asked to refrain from alcohol or caffeinated beverages 24h prior to the study and not to eat at least 60min before collection of samples. After collection of saliva, samples were frozen at -80°C until analysis.

On the day of analysis saliva samples were naturally thawed and centrifuged at $1500 \times g$ for 15 minutes to remove mucins. Ten μL of saliva were diluted (1:200) in MES buffer (MES 50mM, NaCl 300mM, CaCl_2 5mM, KSCN 140mM, pH 6.3) and 8 μL was pipetted in microplatte, followed by the addition of 320 μL of pre-heated (37°C) substrate solution (2-chloro-4-nitrophenil- β -D-galactopiranosilmaltoside: GALG2-CNP). Optical density was read at 405 nm at one-min intervals during three minutes at 37°C using a microplate reader. Enzyme activity (U/mL) was determined using the formula: $[\text{Absorbance difference per minute} \times \text{total assay volume (328 ml)} \times \text{dilution factor (200)}] / [\text{millimolar absorptivity of 2-chloro-4-nitrophenol (12.9)} \times \text{sample volume (.008 ml)} \times \text{light path (.97)}]$ (Granger et al. 2007, adapted). Reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.3. Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults

In order to evaluate the incidence of psychological stress, subjects completed the Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (ISSL) (Lipp 2000). Lipp's

Inventory is a validated 10-minute questionnaire used to identify phases of stress. It is validated for people 15 years of age and older, and has been used in research and clinical work in the area of stress. The Inventory is comprised of three stages that correlate characteristic symptoms of stress with their corresponding phases. The questionnaire was applied, corrected and interpreted by a trained psychologist according to the inventory's handbook.

2.4. The Stroop Color-Word Test

Cognitive performance was assessed by means of the Stroop Color-Word Test. All tests were conducted between 8:00 and 9:00 am 24h after collection of blood samples for cortisol analysis. Tests were conducted in a sound-attenuated, electrically-shielded room at the facilities of the company. The Stroop Color-Word Test was the instrument employed to assess subjects' selective attention and reaction time. The test consists of two tasks, namely "Color" and "Color-Word." The Stroop Test involved a sheet of 112 printed color names (red, green, blue, yellow) arranged in four columns of 28 names each. The names were printed in one of four different colors of ink (red, green, blue, yellow), but no name was printed in a matching color (e.g., the name RED is never printed in red ink) (Zalonis et al. 2008). In the Color task, the subject was required to read the words aloud as quickly as possible, irrespective of the color of ink in which they are printed. In the Color-Word task, subjects were instructed to identify the color in which the stimuli are printed, and to do so as quickly and accurately as possible. Reaction time was measured in seconds from the onset of the stimulus, and the accuracy of each response was checked. The examiners did not point out errors made during the test. Data were collected by five examiners who had been previously trained in the administration of the test.

2.5. Statistical analysis

The biological and psychological variables were compared using unpaired Student *t* tests. For all analyses, significance levels were considered at $p \leq 0.05$. The results are presented as means $\pm$ SEM. All statistical analyses were carried

out using the SigmaPlot with SigmaStat integration software, version 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

3. Results

3.1 Cortisol and incidence of psychological stress

Higher concentrations of cortisol were found in 42% of the subjects. Interestingly, the same subjects reported higher scores of stress in the ISSL whereas subjects with lower concentrations of cortisol reported no or little incidence of stress (Figure 1). For psychological stress assessment, subjects completed the ISSL. Data revealed that 45% of the executives investigated experience some sort of stress. No subject reported symptoms related to the exhaustion phase. However, 79% of them were in the resistance phase (Figure 2). Only five subjects were identified in the alarm phase (9%). We decided to exclude from the cognitive assessment subjects identified in the alarm phase because this phase is related to symptoms experienced during the last 24 hours and as such it would not reflect chronic exposure to adverse psychological stressors. With respect to the most frequently reported symptoms of stress, 82% of subjects claimed to experience more psychological than physical manifestations of stress. The most common identified symptoms were irritability, doubts about oneself, emotiveness and diminished libido. Also, more women (47%) than men (44%) were identified as experiencing stress. No difference was found in relation to age.

3.2 Influence of chronic psychological stress on cognitive performance

The Stroop Color-Word Test was applied to evaluate selective attention and reaction time. Stress significantly impairs the quality of response independent on the phase of stress. We did not observed any difference between the stressed and non-stressed group for reaction time during the congruent stimulus (Color Task). However, stressed subjects made significantly more mistakes than non-stressed subjects (Figure 3a). During the incongruent stimulus (Color-Word task), stressed

subjects took longer to complete the task and also made more mistakes than non-stressed subjects (Figure 3b).

3.3 Reactivity of salivary alpha-amylase towards acute stressor test

Baseline values for sAA activity did not differ between stressed and non-stressed subjects before the Stroop test. After the Stroop test, the non-stressed group showed a significantly increased of sAA. However, a lower reactivity of sAA was seen in the stressed group after the test. Interestingly, the lowest reactivity of sAA was observed in the group of subjects within the almost-exhaustion when compared to non-stressed subjects (Figure 4).

4. Discussion

Through ISSL, we verified that almost half of the executives investigated experienced some sort of stress. Data from the International Stress Management Association in Brazil (ISMA-BR) corroborated that nearly 30% of office workers suffer from stress or burnout (Rossi et al. 2005). These data are in accordance with another study with Israeli employees from the private, public, and third sectors that showed that characteristics of the working environment such as corporate policies, competitiveness and the responsibility to achieve goals are likely stress-inducing factors that affect executives (Vigoda 2002). Other studies have also shown a higher frequency of psychological rather than physical symptoms in working environments with low tolerance to frustration, mood swings and anger as typical traits of stress (Quick et al. 2003) and women as a more vulnerable population (Lundberg and Franenhaeuser 1999).

The higher concentration of cortisol in the phases of resistance and almost-exhaustion suggests hyperactivation of the HPA axis. Glucocorticoids released from the adrenal cortex are required to resist the stressor, but are also responsible for the pathological changes characteristic of the almost-exhaustion phase (Goldstein 2010; Smith 2008). Other studies have found similar increases in cortisol in subjects with overcommitment to work (Wirtz et al. 2010) and lack of control at work (Kunz-Ebrecht et al. 2004). Physiological rather than psychological

adverse conditions, such as asthma (Wolf et al. 2008), rheumatoid arthritis (Imrich and Rovinsky 2010) and atopic dermatitis (Buske-Kirschbaum et al. 2002) also lead to variations in the concentration of cortisol.

Variations in sAA towards acute stressors are now well-accepted as a surrogate marker of autonomic activity (Granger et al. 2007; Nater and Rohleder 2009). In our study, we observed an increase in the activity of sAA after a cognitive acute stressor only in non-stressed subjects. This is in line with previous studies with healthy subjects in which an increase in the activity of sAA was reported after a video of corneal transplant surgery (Takai et al. 2004), arithmetic tasks (Goi et al. 2007), memory test (Bosch et al. 2003) and skydiving (Chatterton et al. 1997).

Most studies so far have either assessed the kinetics of cortisol and sAA in response to a broad range of stressors or compared their dynamics between subjects suffering from diverse chronic stress associated with diseases. In the other hand, Bellingrath and Kudielka (2008) reported that chronic stress in healthy schoolteachers is associated with HPA axis hyporeactivity to acute psychosocial stressor (TSST), but the ANS responses were not evaluated. To our knowledge, our study is the first to determine the reactivity of sAA towards a cognitive acute stressor in chronic stressed healthy executives.

To date, no information is available regarding the relation between the HPA axis and the ANS. It is clear however, that both the HPA axis and the ANS show markedly different responses to acute stress (Kivlighan et al. 2005, Kivlighan and Granger 2006). Here, we show that subjects who are chronically exposed to stress obtained inferior scores of performance with a lower reactivity in sAA during a cognitive task. This suggests an interaction, yet with opposite dynamics (higher cortisol vs. lower sAA) of the response to stress between the HPA axis and the ANS. It has been proposed that a higher concentration of cortisol may induce alterations in the sensitivity to catecholamines (Tanno and Marcondes 2002). Hence and although speculative, long-term exposition to an stressor, in this case represented by work-related demands, might in fact result in a lower reactivity of the ANS. This, on the other hand, has also important repercussions on cognitive performance. In our study, subjects with higher concentrations of cortisol and higher scores of perceived stress also scored lower during the Stroop test. This

impairment in cognitive performance might be attributed to the results of the lower reactivity of the ANS.

A considerable body of research has also demonstrated that elevated concentrations of cortisol have negative effects on cognitive function and memory consolidation (Gomez et al. 2009; de Kloet 2000; McEwen 2000; Brown et al. 2004). Hsu and colleagues (2003), for instance, administered a unique dose of either hydrocortisone or placebo to healthy subjects before submitting them to the Stroop test and reported inferior scores in those subjects who received the drug. Possible mechanisms for such alterations include a modified gene expression in pivotal areas of the brain involved in learning, behavior, language and memory induced by long-term exposure to glucocorticoids (Jöels 2001; Lupien and Lepage 2008).

In conclusion, chronic psychological stress associated with higher levels of cortisol impairs cognitive performance in business executives. Long-term exposure to stress may lead to a desensitization of adrenoceptors compromising ANS reactivity and thus selective attention. Our data suggest an interaction of the HPA axis and the ANS where the hyperactivation of the former can cause the deactivation of the latter.

Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG for its support (grant nº. APQ 01347/08). T.S., M.D. and O.B. were recipient of CNPq fellowships. We are grateful to participants for their involvement, compliance and understanding towards the instructions given throughout the study. Thanks are also due to Ms. Aparecida Maria de Souza Borges Cruvinel for her support during collection of data.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Bellingrath S and Kudielka BM. 2008. Effort-reward-imbalance and overcommitment are associated with hypothalamus—pituitary—adrenal (HPA) axis responses to acute psychosocial stress in healthy working schoolteachers. *Psychoneuroendocrinology* **33**:1335-1343.
- Bosch JA, de Geus EJ, Veerman EC, Hoogstraten J, Amerongen AV. 2003. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosomatic Medicine* **65**:245-258.
- Brown SE, Woolston JD, Frol A, Bobadilla L, Khan DA, Hanczyc M, Rush AJ, Fleckenstein J, Babcock E, Cullum CM. 2004. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. *Biological Psychiatry* **55**:538–545.
- Buske-Kirschbaum A, Geiben A, Höllig H, Morschhäuser E, Hellhammer D. 2002. Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**: 4245-4251.
- Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu YC, Hudgens GA. 1997. Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**:2503–2509.
- de Kloet ER. 2000. Stress in the brain. *European Journal of Pharmacology* **29**:1-3.
- Faragher EB, Cass M, Cooper CL. 2005. The relationship between job satisfaction and health: a meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine* **62**:105–112.

Fries E, Dettenbom L, Kirschbaum C. 2009. The cortisol awakening response (CAR): Facts and future directions. *International Journal of Psychophysiology* **72**: 67–73.

Goi N, Hirai Y, Harada H, Ikari A, Ono T, Kinae N, Hiramatsu M, Nakamura K, Takagi K. 2007. Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. *The Journal of Toxicological Sciences* **32**:121-127.

Goldstein DS. 2010. Adrenal Responses to Stress. *Cellular and Molecular Neurobiology* **30**:1433–1440.

Gomez RG, Posener JA, Keller J, Debattista C, Solvason B, Schatzberg AF. 2009. Effects of major depression diagnosis and cortisol levels on indices of neurocognitive function. *Psychoneuroendocrinology* **34**:1012-1018.

Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibel LC, Schwartz EB, Whembolua GL. 2007. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens. *Physiology & Behavior* **92**:583-590.

Hsu FC, Garside MJ, Massey AE, McAllister-Williams RH. 2003. Effects of a single dose of cortisol on the neural correlates of episodic memory and error processing in healthy volunteers. *Psychopharmacology* **167**:431–442.

Imrich R and Rovensky J. 2010. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. **36**:721-727.

Jöels M. 2001. Corticosteroids actions in the hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology* **13**:657-669.

Kivlighan KT, Granger DA, Booth A. 2005. Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. *Psychoneuroendocrinology*. **30**:58-71.

Kivlighan KT and Granger DA. 2006. Salivary alpha-amylase response to competition: relation to gender, previous experience, and attitudes. *Psychoneuroendocrinology*. **31**:703-14.

Kunz-Ebrecht SR, Kirschbaum C, Steptoe A. 2004. Work stress, socioeconomic status and neuroendocrine activation over the working day. *Social Science & Medicine* **58**:1523–1530.

Lipp MEN. 2000. *Manual do Inventário de Sintomas de Stress para adultos*. São Paulo: Casa do Psicólogo, pp 1-40.

Loeppke R, Taitel M, Haufle V, Parry T, Kessler RC, Jinnett K. 2009. Health and productivity as a business strategy: a multiemployer study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **51**:411-28.

Loerbroks A, Gadinger MC, Bosch JA, Stürmer T, Amelang M. 2010. Work-related stress, inability to relax after work and risk of adult asthma: a population-based cohort study. *Allergy* **65**:1298-1305.

Lundberg U. 1999. Coping with Stress: Neuroendocrine Reactions and Implications for Health. *Noise & Health* **1**:67-74.

Lundberg U and FRANENHAEUSER M. 1999. Stress and workload of men and women in high-ranking positions. *Journal of Occupational Health Psychology* **4**:142-151.

Lupien SJ and Lepage M. 2008. Stress, memory and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behavioral Brain Research* **127**:137-158.

MacLeod CM. 1991. Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review. *Psychological Bulletin* **109**:163-203.

McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* **886**:172-189.

Nater UM and Rohleder N. 2009. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology* **34**:486-496.

Proctor GB and Carpenter GH. 2007. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* **133**:3–18.

Quick JC, Cooper CL, Gavin JH, Quick JD. 2003. *Managing Executive Health: Building Strengths, Managing Risks*. Cambridge: Cambridge University Press.

Renaud P and Blondin JP. 1997. The stress of stroop performance: physiological and emotional responses to color – word interference task pacing, and pacing speed. *International Journal of Psychophysiology* **27**:87-97.

Rossi AM, Perrewé PL, Sauter SL. 2005. *Stress and quality of working life: current perspectives in occupational health*. São Paulo: Atlas.

Schoofs D, Preub D, Wolf OT. 2007. Psychosocial stress induces working memory impairments in an n-back paradigm. *Psychoneuroendocrinology* **33**:643–653.

Seyle HA. 1936. Syndrome produced by diverse nervous agents. *Nature* **148**:22.

Smith GP. 2008. Unacknowledged contributions of Pavlov and Barcroft to Cannon's theory of homeostasis. *Appetite* **51**:428–432.

Stroop JR. 1935. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology* **18**:643–663.

Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. 2004. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Archives of Oral Biology* **49**:963-968.

Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. 2007. Gender-specific differences in salivary biomarker responses to acute psychological stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1098**:510-515.

Tanno AP and Marcondes FK. 2002. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **38**:273-289.

van Stegeren AH, Wolf OT, Kindt M. 2008. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. *International Journal of Psychophysiology* **69**:33–40.

Vigoda E. 2002. Stress-related aftermaths to workplace politics: the relationships among politics, job distress, and aggressive behavior in organizations. *Journal of Organizational Behavior* **23**:571-591.

Wirtz PH, Siegrist J, Schuhmacher A, Hoefels S, Maier W, Zobel AW. 2010. Higher overcommitment to work is associated with higher plasma cortisol but not ACTH responses in the combined dexamethasone/CRH test in apparently healthy men and women. *Psychoneuroendocrinology* **35**:536-543.

Wolf JM, Nicholls E, Chen E. 2008. Chronic stress, salivary cortisol, and alpha-amylase in children with asthma and healthy children. *Biological Psychology*. **78**:20-28.

Yamaguchi M, Wakasugi J, Sakakima J. 2006. Evaluation of driver stress using biomarker in motor-vehicle driving simulator. *Conference Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* **1**:1834-1837.

Zalonis J, Christidi F, Bonakis A, Kararizou E, Triantafyllou NI, Paraskevas G, Kapaki E, *et al.* 2008. The Stroop Effect in Greek Healthy Population: Normative Data for the Stroop Neuropsychological Screening Test. *Archives of Clinical Neuropsychology* **24**:81-88.

Figures

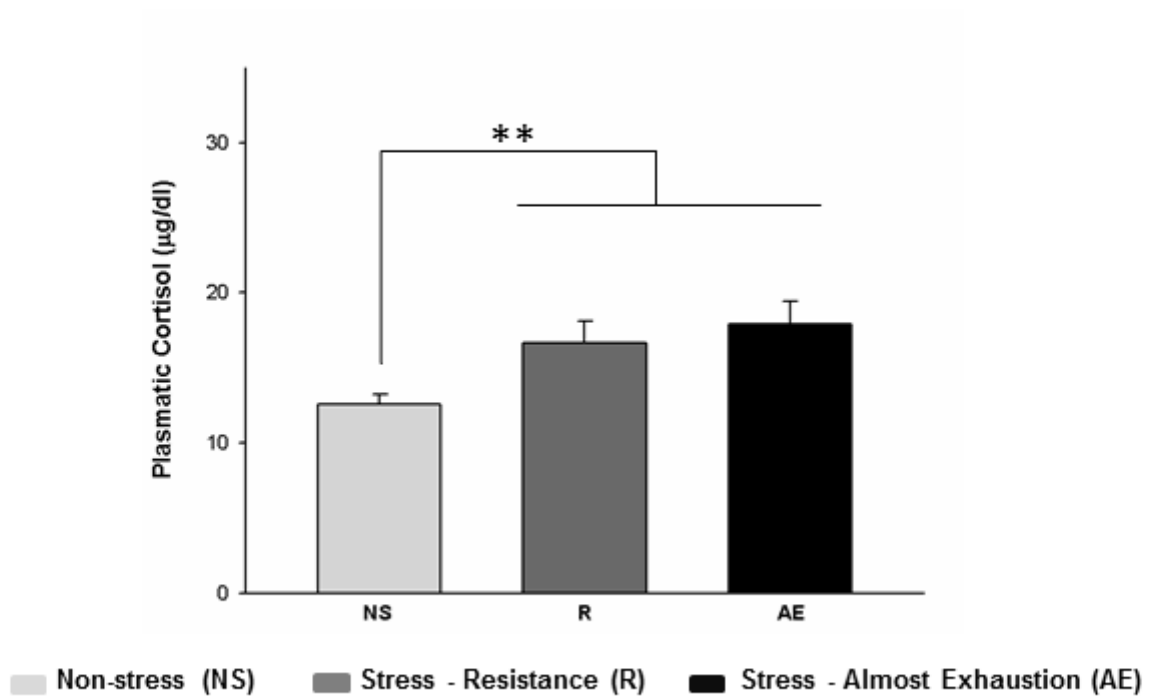


Figure 1. Serum cortisol in stressed and non-stressed subjects. (**) Indicates significant differences vs. control group. Resistance phase of stress (R), $p = 0.006$, and Almost-Exhaustion phase of stress (AE), $p = 0.009$. The values are expressed as means $\pm$ SEM.

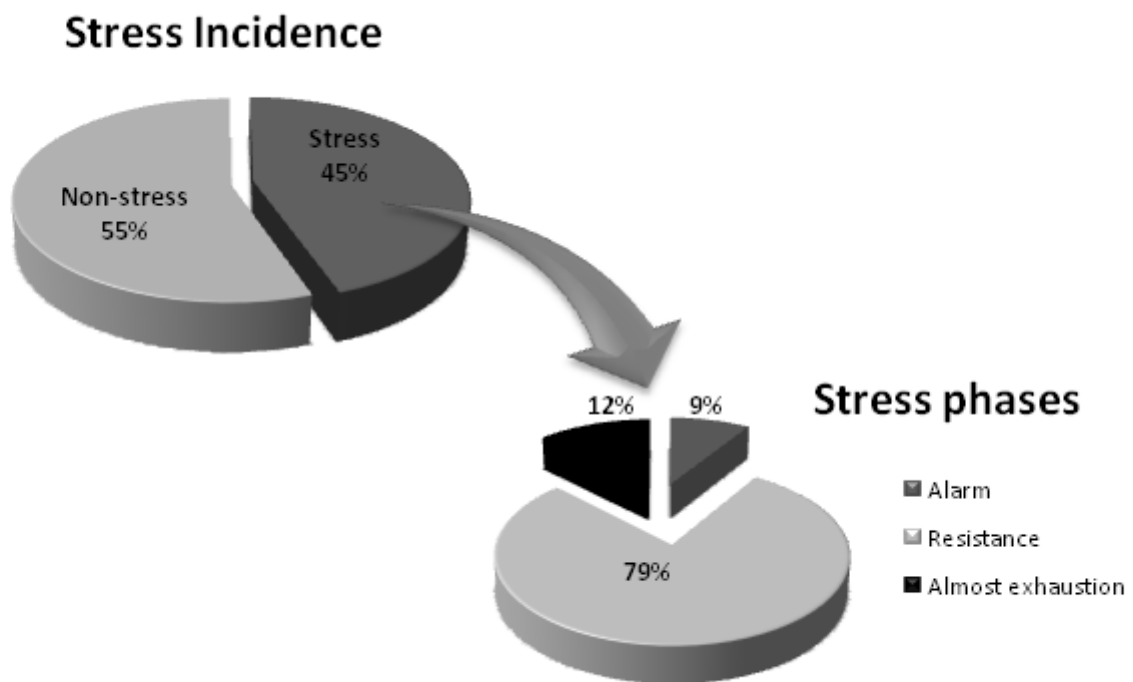


Figure 2. Incidence of Stress in executives assessed by means of Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults (ISSL).

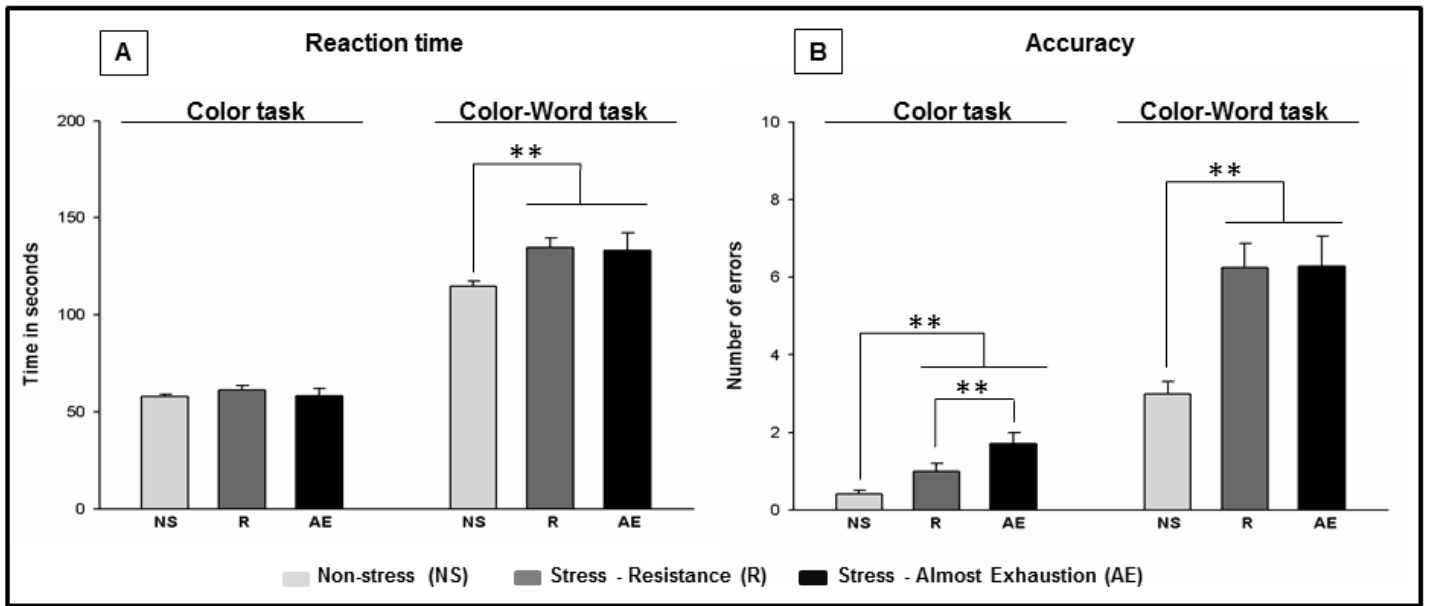


Figure 3. Cognitive performance of stressed and non-stressed subjects on the Stroop Color-Word Test. **A.** Reaction time in Color task and Color-Word task. (**) Indicates significant differences vs. control group. Resistance phase of stress (R), $p < 0.001$, and Almost-Exhaustion phase of stress (AE), $p = 0.023$. **B.** Accuracy of responses between stressed and non-stressed subjects in both tasks of Stroop test. (**) Indicates significant differences vs. control group. Color task: (R), $p = 0.006$, and Almost-Exhaustion phase (AE), $p = 0.029$. There was significant differences in (R) vs. (AE), $p = 0.024$. Color-Word task: (R), $p < 0.001$, and (AE), $p = 0.009$. The values are expressed as means $\pm$ SEM.

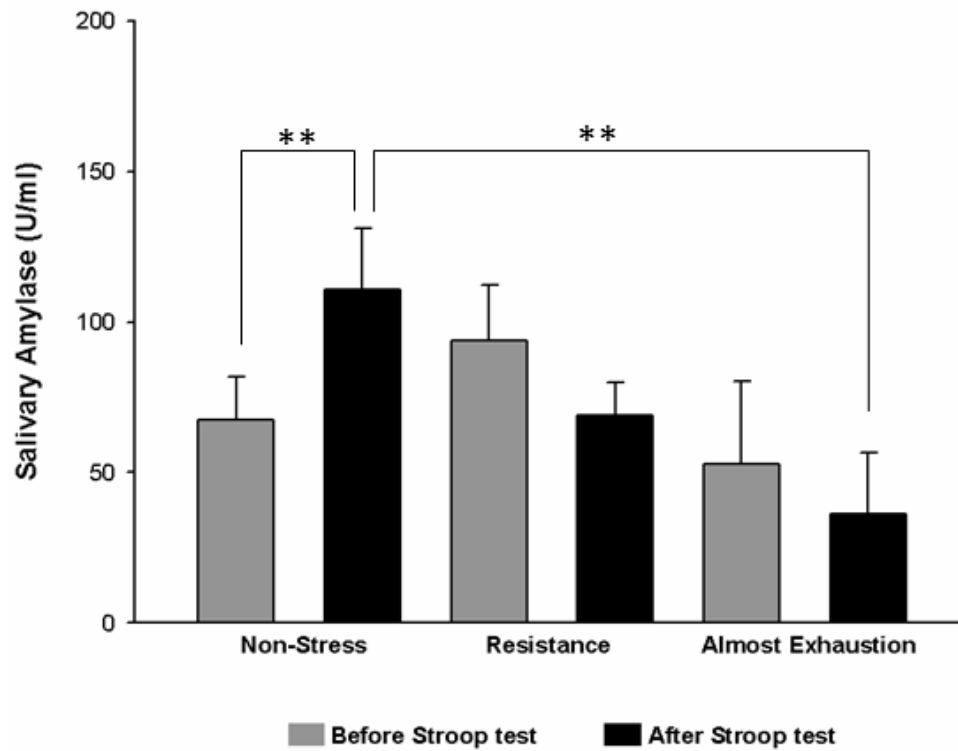


Figure 4. Reactivity of salivary amylase in stressed and non-stressed subjects before and after the Stroop test. (**) Indicates significant differences vs. control group. Non-stress (NS) after Stroop Test, $p = 0.043$, and Almost Exhaustion phase of stress (AE) after Stroop Test, $p = 0.040$. The values are expressed as means $\pm$ SEM.