

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FMUC



Avaliação Morfofuncional num Modelo Experimental de Movimentos Mastigatórios Parafuncionais

Júlio André Ramalho da Fonseca

Coimbra 2013

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Avaliação Morfofuncional num Modelo
Experimental de Movimentos Mastigatórios
Parafuncionais**

Júlio André Ramalho da Fonseca

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não se responsabiliza relativamente à doutrina e à forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 1931, Art. 108, § único).

Orientador:

Professora Doutora Maria João Rodrigues

Co-orientador:

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Trabalho realizado no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sob orientação do Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita.

Aos meus pais
Jorge e Alzira
pelos afectos, pela confiança.
Aos meus avós
Júlio e Celeste
pelos inestimáveis valores que me transmitiram.

À Francisca
por todo o passado
pelo futuro diante de nós.

Agradecimentos

Este trabalho é, inegavelmente, o resultado do esforço de várias pessoas. Gostaria, por isso, de exprimir-lhes aqui o meu sincero reconhecimento e desculpar-me aos que, por esquecimento, não citei.

À minha orientadora, a Senhora Professora Doutora Maria João Rodrigues, pelo apoio e sabedoria disponibilizados na elaboração deste trabalho. Reconheço com gratidão o valor dos preciosos conhecimentos científicos que me transmitiu e daqueles que certamente será capaz de transmitir na realização das perspectivas futuras deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Senhor Professor Doutor António Cabrita, por toda a disponibilidade, experiência, determinação e ajuda bem como pelos seus valiosos conhecimentos e ensinamentos.

Ao Professor Frederico Pereira pelo estímulo e incentivo bem como pela colaboração na área farmacológica do estudo.

Ao Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e a todos os professores e funcionários que deste fazem parte, por todos os ensinamentos e por todo o carinho e amizade, durante estes anos.

A todos os colegas da Reabilitação Oclusal, Fisiologia do Aparelho Estomatognático, e Prostodontia Fixa pela forma como compreenderam e colmataram a minha momentânea menor disponibilidade.

Às Dr^{as} Liliana Costa Santos e Diana Gonçalves, minhas colegas e amigas, por terem sido incansáveis neste longo e contínuo processo. Pelo seu apoio e imprescindível colaboração.

À Dra. Júlia Cabete e à Dra. Daniela Abreu, pelo apoio precioso fornecido no tratamento estatístico dos resultados da experiência.

Ao Professor Doutor Fernando Guerra, pelo estímulo contínuo e amizade.

Ao Professor Doutor Pedro Nicolau, pelo apoio dado ao longo destes anos, pela sua dedicação às causas que abraça e sincera amizade.

À Senhora Professora Doutora Maria Helena Figueiredo, pela sua generosidade, bondade e grande amizade.

Ao Dr. Fernando Mendes pelas críticas que sempre me teceu. Pelo apoio, motivação, compreensão e sobretudo, inestimável amizade.

A todos aqueles que, tendo sido meus professores, me inculiram prazer pela Medicina Dentária, cultura científica e, por último e acima de tudo, se tornaram meus mestres e amigos: Professora Doutora Isabel Poiães Batista, Professor Doutor João Carlos Ramos, Professor Doutor Sérgio Matos, Dr. João Paulo Tondela e Dr. Francisco Marques.

Ao Dr. Salomão Rocha e ao Gonçalo, à Dr^a. Alexandra Vinagre e ao João Pedro: pela amizade, pelo apoio, camaradagem, pela partilha duma aventura em tempos de crise e por tudo aquilo diante de nós.

Às Dr^{as} Joana Coutinho e Bruna Gomes pelo apoio na realização do protocolo experimental.

Ao Dr. António Neves e a todos os técnicos do Laboratório de Análises Clínicas AVELAB pela colaboração indispensável neste trabalho.

A todos os elementos do Instituto de Patologia Experimental da FMUC, nomeadamente o Dr. Tiago Mendes, o Dr. Rodrigo Farinha, a Dr^a Rute Figueiredo, a Dr^a Margarida Meneses e o Dr. Gustavo Barandas, pela preciosa ajuda prestada na elaboração e execução da experiência.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Dentária que sempre estiveram disponíveis para a resolução de questões que surgiram ao longo deste percurso.

A todos os que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a realização deste trabalho o meu sincero obrigado.

À minha família, pais e irmão pelo amor e compreensão, fazendo com que esta tese também lhes pertença.

Aos meus grandes amigos, porque souberam compreender a minha ausência e aliviaram o peso das saudades.

Recomeça....
Se puderes
Sem angústia
E sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.

E, nunca saciado,
Vai colhendo ilusões sucessivas no pomar.
Sempre a sonhar e vendo
O logro da aventura.
És homem, não te esqueças!
Só é tua a loucura
Onde, com lucidez, te reconheças...

Miguel Torga

Sumário

Agradecimentos

Sumário

A-Introdução / Revisão Bibliográfica

B-Estudo Experimental em Modelo com Animais

1. Objectivos
2. Estudo *in vivo*
3. Resultados
4. Discussão
5. Conclusão

C-Resumo

D-Bibliografia

E-Anexos

Índice

Parte A

Introdução

1- AS DISFUNÇÕES TEMPORO-MANDIBULARES

O passado histórico do estudo e compreensão das Disfunções Temporomandibulares (DTM) está repleto de controvérsias, muitas das quais ainda hoje persistem. As Disfunções Temporomandibulares são consideradas um grupo heterogéneo de distúrbios psicofisiológicos do sistema estomatognático¹⁻². Estas abrangem um largo espectro de problemas clínicos musculares, esqueléticos ou ambos.³⁻⁶ Iniciam-se frequentemente por dor, sons articulares e limitação da função/movimento mandibular, sendo considerados um dos principais factores causais de dor orofacial não-dentária.⁷

Em virtude de vários componentes do sistema mastigatório serem afectados por esta patologia é fundamental que o médico dentista efectue um correcto diagnóstico, bem como um adequado tratamento.⁷

A prevalência das DTM's ronda os 6 a 12% da população adulta,^{4,8} sendo duas vezes mais prevalente no sexo feminino do que no masculino. Inicialmente, as variações da prevalência das DTM's entre géneros foram atribuídas a factores psicossociais (como por exemplo o facto de as mulheres procurarem ajuda médica dentária mais frequentemente do que os homens).⁷ As razões pelas quais este dimorfismo sexual ocorre permanecem ainda por esclarecer completamente.⁴

Os sinais e sintomas das DTM's podem ser encontrados em todos os grupos etários. Não querendo obviamente generalizar, inicialmente alguns autores supunham que esta patologia apenas afectava adultos contudo, estudos epidemiológicos recentes referiram que a presença de sinais e sintomas em crianças e adolescentes era tão frequente como em adultos.¹⁻² Posteriormente, outros autores referiram que a DTM se desenvolve na infância, aumenta em prevalência e severidade na adolescência e depois, contrariamente ao que poderia ser esperado, os seus sinais e sintomas diminuem na idade avançada.⁵⁻⁷ Manfredinni, em 2010, analisou o diagnóstico de 199 pacientes segundo o Research Diagnostic Criteria (RDC/TMD). O autor conseguiu enunciar 2 grupos distintos com picos etários bem identificados considerando a distribuição etária em função do diagnóstico através do RDC: um primeiro grupo de pacientes com deslocamentos do disco sem alterações degenerativas (com idade média de 32.7±14.5 anos) e um segundo grupo com sinais e sintomas de distúrbios articulares inflamatórios (com idade média de 54.2±15.1 anos).⁹ Em termos globais as DTM's apresentam, segundo este estudo e considerando todos os pacientes analisados, um pico aos 39.7 anos, decrescendo depois com a idade.⁹

A etiologia precisa das DTM's, sendo um tópico controverso na comunidade científica,⁵ permanece desconhecida.^{3, 10} Contudo, a maioria dos autores concorda que as DTM apresentam uma etiologia multifactorial. Vários estudos identificaram factores locais e sistémicos como sendo de risco para a doença.^{8, 11}

Etiologicamente existe uma inter-acção funcional entre factores neuromusculares, fisiológicos, relativos à oclusão e anatomia da Articulação Temporo-Mandibular (ATM)^{10, 12} e psicológicos⁷, sendo desconhecido qual destes o predominante.⁵

Assim sendo os factores etiológicos podem ser divididos em três grandes grupos⁷:

- Factores predisponentes, os quais podem ser sistémicos (saúde geral do individuo, genéticos), psicológicos (personalidade e comportamento) ou estruturais (factores oclusais e articulares);
- Factores precipitantes (tais como o trauma, a sobrecarga funcional e as parafunções);
- Factores perpetuantes (como por exemplo problemas comportamentais, sociais e emocionais, bem como outras formas de stresse e a saúde geral).

Os sinais e sintomas das DTM's tornam-se frequentemente crónicos e perduram depois do factor precipitante ocorrer. Assim sendo, de entre estes factores etiológicos, os perpetuantes podem ser ainda mais importantes do que os precipitantes.⁷

A controvérsia gerada em torno do papel dos factores oclusais na patogénese das DTM's está longe de terminar. Contudo, apesar da importância dos factores oclusais não ser tão grande quanto se pensava, não se pode excluir totalmente este factor.⁷

Os hábitos parafuncionais como o bruxismo, onicofagia e sucção não-nutritiva, entre outros, são também considerados factores contributivos para a manifestação das DTM's.⁵ Contudo, a relação entre hábitos orais parafuncionais e as DTM's, se de facto existir, é controversa e pouco clara.⁵ Laskin no seu estudo, referiu a hiperactividade muscular, causada por hábitos orais contínuos e prejudiciais, como a principal causa de DTM. Referiu também que a fadiga muscular causava espasmos, provocando alterações temporo-mandibulares, as quais, por sua vez, originavam alterações na oclusão normal, deformação articular e alterações musculares, conduzindo a doença orgânica.¹³ Pode-se afirmar, deste modo, que esta patologia influencia negativamente a qualidade de vida dos pacientes.⁴

Tem sido sugerido que diversos agentes stressantes do meio envolvente podem estar relacionados com o agravamento ou com o início das DTM's.⁸ O despoletar ou o agravar das DTM's encontra-se frequentemente relacionado com agentes stressantes ambientais, tão prevalentes noutras condições induzidas por stress ou em condições somáticas idiopáticas, como a fibromialgia.

Ao longo dos anos têm sido atribuídos muitos sintomas subjetivos às DTM's, tais como fadiga muscular, dor oro-facial em repouso e em movimento, ruídos articulares, cefaleias, limitação de abertura bucal e dos movimentos mandibulares.^{5, 14, 7} Outros factores relacionados com este tipo de disfunção são as dores de origem dentária, o ardor bucal, as vertigens e os zumbidos.⁷ Artralgias, osteoartrite, osteoartrose e deslocamentos do disco estão também frequentemente presentes.⁴

Nas DTM's os factores psicossociais e emocionais têm sido enfatizados, pois tem sido descrita uma associação entre estes e as DTM's. Assim sendo, é necessário efectuar uma avaliação de factores comportamentais, emocionais e sociais relacionados à actual condição do paciente.⁷

2- BRUXISMO

2.1- Definição de Bruxismo

O Bruxismo é um hábito oral, normal ou com características parafuncionais, muito comum, mas também potencialmente prejudicial para as estruturas estomatognáticas.¹⁵⁻¹⁶ Apesar de não colocar em risco a vida, pode influenciar a qualidade desta, especialmente por poder originar problemas dentários e dor oro-facial.^{17 18-19}

O termo bruxismo deriva da palavra grega *Brychein*, que significa pressionamento, fricção ou atrito entre as arcadas.²⁰⁻²¹ O termo "la bruxomanie" foi introduzido pela primeira vez em 1907, por Marie Pietkiewicz.^{17, 22-24} Foi adoptado posteriormente o termo "bruxismo" para descrever o apertar ou ranger de dentes que ocorre sem um propósito funcional.²⁴

A definição de bruxismo tem evoluído ao longo dos tempos. Actualmente, na literatura médica geral, é considerado um hábito oral voluntário ou involuntário, consciente ou inconsciente, que pode ocorrer durante a vigília ou durante o sono, de carácter rítmico ou espasmódico,¹⁷⁻¹⁸ de *clenching* (pressionamento inter-arcadas), *gnashing* e *grinding* (raspar e ranger dentário).^{5, 16-19, 25-31}

Apesar da fisiopatologia do bruxismo ser uma questão complexa e controversa,^{16, 32} é hoje consensual entre vários autores que a sua etiologia é multifactorial e a sua regulação central.^{5, 15-16, 24, 32-41}

Desconhecem-se quais os mecanismos responsáveis pela evolução do bruxismo de uma condição normal para uma patológica, contudo acredita-se que certos factores como doenças, ingestão de álcool e drogas, condições relativas à personalidade e eventos stressantes possam estar implicados.¹⁹

O Bruxismo é normalmente definido como uma entidade patológica unitária contudo, encontra-se subdividido em diurno e nocturno.^{5, 16, 18} Diversas áreas como a medicina do sono e a psicofisiologia sugerem definições para o bruxismo. Contudo, a medicina dentária permanece a mais persistente na tentativa de o definir, apesar de continuarem a existir inconsistências relativas ao facto de ser um acto involuntário ou mesmo uma parafunção.^{17, 42}

Existe também alguma divergência na literatura sobre quais as actividades parafuncionais que verdadeiramente constituem o bruxismo. São vários os estudos que pretendem demonstrar que pacientes que apresentam bruxismo nocturno expressam também outros distúrbios do movimento para além do apertar ou ranger de dentes.²³

A *American Association of Sleep Medicine (AASM)* define-o também como uma parassónia com um movimento estereotipado, caracterizada pelas contracções repetitivas ou sustentadas dos músculos mastigadores, com ranger dentário.⁴² Para além de ser uma patologia dentária frequentemente observada, representa uma condição psicofisiológica de grande relevância,⁴³ podendo ser considerado também como um distúrbio do sono.⁴⁴

A sua etiologia permanece controversa contudo a hipótese multifactorial reúne algum consenso na literatura. Têm sido sugeridos factores etiológicos com origem local, sistémica, psicológica, ocupacional, hereditária, idiopática ou factores relacionados com distúrbios do sono e parassónias.^{10-14, 16, 32, 37-38, 45-50} Embora historicamente as interferências oclusais tenham sido implicadas como principal factor etiológico actualmente existe um amplo consenso em torno do papel do stress emocional na etiologia do bruxismo.^{10, 22, 30, 51-52} Assim, ao longo das últimas duas décadas, a maioria dos autores sugere uma etiologia central para o bruxismo, implicando uma mudança conceptual de periférica (ou seja, oclusal) para regulação central (ou seja, stress, personalidade, emoção).^{16, 32, 36, 41, 53-54} Os estudos realizados durante a última década têm focado a sua investigação na análise de factores relativos ao sistema nervoso central (SNC)^{23, 32} (sugerem uma desregulação na neurotransmissão da dopamina³³), demonstrando que os factores centrais desempenham um importante papel no

desenvolvimento do bruxismo.^{5, 16, 18, 33, 35} Contudo, não é de descartar a hipótese de que o bruxismo possa ser influenciado por factores periféricos.^{33, 35, 40, 44}

As suas consequências são várias e estão relacionadas com a intensidade, frequência e duração da actividade parafuncional. Podem ser musculares (dor, hipertrofia, aumento do tónus e rigidez à palpação), dentárias (originando desgaste, mobilidade, fracturas e danos periodontais) e articulares (dor, desconforto ou distúrbios na articulação temporo-mandibular).^{18, 28, 44} O bruxismo pode, com o evoluir da patologia, transformar a dor aguda em crónica, causando incapacidade e stresse físico e psicológico.¹⁹ É considerado um factor de risco para as disfunções temporo-mandibulares e, em particular, para a dor miofascial.¹⁵

As definições de bruxismo referentes às diversas áreas da medicina dentária, medicina do sono e psicofisiologia ainda apresentam limitações. As principais consistem no facto das definições incluírem termos como “parafunção” e “involuntário”, questões essas que ainda não estão bem documentadas ou não reúnem um amplo consenso na literatura.⁴²

2.2- Prevalência do Bruxismo

O bruxismo é uma condição muito comum na população geral, embora existam muitos dados conflituosos na literatura relativamente à sua prevalência.⁵⁵ Esta diferença pode estar relacionada com o facto dos critérios de inclusão nos estudos serem diferentes, nomeadamente em relação às populações estudadas e aos critérios de diagnóstico utilizados.¹⁸

Visto os estudos epidemiológicos serem baseados em populações e metodologias diferentes, a prevalência exacta do bruxismo nocturno na população é imprecisa e subestimada. Por exemplo, o relato de indivíduos que dormem sozinhos e não têm consciência dos sons produzidos durante o seu sono, pode ser diferente dos questionários preenchidos por portadores ou familiares com diferentes definições clínicas e sintomatologia.^{18, 55}

Em relação à idade, as crianças apresentam uma taxa de prevalência elevada contudo, Lavigne, em 1994, referiu a diminuição dos episódios de bruxismo com a idade.^{17, 36} Esta patologia surge na adolescência, com uma prevalência de 14% a 20%, a qual diminui ao longo dos anos.⁵⁶ Entre os 18 e 29 anos de idade a prevalência diminui para 13%.⁵⁷ Nos adultos, varia entre 5% a 8%^{3, 58-59} (sendo que 20% desta percentagem corresponde ao tipo cêntrico e 6% ao tipo excêntrico³⁹) e a partir dos 60 anos de idade é de 3%.^{57, 60} Contudo, a prevalência na população idosa poderá ser maior que a estimada, pois as próteses em acrílico poderão diminuir os sons de ranger dentário.^{57, 60}

Muitos autores não relatam quaisquer diferenças entre géneros para a ocorrência do bruxismo.^{10, 37, 43, 57, 61 62} Outros autores referem uma maior predominância desta patologia no sexo feminino.^{10, 37, 43}

Relativamente aos diferentes tipos de bruxismo, o bruxismo nocturno apresenta uma prevalência de cerca de 8%, enquanto o diurno tem, aproximadamente, uma prevalência descrita de 20%.³⁶ Em relação ao bruxismo diurno, alguns autores afirmam que este ocorre predominantemente no género feminino, enquanto o bruxismo nocturno não apresenta diferenças entre os géneros.¹⁷

2.3- Classificação do Bruxismo

Até há bem pouco tempo, as teorias sobre a etiologia do bruxismo falhavam em distinguir os seus diversos tipos. Actualmente esta divisão é mais clara.⁶³ De acordo com a classificação utilizada, podemos descrever diversos tipos de bruxismo. Embora, geralmente, referido como uma entidade nosológica única, pode ter etiologias diferentes bem como sofrer a influência de diferentes factores locais e sistémicos.¹⁶ Deste modo é uma patologia acompanhada de sinais e sintomas diversos que podem dificultar o diagnóstico.³⁸

De acordo com os movimentos realizados, o bruxismo pode ser classificado como cêntrico e excêntrico. No primeiro caso, a força de mordida ocorre em posição cêntrica (na posição de intercuspidação máxima), sem movimentos laterais ou protrusivos significativos, sendo também denominado por pressionamento inter-arcadas. No caso do bruxismo excêntrico ocorre ranger dentário em posições excêntricas, laterotrusivas ou lateroprotrusivas, em função das guias excêntricas presentes.²⁵

De acordo com a existência ou não de ranger dentário, esta condição pode ser dividida em audível ou inaudível, respectivamente.^{18, 43}

O bruxismo é também frequentemente classificado como bruxismo da vigília (ocorre quando o indivíduo está acordado) ou bruxismo nocturno (mais correctamente denominado bruxismo do sono (BS), pois surge quando a pessoa se encontra a dormir o que, obviamente, poderá não ocorrer apenas durante o período da noite).^{34, 43} O bruxismo do sono é considerado um factor etiológico importante em diversas condições musculares e da articulação temporo-mandibular (ATM). Foi classificado pela *American Association of Sleep Disorders* como um conjunto de movimentos estereotipados que ocorrem durante o sono,

caraterizados por ranger dentário e/ou apertamento inter-arcadas,^{38, 18,39, 59} e uma doença de movimento relacionada com o sono.^{38, 62, 64-66}

Considera-se uma função normal e fundamental para o equilíbrio do corpo humano, estando relacionada com funções fisiológicas, como a activação autónoma que surge durante o sono.²⁷ Pensa-se que determinados factores possam fazer com que o bruxismo transite de uma actividade normal para uma actividade patológica. São referidos como tais: doenças, medicação, factores associados à personalidade do indivíduo e agentes stressantes.⁶⁷

O bruxismo nocturno pode ser dividido de acordo com o padrão da actividade mastigatória que ocorra. Se esta for contínua e a actividade contráctil demorar mais de 2 segundos, o bruxismo denomina-se tónico. Denomina-se bruxismo fásico, se a actividade for rítmica e ocorrerem três ou mais episódios de contracção muscular a uma frequência de 1 Hz. Pode ser misto, se houver uma mistura de ambos os tipos.^{39, 43, 68} Estes dois últimos têm uma prevalência conjunta de 88%, quando avaliados por electromiografia (EMG).⁴³ Pacientes com bruxismo nocturno apresentam movimentos rítmicos com uma frequência três vezes maior à de indivíduos saudáveis, cujos números rondam os 60%.⁴³

O bruxismo nocturno pode ainda ser classificado como primário ou secundário.^{34, 62} Secundário se associado a problemas médicos variados, como doenças do foro neurológico (doença de Alzheimer e Síndrome de Rett), doenças médicas (refluxo gastro-esofágico), problemas psiquiátricos (anorexia, bulimia, entre outros), causas iatrogénicas (antidepressivos inibidores da serotonina, bloqueadores dopaminérgicos), doenças do sono (síndrome da apneia do sono, transtorno comportamental do sono REM e síndrome das pernas inquietas)^{57, 66, 69} e ingestão de drogas. Pode ser primário ou idiopático se não estiver associado a nenhuma condição patológica.^{34, 62} Este último tipo apresenta, segundo a literatura, componentes de predisposição genética, factores psicológicos, desequilíbrio ortopédico ou combinação destes factores.

Os episódios de ranger dentário no bruxismo nocturno primário ou secundário representam uma alteração do controlo motor mastigatório durante o sono. A actividade mastigatória rítmica durante o sono (AMRS) é uma manifestação episódica motora normal durante o sono, presente em pessoas com e sem bruxismo nocturno. Os surtos normais de AMRS são seguidos de ranger dentário no bruxismo nocturno primário ou secundário. Nestes casos são mais frequentes, de maior intensidade e precedidos por activação autonómica simpática e fenómenos de microdespertar no electroencefalograma de sono.⁶²

O bruxismo diurno é caraterizado por episódios de pressionamento inter-arcadas,^{16,38} realizado de forma consciente ou inconsciente e em que raramente se observa ranger

dentário.^{43,34} Alguns autores estão de acordo relativamente ao facto de que o pressionamento inter-arcadas diurno causa mais dor do que o ranger dentário no bruxismo nocturno.¹⁶ Este tipo de bruxismo pode estar associado a tiques ou a parafunções que se acredita estarem associados ao stresse do quotidiano causado por responsabilidades familiares, pressões do trabalho ou outras.^{17, 38}

As actividades oro-mandibulares incomuns e o bruxismo diurno necessitam de ser diferenciados de outros variados tipos de actividades orais. Geralmente, as actividades orofaciais normais incluem actividades como mastigar, deglutir e falar. Actividades incomuns (ou parafunções) são actividades oro-mandibulares ou movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) que podem incluir, por si só ou em conjunto, o pressionamento inter-arcadas, o ranger dentário (raramente observado durante o dia na ausência de medicação ou doenças neurológicas como a discinésia tardia), o mordilhamento da língua, lábios ou véstíbulo, pressionamento da língua contra os dentes, lambe os lábios, protruir a língua, mastigar pastilha elástica, morder objectos (como, por exemplo, cigarros, cachimbo, lápis, doces e outros instrumentos), hipersalivação ou hiperdeglutição e postura viciada da mandíbula ou da cabeça, para a frente, para trás ou lateralmente.³⁸ Alguns hábitos posturais incluem também apoiar a mandíbula com a mão ao ler.⁶³ Alguns destes hábitos são aprendidos e mantidos por reforço, outros estão relacionados com a profissão.

Ainda não se sabe se os tiques (repetição de uma actividade) e parafunções associados aos eventos stressantes do dia-a-dia estão relacionados, pois ainda há falta de evidência científica neste campo.^{17, 38}

O bruxismo diurno e o bruxismo primário durante o sono são entidades clínicas diferentes, com causas diferentes, que ocorrem em estados de consciência distintos, com diferentes etiologias e que necessitam de tratamentos diferentes.⁶²

2.4- Etiologia do Bruxismo

O bruxismo é reconhecido como um problema clínico há décadas. O número de artigos científicos que procuram desvendar os mecanismos subjacentes ao bruxismo tem aumentado muito rapidamente nos últimos anos.³² Não há, no entanto, um consenso geral na literatura sobre a definição e o diagnóstico do bruxismo o que faz com que o conjunto de artigos existentes sobre a sua etiologia seja difícil de comparar e de interpretar de forma inequívoca. As dificuldades de comparação dos artigos devem-se, essencialmente, aos diferentes critérios

de inclusão e populações estudadas, bem como aos diferentes métodos e critérios de diagnóstico do bruxismo.³²

Embora a sua fisiopatologia gere discussão,³² existe actualmente um amplo consenso relativamente ao facto da sua etiologia ser multifactorial e a sua regulação central.^{5, 15-16, 24, 32-41}

Têm sido sugeridos factores etiológicos com origem local, sistémica, psicológica, ocupacional, hereditária, idiopática ou factores relacionados com distúrbios do sono e parassónias.^{10-14, 16, 32, 37-38, 45-50} Contudo, as interferências oclusais (no passado) e o stresse emocional (actualmente) têm sido classicamente implicados como principais factores etiológicos.^{10, 22, 30, 51-52}

Numa perspectiva histórica, de entre os factores locais implicados, as interferências oclusais foram a causa mais aceite pela grande maioria dos autores,^{22, 70 71-73} embora esta hipótese não seja confirmada por outros autores,^{32, 41, 74-75} por não apresentar suporte científico. O modelo actual da etiologia do bruxismo tem como base a identificação e o estabelecimento do potencial dos factores de risco para o desenvolvimento desta condição.⁶²

Inicialmente, os autores supunham que o bruxismo estava directamente relacionado com factores oclusais.³⁴ Para Molina, os factores oclusais eram os seguintes: defeitos nas superfícies oclusais dos dentes, expansão nas restaurações de amálgama, rugosidades superficiais, interferências dos dentes inclinados, dentes supra-erupcionados, dentes posteriores superiores com torque lingual das coroas, cúspides fora do plano oclusal, pontes sem anatomia dentária correcta, contactos oclusais prematuros, mordidas topo-a-topo na região anterior e posterior, mordidas cruzadas e dentes ou restaurações fracturadas. Além destes factores, o autor salientava o baixo limiar proprioceptivo do indivíduo na percepção dos contactos prematuros e interferências oclusais, como factor etiológico importantíssimo, porém, realçando e ressaltando, sempre quando as dificuldades emocionais estivessem presentes.⁷⁶⁻⁷⁷

Para testar a hipótese da etiologia oclusal foram realizados diversos estudos, sendo o de Ramfjord,²² em 1961, um dos primeiros e dos mais citados. Este, na tentativa de reproduzir bruxismo em macacos, restaurou as superfícies oclusais dos primeiros molares inferiores com amálgama em supra-oclusão. O autor constatou electromiograficamente o aparecimento imediato de bruxismo que permaneceu até a restauração ser desgastada. Com base neste estudo, Ramfjord afirmou que as características oclusais eram as principais responsáveis pelo início do bruxismo.²² Assim para este autor o bruxismo seria um instrumento através do qual os indivíduos tentariam eliminar as interferências oclusais. Acreditava-se que as interferências causariam uma excitação mediada dos músculos elevadores da mandíbula através da

estimulação de mecanorreceptores periodontais.²² Já Jankelson produziu experimentalmente bruxismo em humanos, através da colocação de cimento acrílico nas superfícies oclusais dos molares. Sugeriu que o acto de ranger os dentes seria uma tentativa subconsciente de remover interferências e ganhar o máximo de contactos dentários.⁷⁰

Contudo, posteriormente outros autores demonstraram que a correcção de desarmonias oclusais não reduzia a actividade bruxómana. Assim sendo, a oclusão é considerada um factor contributivo para a frequência e intensidade do bruxismo e não um factor etiológico.³⁴ O papel dos factores anatómico-oclusais foi, ao longo dos tempos, diminuído, questionando-se mesmo a presença e a influência destes no bruxismo.³²

Por exemplo, Rugh *et al.* (1984)⁷⁸ estudou as influências de interferências oclusais artificiais, incorporadas na região molar, a nível coronário, através da actividade mastigatória muscular durante o sono, quantificada por EMG. Em contraste com os achados de Ramfjord em 1961, as interferências causavam um decréscimo significativo dos MMNF relacionados com o sono em 90% dos casos. Tal evidenciou dúvidas em relação ao papel das interferências oclusais. Por outro lado, sabe-se que as interferências artificiais não podem ser directamente comparadas com as naturais, sendo estas últimas possivelmente o efeito e não a causa do bruxismo.³² Também nem todos os bruxómanos apresentam interferências oclusais e nem todas as pessoas com interferências são bruxómanas.^{34, 79} Assim, pode concluir-se que os esquemas oclusais são importantes na distribuição das forças,^{68, 78, 80} no entanto não existem provas sobre o papel da oclusão na etiologia bruxismo.⁸¹ Dois estudos relativamente recentes analisaram a possível relação entre o bruxismo e factores anatómicos da região oro-facial. Miller *et al.* (1998)⁸² encontrou uma assimetria condilar pronunciada na altura condilar em bruxómanos, quando comparados com não-bruxómanos. Young *et al.* (1999)⁸³ observou maiores larguras bizigomáticas e cranianas em bruxómanos. Contudo, o diagnóstico de bruxismo nestes pacientes foi feito com recurso a relatos pelos próprios pacientes e complementado com exame clínico, mas não foi confirmado com polissonografia, o que pode comprometer a interpretação dos resultados.³² Menapace *et al.* (1994)⁸⁴ não encontrou diferenças na morfologia dento-facial de bruxómanos e não-bruxómanos, o que torna ainda mais difícil tirar conclusões sobre este parâmetro.

De facto, até agora apenas um estudo controlado de Lobizzo⁷⁵ (2001) conseguiu utilizar a polissonografia para confirmar ou refutar o diagnóstico de bruxismo e comparar variáveis oclusais e cefalométricas distintivas entre bruxómanos e não-bruxómanos. Este autor concluiu pela inexistência destas variaáveis. Quanto ao papel das interferências oclusais na

oclusão, conclui-se não haver provas que estes factores estejam relacionados com a anatomia esquelética oro-facial e a etiologia do bruxismo.

Os estudos realizados durante a última década têm focado a sua investigação na análise de factores relativos ao sistema nervoso central.⁴ Para o comprovar, um grande número de estudos demonstrou que os factores centrais desempenham um importante papel no desenvolvimento do bruxismo.^{5, 16, 18, 33, 35} No entanto, não é de descartar a hipótese que este possa ser influenciado por factores periféricos.^{33, 35}

Alguns autores referem os factores psicológicos como primários a qualquer outro factor desencadeante do bruxismo⁸⁵. Molina⁸⁶ e Maciel⁸⁷ sugerem que as causas são psicológicas (tensão emocional crónica, frustração, ansiedade, medo, hostilidade reprimida) podendo existir causas oclusais associadas. Quando a maloclusão e o stresse emocional superam o nível de tolerância fisiológica do paciente, ocorre hiperactividade muscular e colapso na estrutura que tem um nível menor de tolerância⁸⁸.

Embora a maioria dos autores tenha posto de parte os factores oclusais como possível etiologia do bruxismo, alguns sugerem que estes podem ter alguma importância em pacientes com história prévia de disfunção temporo-mandibular ou em pacientes com hipersensibilidade oclusal.¹¹ Pensa-se também que os hábitos orais, as disfunções temporo-mandibulares, as maloclusões, a hipopneia, os altos níveis de ansiedade e o stresse podem influenciar perifericamente o bruxismo. Estes factores actuam como estímulos motores do sistema nervoso central, provocando alterações na neurotransmissão de dopamina, que origina o pressionamento inter-arcadas.^{33, 35}

Vários estudos suportam o envolvimento do sistema dopaminérgico central (SDC) na etiopatogenia do bruxismo.⁸⁹⁻⁹³ Esta relação foi confirmada por estudos com diversos fármacos (como a L-dopa, bromocriptina e o propanolol). Através de um ensaio clínico controlado, Lobbezoo *et al.* (1997) demonstrou, por meio de polissonografia, que o uso da levodopa (precursor da dopamina) originou uma diminuição significativa, de cerca de 30%, do bruxismo nocturno, fornecendo indícios da participação de substâncias neuroquímicas na génese do bruxismo.⁸⁹ Foi demonstrado que a administração de apomorfina em ratos, agonista dos receptores dopaminérgicos, provoca uma estimulação repetida do sistema dopaminérgico que por sua vez induz o aumento da actividade mastigatória não funcional, predominantemente na transição entre o sono e a vigília. Pensa-se que o sistema nervoso

central está, desta forma, relacionado com o início, aceleração e controlo do bruxismo, contudo a sua influência ainda não está completamente compreendida.^{18, 37}

Os indícios de um desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica provêm de evidências farmacológicas e epidemiológicas e de estudos de neuroimagem do SNC.^{62, 90-94} Esta hipótese é também baseada na similaridade entre as parafunções mastigatórias e em movimentos orais estereotipados observados em algumas doenças como a síndrome de Rett, discinésias orofaciais, distonia oromandibular^{95 96} e esquizofrenia⁹⁷.

Em 1965, Aschcroft alertou para a importância dos movimentos não funcionais repetidos resultantes da administração de anfetaminas (também designadas ATS).⁹⁸⁻¹⁰² O uso destas substâncias aumenta a actividade locomotora, os movimentos estereotipados (incluindo bruxismo), podendo este efeito ser reforçado através da administração repetida desta droga o que acontece em cenários de abuso e dependência.⁹⁸⁻¹⁰²

Numa tentativa de estabelecer uma ligação entre o papel das desarmonias oclusais e alterações no sistema dopaminérgico central, Gomez *et al.* (1998)³⁰ and Areso *et al.* (1999)¹⁰³ induziram bruxismo experimental em ratos. Constataram que uma capa oclusal de acrílico nos incisivos centrais usada durante um longo período de tempo, resultava num desequilíbrio na acumulação de dopamina nos gânglios basais. Contudo, Lobbezoo *et al.* (2001)⁷⁵, num estudo com vinte indivíduos, não conseguiu detectar assimetrias nos receptores D2 do corpo estriado.

Dois estudos não-randomizados verificaram a redução do ranger dentário com o uso do propanolol.^{94, 104} Outro estudo de Amir refere também os efeitos benéficos do propanolol no tratamento de pacientes com bruxismo.⁹⁴ Porém noutra ensaio clínico controlado randomizado, Huynh *et al.*¹⁰⁵ não encontraram nenhuma alteração com o uso do propanolol nos indivíduos com BS.

Ainda não está claro o papel da serotonina na fisiopatologia do bruxismo.^{52, 106} Todavia drogas como fluoxetina, sertralina, paroxetina, que são inibidores seletivos da recaptação da serotonina, são associadas como causadoras do ranger dos dentes.¹⁰⁶

Alguns estudos conduzidos em laboratórios de sono confirmaram que os episódios de bruxismo nocturno são secundários a eventos fisiológicos (actividades cardíacas autónomas) relacionados com fenómenos de *arousal* ou microdespertares do sono. Estes correspondem a alterações repentinas da profundidade do sono, durante os quais o indivíduo não acorda mas atinge um estágio mais leve do sono, ou então chega mesmo a acordar. São episódios acompanhados de movimentos corporais bruscos, aumento dos batimentos cardíacos, alterações respiratórias e aumento da actividade muscular.¹⁷ Os eventos fisiológicos iniciam

um minuto antes de ocorrerem os episódios de Actividade Mastigatória Muscular Rítmica (AMMR). Nesse momento há uma ligeira mudança no balanço dos sistemas simpático e parassimpático. Ocorre um aumento da actividade do sistema simpático autonómico-cardíaco e uma diminuição da actividade do parassimpático.⁴⁷ Os episódios de AMMR com ausência de ranger de dentes estão presentes em 60% dos indivíduos normais, mas também em vários distúrbios do sono, como o sonambulismo e o terror nocturno.³⁶⁻³⁹ Num estudo de Macaluso *et al.* concluiu-se que 86% dos episódios de bruxismo eram acompanhados de um episódio de microdespertar do sono, bem como de movimentos involuntários dos membros inferiores.¹⁷ Nos portadores de bruxismo nocturno cada episódio de AMMR possui 70% a mais de contracções, sendo que a amplitude dessas contracções é 60% maior, enquanto a duração é cerca de 40% menor. Isto sugere que AMMR, nestes indivíduos é uma actividade mais potente.³⁶⁻³⁹ Os episódios de AMMR com ou sem ranger de dentes podem ocorrer após eventos fisiológicos. Cerca de 90% dos episódios de AMMR são associados a alterações do EEG (electroencefalograma) e EMG (electromiografia) relacionadas aos microdespertares. A magnitude dos episódios de AMMR, com início mais rápido da aceleração do ritmo cardíaco, maior actividade do EMG e uma maior força do contacto dentário com ranger de dentes, é o que difere os indivíduos com bruxismo do sono dos indivíduos sem bruxismo do sono.³⁹ Estas observações sugerem que o bruxismo do sono faz parte de uma resposta "*arousal*". Deste modo pode ser classificado como uma parassónia, da qual fazem parte outros distúrbios do sono como o sonambulismo, falar durante o sono e a enurese^{47, 107}.

A sequência fisiológica predominante durante o mecanismo do microdespertar é a seguinte: activação cardíaca e cerebral (3-10 segundos), aumento do tónus muscular dos músculos responsáveis pela abertura bucal (músculos supra-hioideus) e contracção rítmica dos músculos responsáveis pelo fecho, com ranger dentário ocasional.³⁴

Cada vez mais os factores patofisiológicos são implicados no aparecimento do bruxismo³⁷⁻³⁸ Por exemplo, tem sido sugerida uma relação com distúrbios do sono, alterações da química cerebral, uso de medicamentos e drogas ilícitas, tabaco, álcool, certas doenças e traumas, bem como factores genéticos.

O SDC dos mamíferos parece ser um dos mais sensíveis à estimulação por stresse (Anisman and Zacharko, 1990). O stresse emocional foi outro factor considerado responsável pelo bruxismo nocturno. Estudos iniciais conseguiram obter uma relação positiva entre eventos stressantes diários e episódios de bruxismo nocturno. Contudo, estudos recentes conseguiram provar esta associação apenas num número reduzido de pessoas e não num

grupo de pessoas tão abrangente como em estudos anteriores. Há ainda algum consenso que pessoas com bruxismo noturno têm personalidade ansiosa.^{34, 36 108}

2.5- Factores de Risco para o Bruxismo

Define-se factor de risco como a via que pode conduzir um indivíduo a ter maior probabilidade de desenvolver uma doença. Os factores de risco para o bruxismo podem ser encontrados no ambiente físico, podem ser herdados ou podem ainda representar hábitos ou costumes próprios de determinado ambiente social e cultural. Podem ser ainda divididos em factores de risco internos (pré-determinados geneticamente) ou externos (relacionados com o meio ambiente).

Relativamente aos factores biológicos, podemos enunciar a herança familiar e os factores genéticos, bem como a idade e factores hormonais. Estudos prévios com gémeos monozigóticos e heterozigóticos encontraram uma forte correlação entre factores genéticos e o bruxismo. Por outro lado, um outro estudo com gémeos não conseguiu provar a existência de nenhum determinante genético para sinais e sintomas relacionados com a articulação temporomandibular.³⁸ No entanto, um estudo recente de Smith e colaboradores¹⁰⁹ evidencia que alguns genes relacionados com a dor crónica/susceptibilidade à dor poderão influenciar a DTM. A DTM é influenciada por contribuições genéticas várias incluindo os genes NR3C1, CAMK4, CHRM2, IFRD1, GRK5, HTR2A e COMT.¹⁰⁹

Ainda não foi encontrado nenhum marcador genético específico como causa primária de bruxismo, embora 21 a 50% dos portadores tenham um membro directo da família com esta patologia.⁶² Em relação à idade, as crianças apresentam uma taxa de prevalência elevada (14%).³⁶ Contudo, Lavigne refere a diminuição dos episódios de bruxismo com a idade para 8% em adultos e 3% em pacientes com mais de 60 anos de idade.^{17, 36} Por vezes, as alterações hormonais que acompanham a menopausa (diminuição acentuada da produção de estrogénio) conduzem ao aparecimento de vários sintomas relacionados com DTM, entre eles dores musculares e articulares, ansiedade e bruxismo.^{62, 110}

Alguns estudos encontram uma associação positiva entre bruxismo do sono e refluxo gastro-esofágico.¹¹¹

Os factores relacionados com o ambiente social têm também influência, já que parece haver relação entre as condições de trabalho, as condições sociais, a vida afectiva e o aparecimento de episódios de bruxismo.⁶² Parece ser um tópico aceite o facto de indivíduos

com bruxismo apresentarem níveis excessivos de stresse ou possuírem mecanismos inadequados para lidar com situações stressantes.^{42, 52}

Factores relacionados com o modo de vida pessoal (consumo de álcool, cafeína, drogas e tabaco) têm também influência nesta condição⁶⁶. Na maioria destas estereotipias suspeita-se que uma hiperfunção do sistema dopaminérgico central (SDC) será a causa subjacente. O uso abusivo de drogas que estimulam o sistema dopaminérgico central (tais como as anfetaminas ou a cocaína),^{19, 112-114} de alguns fármacos (antidopaminérgicos, inibidores de canais de cálcio e inibidores seletivos da recaptção da serotonina) bem como o tabaco e o álcool têm sido associados ao aparecimento de bruxismo em humanos.^{7, 62}

A administração de baixas doses de L-Dopa atenua o ranger dentário em casos de bruxismo nocturno primário. Contudo, o uso crónico de drogas antidopaminérgicas causa hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos, podendo causar ranger dentário. Os estados hiperdopaminérgicos (como os induzidos por anfetaminas e cocaína) podem causar ranger dentário.⁶² Segundo alguns estudos, muitos dos indivíduos que consomem drogas assumem que após 12 ou 24 horas do consumo ainda apresentam pressionamento inter-arcadas.¹¹⁴⁻¹¹⁵ Foi relatado que a hiperactividade dos consumidores de anfetaminas pode causar bruxismo, o qual por sua vez pode provocar fracturas dentárias e desgaste dentário.^{19, 112-114} O uso de cocaína tem sido associado a um aumento das actividades bruxómanas.¹⁹

Os consumidores de ecstasy apresentam, com maior frequência, bruxismo, hiperactividade muscular generalizada e dores musculares.^{19, 116} Esta droga provoca uma grande libertação de serotonina e, em menor grau, de dopamina e noradrenalina, podendo induzir a destruição selectiva de terminações nervosas.¹⁹

O uso crónico de L-Dopa por pacientes com Parkinson causa bruxismo. De forma semelhante, o uso crónico de neurolépticos por pacientes psiquiátricos origina bruxismo⁹³. Outros medicamentos que exerçam uma influência indirecta no sistema dopaminérgico, como os inibidores seletivos da recaptção da serotonina podem causar bruxismo a longo prazo. A observação de Amir *et al.*, 1997⁹⁴ corrobora o facto de os β -bloqueadores como o propranolol aliviarem o bruxismo secundário a antipsicóticos. Já outros estudos não encontram qualquer efeito do propranolol no bruxismo do sono, embora relativamente à clonidina (agonista α 2) encontrem uma diminuição do tónus simpático no minuto precedente ao aparecimento do bruxismo nocturno, reduzindo desta forma o bruxismo do sono ao prevenir a sequência de activação motora que lhe está associada.¹⁰⁵

Relativamente ao tabaco, alguns estudos defendem que os fumadores apresentam um risco aumentado de bruxismo,^{17, 19} uma vez que a nicotina aumenta a concentração de

dopamina. Esta, por sua vez, aumenta a actividade parafuncional através da estimulação dopaminérgica central.¹⁹

A relação entre hábitos alcoólicos e o bruxismo não é consensual entre os vários autores. Enquanto alguns referem a associação do álcool com o aumento da prevalência do bruxismo outros não o indicam.¹⁹ Pensa-se que provoca um aumento agudo na concentração local de serotonina, opióides e dopamina, enquanto que o uso crónico diminui o nível basal desses produtos químicos.¹⁹ É aceite que o consumo de álcool aumente o bruxismo. No entanto, os estudos não indicam que exista uma relação estatisticamente significativa pelo que mais investigação nesta área deveria ser efectuada.^{19, 117} De ressaltar que os bruxómanos consomem mais frequentemente bebidas alcoólicas à noite do que os não bruxómanos.¹⁹

Em relação ao efeito da cafeína um estudo controlo com 14 voluntários não verificou diferenças significativas entre a actividade dos músculos masseteres e o consumo de cafeína ou de placebo.¹⁹

2.6- Sinais e sintomas do Bruxismo

Os sinais e sintomas do bruxismo são vários e podem ser divididos em inúmeras categorias.

Durante o período do sono os pacientes podem exibir ranger dentário, automatismos orofaciais mastigatórios, movimentos dos membros inferiores²³, sudorese excessiva, pesadelos, palpitações, despertares breves e despertares súbitos com taquicardia.^{23, 62, 66, 69, 118-119}

Relativamente às características relatadas pelo paciente, ao acordar, é frequentemente referida dor ou desconforto dos músculos mandibulares, cefaleias com localização temporal¹²⁰, rigidez mandibular e redução da mobilidade, hipersensibilidade dentária, ferimentos na língua e vestibulo, cervicalgias, entre outras.^{23, 62, 66, 69, 118-119}

Como sintomas relacionados com o sono apresentam-se fadiga, sonolência diurna excessiva e sono não restaurador.^{23, 62, 66, 69, 118-119}

Nas características observadas pelo médico dentista encontram-se a exacerbação de doenças periodontais, desgaste dentário, abrasão e perda de esmalte, fracturas dentárias, diminuição do fluxo salivar, hipertrofia dos músculos orofaciais entre outros.^{23, 62, 66, 69, 118-119}

Podem ainda ser encontrados traços de personalidade ansiosa, hipertensão arterial e redução da libido.^{23, 62, 66, 69, 118-119}

2.7- Diagnóstico do Bruxismo

Actualmente, o processo de diagnóstico do bruxismo permanece um desafio, não só porque esta patologia apresenta características variadas e controversas, como também pela inexistência de um método único, fiável e efectivo para a diagnosticar, que tenha um custo aceitável, uma boa relação qualidade/preço e eficácia a nível clínico e diagnóstico.^{10, 18, 43}

Os meios de diagnóstico disponíveis podem ser clínicos ou laboratoriais. Clínicos quando realizados com recurso a questionários escritos ou orais e complementados com observações/achados clínicos ou com resultados provenientes de dispositivos intra-orais. Laboratoriais quando recorrem a registos polissonográficos e electromiográficos, obtidos em laboratório ou em casa (com dispositivos portáteis). Alguns estudos referem que o único método fiável de diagnóstico é através de registos polissonográficos.¹⁶

O bruxismo é diagnosticado pela AASM com base em relatos de ranger dentário ou de pressionamento inter-arcadas, combinados com, pelo menos, um dos seguintes sinais: abrasão dentária anormal, sons associados a episódios de bruxismo e desconforto dos músculos mastigatórios.³⁹

Como referido anteriormente, o diagnóstico de bruxismo pode também ser clínico. Apesar deste permanecer um método incompleto e não permitir a distinção entre os tipos de bruxismo nocturno e diurno, é o método mais fácil e mais adoptado para diagnosticar esta patologia,^{11, 16} permitindo também adicionar à polissonografia dados iniciais de diagnóstico.¹¹ Os questionários fornecidos durante o diagnóstico clínico podem ser aplicados ao próprio paciente ou a um familiar próximo, os quais respondem a perguntas directas sobre a presença de bruxismo, sob a forma sim/não.¹⁸ O resultado pode indicar não só a presença ou ausência de bruxismo, como também a sua gravidade, sendo que pontuações mais elevadas representam situações mais graves.⁶² Usados de forma única são pouco fiáveis, tendo em conta que muitos dos episódios de bruxismo (cerca de 80%) não despertam a atenção do doente/companheiro.¹⁸

Segundo alguns autores a utilização do Research Diagnostic Criteria¹²¹ ou do Craniomandibular Index¹²² podem ser úteis no diagnóstico das DTM's mas são inadequados para efectuar um diagnóstico sólido relativamente ao fenómeno do bruxismo.¹²² Mesmo os estudos que utilizam EMG dos músculos mastigadores mostram inconsistências principalmente provocadas pela escolha do tipo de eléctrodos e pela sua colocação¹²³ fazendo do estudo e diagnóstico do bruxismo um desafio para a medicina dentária.

Os achados clínicos são fundamentais para complementar os questionários, através da avaliação de parâmetros dentários como abrasão e fracturas e da avaliação de parâmetros orofaciais, como rigidez dos músculos mastigadores, hipertrofia dos masseteres, cefaleias e dores nas articulações temporo-mandibulares.^{18, 36-37}

A avaliação e monitorização da atrição dentária é um processo difícil. Alguns autores referem a possibilidade do uso de dispositivos oclusais ou com métodos directos, através de observação intra-oral.¹⁸ Como estas técnicas avaliam a quantidade de desgaste evidente nas superfícies dos dentes, apenas se podem utilizar em indivíduos com um desgaste dentário significativo.⁴² O desgaste em goteiras oclusais também é um método que pode ajudar a avaliar a quantidade de atrição.¹⁸ Contudo, a atrição avaliada pelo desgaste das goteiras, não indica, necessariamente, o verdadeiro desgaste, tendo em conta que os mecanismos de propriocepção envolvidos na actividade dos contactos dentários podem estar alterados pela presença da goteira.⁴²

O desgaste dentário tem, também, uma etiologia multifactorial. Deve-se a factores como a geometria dos contactos dentários inter-arcadas, a idade do paciente, a dieta, o refluxo gastro-esofágico ou o desgaste associado à sua actividade profissional.^{7, 63} Uma vez que, para além do bruxismo, a mastigação relacionada com a alimentação contribui, também, para o desgaste dentário e que neste parâmetro não se inclui o pressionamento inter-arcadas, podemos concluir que a avaliação da atrição é um método pouco fiável para avaliar o bruxismo.⁷

A polissonografia é um método muito usado em investigação experimental e actualmente tem sido considerada como o *gold-standart* no diagnóstico do bruxismo.³ Tem a capacidade de fazer a distinção entre a actividade bruxómana nocturna e outras actividades orais normais, como suspirar, tossir, deglutir e falar durante o sono.³⁶ Se for complementada com sinais de vídeo e áudio a sua eficácia aumenta.³⁸ Por ser um método preciso e específico,¹⁸ tem sido referido em vários estudos como o único método fiável para avaliar o bruxismo.¹⁶ Os estudos polissonográficos são elaborados com recurso a registos realizados durante várias noites consecutivas Por restrição de laboratórios correctamente equipados e por questões económicas e logísticas não é um método muito utilizado.^{11, 16} A polissonografia também pode ser efectuada em casa, com o auxílio de sistemas portáteis. O sistema portátil melhora a adesão do doente,¹⁰ não só porque lhe permite permanecer no seu ambiente de sono habitual, como não origina tanto incómodo nem gastos económicos.^{16, 36}

Para se realizar um diagnóstico polissonográfico de bruxismo, Lavigne definiu os seguintes critérios¹⁰: presença de, pelo menos, 2 episódios de actividade muscular

mastigatória rítmica (RMMA) com sons devido ao ranger dentário ou presença de um ou mais dos seguintes critérios: mais de 4 episódios de RMMA por hora de sono; mais de 25 contracções de RMMA por hora de sono; mais de 6 contracções de RMMA por episódio.

A electromiografia (EMG) foi introduzida na literatura de Medicina Dentária no final de 1940, por Moyers. A sua utilização tem tido altos e baixos desde então, com Lund e Widmer a referirem-na como inconclusiva.⁴² Na generalidade os autores referem a EMG como um método limitado em termos de validade, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em ambiente clínico.¹²⁴⁻¹²⁹ Estas limitações devem-se a um conjunto de variáveis biológicas (idade, sexo, morfologia esquelética, factores psicológicos, características da pele) e a questões técnicas (posicionamento dos eléctrodos, distância entre estes, movimentos contaminantes, expressões faciais, dor).^{126, 128-129} No entanto, também estes autores reconhecem a sua utilidade em investigação com protocolos experimentais bem controlados e padronizados.^{126, 128-129}

Diversos estudos referem a EMG como um método objectivo e directo de avaliar o bruxismo.^{123, 130} Pode ser realizada em casa, com dispositivos portáteis, ou em laboratórios de sono, efectuada com aparelhos fixos.^{10, 18, 130} Para além disso, este método permite distinguir actividades bruxómanas de actividades não bruxómanas, entre elas tiques e mioclonia.¹⁰

Futuramente, uma possível direcção a seguir será refinar os itens dos questionários e o exame clínico, por serem os mais fáceis de aplicar na prática clínica diária. Outra possível direcção será estabelecer um método que possa medir a actividade bruxómana directamente, utilizando um aparelho que possa ser aplicado rotineiramente aos doentes.¹⁸

Seria uma grande mais-valia para médicos dentistas e fisioterapeutas estabelecer uma anamnese simplificada, que identificasse e determinasse o grau de bruxismo previamente ao exame clínico inicial.⁶²

2.8- Consequências do Bruxismo

Apesar do bruxismo poder afectar o sistema estomatognático de forma destrutiva, o seu diagnóstico clínico é difícil de efectuar, como já referido anteriormente. Assim sendo, a grande maioria dos médicos dentistas apresentam alguma dificuldade em avaliar a presença ou não de bruxismo nos seus pacientes. Alguns padrões de desgaste dentário são considerados sinais de bruxismo, sendo fundamentais para o diagnóstico clínico.¹⁸

O bruxismo é uma parafunção que pode originar consequências deletérias no sistema estomatognático, tais como dor oro-facial,⁴⁴ desgaste dentário anormal,^{18, 26, 44} doença periodontal,^{18, 27, 44, 131} mobilidade dentária,⁴⁴ sensibilidade à palpação muscular,⁴⁴ aumento do tónus muscular,⁴⁴ hipertrofia dos músculos mastigatórios,⁴⁴ dor e desconforto na ATM^{26, 44} e interrupções no sono.²⁶ Os seus efeitos podem alcançar a musculatura do pescoço e do ombro e admite-se que influencie até mesmo a postura de todo o corpo, como em certas disfunções posturais e/ou esqueléticas descendentes. Estas interações resultam frequentemente em potenciais fontes de cefaleias – cervicogénicas e tensionais, e outras dores musculoesqueléticas crónicas.⁶² A intensidade, frequência e duração desta parafunção influenciam os efeitos que dela advêm.⁴⁴

Alguns estudos sugeriram também que o bruxismo pode contribuir para o desgaste dos materiais restauradores, fissuras nos dentes e complicações dos implantes e das suas restaurações. A carga à qual os implantes e as suas sobre-estruturas estão sujeitos durante uma actividade parafuncional pode originar perdas ósseas em torno destes, podendo conduzir à sua perda.¹⁸ A actividade muscular excessiva exercida durante o bruxismo nocturno origina a aplicação de intensas forças oclusais nos dentes, tecidos periodontais e ATM, as quais podem causar danos sobre estas mesmas estruturas e sobre os músculos.²⁷

O ranger dentário nocturno é um dos factores causais de patologias orais mais importantes, daí ser fundamental ponderar este factor aquando o diagnóstico e plano de tratamento dos doentes.²⁷

Três processos distintos podem dar origem ao desgaste dentário: a atrição (desgaste efectuado através do contacto dente-dente como pode ocorrer no bruxismo), a abrasão (desgaste produzido pela interacção entre o dente e um material restaurador) e a erosão (dissolução dos tecidos duros por substâncias ácidas). O termo abfração surgiu para descrever um novo tipo de lesão dentária dos tecidos duros.¹³²⁻¹³³ Este termo foi utilizado para descrever lesões induzidas pelo stresse resultantes da hiperfunção ou parafunção,²⁷ caracterizadas por zonas de desgaste dentário em forma de cunha, na região cervical dos dentes sujeitos a cargas excessivas.

O desgaste dentário pode variar desde o desgaste de pequenas áreas da superfície de esmalte, denominadas por facetas de usura, até ao extenso colapso da estrutura dentária normal. O desgaste dentário tem sido referido como uma consequência do bruxismo em alguns estudos, apesar de um grande número destes estudos terem sido baseados em relatos dos pacientes, os quais nem sempre estão conscientes das suas parafunções ou da etiologia multifactorial do desgaste dentário.¹³⁴⁻¹³⁸ Uma combinação de factores mecânicos e químicos

tem sido observada em pacientes com um desgaste dentário extremo, como referido anteriormente.⁷ Na literatura é possível encontrar também inúmeros artigos que referem que o bruxismo não é a causa principal do desgaste dentário e que existem outros factores contributivos para o desgaste.^{18, 135, 139-147} Assim para além do bruxismo podem estar implicados outros hábitos orais parafuncionais (onicofagia, mordilhamento de objectos), dieta com consumo excessivo de alimentos ou bebidas com baixo ph, distúrbios alimentares, refluxo gastro-esofágico, factores ambientais e profissionais, xerostomia, anomalias congénitas dos tecidos dentários.^{136-137, 148-149}

Num estudo epidemiológico concluiu-se que a contribuição do bruxismo para o desgaste dentário observado nos pacientes foi de apenas 3%. Assim sendo pode concluir-se que a influência do desgaste dentário como factor causal do bruxismo pode estar sobrestimada, visto não ser totalmente compreendida.¹³⁵ Um paciente que apresente um desgaste dentário severo, poderá não só ter como factor causal o bruxismo como também outros factores tais como forças exercidas durante a função oclusal, duração dos contactos dentários e presença de substâncias abrasivas e erosivas na cavidade oral, entre outros.

Na prática clínica, os hábitos parafuncionais durante o sono, são diagnosticados pela combinação da detecção visual de facetas de desgaste, defeitos dentários típicos, sintomas relatados pelo paciente e/ou através de informação fornecida pelos parentes ou cônjuges relativamente à existência de ruídos durante o sono. A maioria dos pacientes bruxómanos não está consciente da presença deste fenómeno.¹⁵⁰

Outra maneira fácil de os médicos dentistas quantificarem a taxa de desgaste dentário é através de um registo fotográfico e de impressões dentárias seguidas de modelos com gesso extra-duro, de modo a fazer comparações ao longo do tempo.⁷

A fraca correlação entre a atrição e as DTM's pode explicar a hipótese da atrição dentária ser um mecanismo adaptativo a alterações funcionais. Quando esta capacidade não está presente pode-se desenvolver uma DTM.¹³⁴ Segundo Keith, o trauma dentário crónico resultante de hábitos parafuncionais pode estimular a remodelação da ATM ou mesmo iniciar um processo degenerativo.¹⁵¹

2.9- Tratamento do Bruxismo

Actualmente não existe um tratamento único, uma estratégia específica ou sequer uma remissão de origem medicamentosa para o bruxismo. E de facto, se considerarmos “tratamento” como a remissão da patologia, então nos casos do bruxismo primário o uso da palavra será de certa forma abusivo pois apenas é possível um controle do problema. As formas de tratamento variam com os sinais e sintomas decorrentes da parafunção. Historicamente, o tratamento do bruxismo baseia-se em cinco objectivos:^{55, 86, 152-153}

- reduzir ao mínimo a tensão emocional do indivíduo;
- eliminar ou diminuir os sintomas e sinais musculares e articulares do indivíduo;
- eliminar ao máximo os contactos prematuros e interferências oclusais do indivíduo;
- melhorar os padrões de contracção-estiramento-repouso alterados da musculatura;
- aumentar a estabilidade oclusal.

A eficácia das abordagens envolvendo alterações e ajustes da oclusão, referidas acima ou citadas nos recursos terapêuticos dos parágrafos seguintes, tem vindo a ser largamente questionada e abandonada pela comunidade científica,^{10, 154-157} acompanhando a mudança conceptual etiológica de periférica para central como referido anteriormente.

Considerando a ressalva anterior, na literatura podemos encontrar descritos vários recursos terapêuticos para o tratamento do bruxismo^{2, 12, 14, 22, 33-35, 38-39, 43, 47-48, 50, 55, 80, 86, 152-153, 158-170}, tais como:

- a reabilitação oclusal com o objectivo de redistribuir as forças oclusais sobre a maior quantidade de dentes, distribuir as forças axialmente, promover estabilidade oclusal, evitar o deslizamento mandibular, reorientar a memória proprioceptiva e promover o maior número possível de guias oclusais;

- o uso de placas e férulas oclusais para redistribuir as forças oclusais sobre ambas as articulações, diminuir a intensidade das forças, proteger o esmalte e a dentina, diminuir a frequência e/ou intensidade dos episódios de bruxismo e romper o ciclo vicioso da contracção muscular sustentada;

- o tratamento psicológico para resolver as questões de frustração, auto-estima, incapacidade de adaptação aos problemas do dia-a-dia, de não aceitação pessoal e auto-exigência;

- o uso de medicação (miorrelaxantes, ansiolíticos e anti-inflamatórios) com a finalidade de eliminar a dor e a inflamação e reduzir o espasmo muscular, e também, nos mecanismos desencadeadores de frustração, ansiedade e tensão emocional;
- fisioterapia neuromuscular para eliminar, temporariamente, os reflexos musculares e contracções musculares viciadas;
- tratamento ortodôntico para fechar os espaços interdentários e eliminar inclinação de dentes e mordidas cruzadas anteriores;
- redução da dureza da dieta visando diminuir a força de contracção muscular e o trauma sobre os tecidos articulares inflamados;
- uso de aparelhos de retroalimentação com o objectivo de reproduzir as descargas elétricas aumentadas ou diminuídas na musculatura do bruxómano e, com isso, modificar o seu comportamento;
- aplicação de injeções intramusculares de anestésicos locais ou mesmo de toxina botulínica (nos casos de bruxismo secundário ou primário intenso) em zonas desencadeantes da dor (músculo masseter, temporal, pterigóideo lateral e o esternocleidomastóideo) com a finalidade de cortar o ciclo doloroso e de melhorar a função muscular, temporariamente;
- uso de aparelhos estimuladores eléctricos transcutâneos para promover o relaxamento, eliminar os sinais de cansaço, tensão muscular, stresse, cefaleia tensional ou não tensional, enxaqueca, etc...
- medidas comportamentais, higiene do sono, a introdução de técnicas de relaxamento não só gerais como da musculatura mandibular bem como técnicas de relaxamento cognitivo que ajudem a lidar com stresse e ansiedade e uma eventual mudança do estilo de vida são bons auxiliares no combate desta patologia.^{153, 171-172}
- tratamento farmacológico, quer pela introdução de novos medicamentos que o combatam, quer pela substituição de fármacos que o despoletem. Agonistas dopaminérgicos, benzodiazepinas ansiolíticas, clonidina, buspirona, hipnóticos não benzodiazepínicos (zolpidem), relaxantes musculares, antidepressivos e antiepilépticos são descritos como parte do tratamento farmacológico desta condição. Contudo, não há um tratamento farmacológico específico e reconhecidamente efectivo a longo prazo e existe um conjunto de literatura contraditória acerca do efeito de vários fármacos no bruxismo.¹⁹ A sua utilização clínica em medicina dentária é discutível e inclusivamente pouco aceite.^{19, 55, 152-153}

De facto existe uma inúmera variedade de formas e abordagens para o tratamento do bruxismo e algumas delas são geradoras de controvérsia. Se ao abrirmos um livro de medicina e para uma determinada patologia encontrarmos apenas descrita uma única terapêutica,

então é provável que esse tratamento apresente uma elevada taxa de sucesso. Ora, tendo em conta este pressuposto, parece óbvia pela longa descrição de tratamentos anteriores, a dificuldade e, muitas vezes, a ausência de um critério claro no tratamento do bruxismo. A associação de estratégias comportamentais e dispositivos para protecção dentária parece ser a medida terapêutica mais adequada para o tratamento das consequências do bruxismo a médio e a longo prazo.¹⁷³

Os tratamentos odontológicos para o bruxismo têm o objectivo de proteger os dentes contra os traumas provenientes do apertar e ranger de dentes, aliviar sintomas presentes e melhorar a qualidade do sono. Estes tratamentos consistem em intervenções irreversíveis e reversíveis. As intervenções irreversíveis, como o ajuste oclusal, restaurações das superfícies dentárias e os tratamentos ortodônticos, são intervenções complexas e não são recomendadas para a maioria dos casos. A maioria dos autores defendem que o papel da oclusão na etiologia do bruxismo é diminuto ou mesmo inexistente, e que o seu tratamento não passa por alterações oclusais irreversíveis.^{10, 32, 81, 88, 154-157, 174} As intervenções reversíveis consistem no uso de goteiras oclusais rígidas ou flexíveis. No entanto, as goteiras oclusais flexíveis são geralmente recomendadas para serem usadas apenas por um curto período de tempo devido à sua rápida degradação.^{2, 14, 38}

As goteiras oclusais foram desenvolvidas com o objectivo de aliviar a dor local e prevenir lesões nas estruturas orofaciais, contudo, a sua eficiência na redução da actividade neuromuscular durante o sono ainda não está bem estabelecida.¹⁷² Alguns autores sugerem que as goteiras oclusais têm um efeito limitado, pois o seu único mecanismo de acção seria proteger as superfícies oclusais contra o desgaste.¹⁷⁵ Alguns estudos defendem que o uso da goteira oclusal em crianças com bruxismo do sono impediu o desgaste oclusal durante o seu uso.¹⁷⁶ Já outros como Van der Zaag *et al.* e Dube *et al.* em dois estudos randomizados, avaliaram as variáveis do sono e do bruxismo do sono comparando a goteira oclusal com a goteira palatal e concluíram que não houve diferenças significativas entre os grupos.¹⁷⁷⁻¹⁷⁸

Varios estudos comprovam a eficácia das goteiras oclusais na redução da hiperactividade dos músculos mastigatórios¹⁵³ comprovada por EMG e a melhora na redução dos sintomas.¹⁷⁹⁻¹⁸⁰ No entanto, vários autores referem o reaparecimento dos sintomas com a remissão da goteira.^{153, 180} Além disso, segundo alguns autores a adesão por parte dos pacientes em tratamentos a longo prazo com goteira oclusal (por mais de um ano) é baixa (cerca de 20%).³⁹

Contudo, outros estudos apresentaram resultados controversos.^{14, 80, 175} Após uma avaliação cuidadosa dos achados dos estudos em que a goteira oclusal diminuiu a actividade dos músculos mastigatórios, eles concluíram que apenas a utilização do exame EMG não é suficiente para detectar a redução do bruxismo do sono. As medidas (intensidade, frequência e duração) da actividade rítmica da mandíbula devem ser obtidas por instrumentos de áudio, vídeo e EMG.¹⁷⁵

Apesar do extenso uso das placas oclusais para o BS, o seu mecanismo de acção ainda permanece controverso. Algumas hipóteses são propostas para explicar a sua acção, como redução da actividade electromiográfica do músculo masseter, mudança no comportamento oral do paciente e a alteração da oclusão.^{1-2, 162, 175}

Alguns tipos de tratamentos médicos podem ser fundamentais em determinadas condições que possam ser consideradas factores de risco para o bruxismo, como o tratamento do refluxo gastroesofágico, da xerostomia e da apneia-hipopneia obstrutiva.^{111, 163-164}

Tratar um bruxômano representa um dos maiores desafios em medicina dentária. Actualmente é colocado um enorme enfoque na abordagem desta patologia por uma equipa multidisciplinar, formada por psiquiatra, médico dentista, fisioterapeuta e psicólogo.^{40, 76-77, 86}

3- INFLUÊNCIA DO STRESSE NOS MOVIMENTOS MASTIGATÓRIOS NÃO FUNCIONAIS

O stresse, definido como uma ameaça real ou interpretada à integridade fisiológica ou psicológica de um indivíduo, resultando em respostas fisiológicas e/ou comportamentais por parte deste,¹⁶ é frequentemente sugerido como factor etiológico de muitas condições físicas que se encontram mal compreendidas.⁴²

É um conceito extremamente difícil, se não mesmo impossível, de estudar com precisão uma vez que não pode ser medido objectivamente nem definido operacionalmente. As tentativas de relacionar o stresse com fenómenos físicos estão, deste modo, dificultadas.⁴² A vulnerabilidade individual e a capacidade de adaptação são muito importantes para a ocorrência e a gravidade das reacções ao processo do stresse, cujo desenvolvimento depende tanto da personalidade do indivíduo, quanto do estado de saúde em que se encontra, bem como do seu equilíbrio orgânico e mental. O organismo reage ao stresse aumentando a sua actividade metabólica para que possa adaptar-se às novas exigências, o que diminui a sua resistência geral e pode afectar o sistema imunológico. O stresse contínuo pode originar dores

tensionais e espasticidade de músculos esqueléticos, excitação do SNC, insónias e outros problemas.^{107, 181-189}

A ansiedade é uma atitude normal do organismo, portanto fisiológica, responsável pela sua adaptação às várias situações a que é submetido. A ansiedade coloca o indivíduo em situação de alerta, o que lhe permite reagir perante estímulos. Contudo, a partir de certo ponto (quando o organismo atinge o máximo de eficiência), a ansiedade contribui para a falência da capacidade adaptativa.⁶²

Para além das DTM's e parafunções serem correlacionadas com sintomas de stresse,³⁸ também o bruxismo é amplamente considerado uma resposta física ao stresse. Existe na literatura um conjunto significativo de artigos que sugerem a existência de uma relação entre o stresse e o bruxismo, contudo esta relação não gera consenso.^{5, 41-42, 44, 173, 190-194}

Parece ser um tópico aceite que indivíduos com bruxismo apresentam níveis excessivos de stresse ou possuem mecanismos inadequados para lidar com situações stressantes,⁴² apresentando sintomas como cefaleias, pressionamento inter-arcadas, dores no pescoço, costas e ombros.³³

Estudos clínicos têm demonstrado uma maior prevalência de sintomas de ansiedade, maníacos e depressivos em bruxómanos do que em indivíduos sem esta patologia. O bruxismo está também associado a tensão emocional, doenças psicossomáticas, hostilidade, agressividade, apreensão, tendência para preocupação excessiva e distúrbios psiquiátricos, como a esquizofrenia.¹⁶

Alguns estudos tentam caracterizar a personalidade dos bruxómanos e chegam à conclusão que estes têm em comum características como a hostilidade, o perfeccionismo e a sensibilidade ao stresse.^{15, 33} Este facto parece apoiar a relação causal entre o stresse e o bruxismo.^{16, 33} Kuch não encontrou associação entre a personalidade das crianças e o bruxismo. Por outro lado, Kampe encontrou uma relação positiva entre iguais traços de personalidade e o bruxismo em adultos, o que aumenta a controvérsia sobre esta possível relação.³³

Na tentativa de compreender as causas do bruxismo, os autores reconhecem que é muito difícil isolar a função do stresse e da ansiedade das alterações concomitantes na excitabilidade autónoma e motora e no estado alterado de vigilância fisiológica.³⁸

Relativamente ao estudo de Pierce¹⁹², Lobbezoo sugere que os 8% de sujeitos que apresentaram uma associação positiva do stresse ao bruxismo podem ser interpretados como bruxómanos "sensíveis" ao stresse, enquanto a restante percentagem não o é.¹⁶ Manfredini sugeriu que os bruxómanos podem ser distinguidos dos não bruxómanos pela sensibilidade ao

stressse do primeiro grupo, sendo este um dos domínios do espectro da ansiedade que mais os distingue.¹⁶

Existem ainda estudos de investigação que referem que a informação electromiográfica não apoia uma estrita relação stressse-bruxismo, contrastando com estudos baseados no diagnóstico clínico e em questionários.¹⁶ Na clínica, o médico dentista deve estar atento para reconhecer eventuais doenças psicológicas ou psiquiátricas, como ansiedade patológica severa e perturbações de personalidade.¹⁶

Yemm afirmou que a actividade do músculo masseter estava aumentada como resposta ao stressse experimental em humanos.⁴⁴ Um fenómeno semelhante foi reconhecido em ratos, em que os animais submetidos a stressse exibiam movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) dos músculos masseteres.^{30, 108} Butler e Stallard observaram que pacientes sob stressse exibiam contactos inter-dentários mais frequentes e prolongados do que aqueles não submetidos a stressse.⁴⁴

Não parece haver evidência que relacione o bruxismo nocturno com patologias psicossociais. Continua a faltar evidência científica sobre a diferença da importância dos factores psicossociais no bruxismo diurno e nocturno, sendo necessária uma melhor definição destas patologias, tanto a nível etiológico como a nível diagnóstico.¹⁵⁻¹⁶

Estudos que submeteram ratos a stressse emocional em caixas de comunicação, verificaram que os animais apresentaram um aumento significativo dos MMNF. O aumento da actividade dos músculos mastigatórios foi também observado num conjunto de modelos com animais submetidos a stressse. Pode concluir-se que o stressse devido a estímulos emocionais e físicos é capaz de activar o sistema dopaminérgico, o que pode levar à ocorrência de movimentos mastigatórios não funcionais, tal como afirmaram Gomez, Areso e Gonzales.^{28, 30, 90, 92, 193, 195-197}

Foi encontrada uma associação positiva entre situações de stressse e níveis aumentados de actividade muscular em vários locais do corpo. Para além disso, há diversos relatos de actividade electromiográfica aumentada no músculo masseter em situações de indução de stressse. Solberg e Rugh¹⁹⁸, juntamente com outros estudos, concluíram que diversos pacientes relatavam uma associação de diversas situações com o pressionamento inter-arcadas registado por EMG. Estas observações apoiam a teoria de que eventos stresssantes podem conduzir a comportamentos bruxómanos diurnos. Contudo tal poder-se-á não aplicar ao bruxismo nocturno.^{38, 199}

Para melhor quantificar o stressse, inúmeros investigadores monitorizaram o nível de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) na urina, que se encontram elevadas nestas

situações. Contudo, não mediram a actividade do músculo masseter, de forma a saber se haveria episódios de bruxismo. Alguns autores referem que o aumento da adrenalina deve-se ao stresse e à ansiedade e que o aumento da noradrenalina ocorre por aumento da actividade muscular.^{38, 199} A elevação das catecolaminas em pacientes bruxómanos, em comparação com pessoas sem esta patologia e o aumento da actividade electromiográfica apoiam a relação entre o stresse e o bruxismo.^{28, 38, 78, 199-201}

Tem também sido referido que as actividades decorrentes do stresse são benéficas, uma vez que diminuem o aumento da resposta do sistema nervoso simpático e restauram o equilíbrio autónomo. A supressão destas respostas desencadeadas pelo stresse pode levar ao aparecimento de tensão e doença orgânica, doenças psicossomáticas, úlceras gástricas e neuroses.¹⁹³

Vários estudos sugerem que as respostas ao stresse têm um efeito benéfico e adaptativo para o organismo. Em modelos com animais, foi usado o protocolo de indução de stresse através de contenção física e choques eléctricos em ratos. Weiss *et al.*²⁰² demonstraram que o número de úlceras gástricas era menor num grupo de ratos submetidos a choques eléctricos em que estes eram capazes de exibir respostas agressivas comparativamente a outro grupo em que estas respostas não estavam presentes. Outros estudos demonstraram também que ratos que tivessem disponíveis blocos de madeira para roer durante o protocolo de indução de choque e contenção física desenvolviam menos úlceras gástricas.¹⁹³ Se a capacidade de resposta ao stresse for anulada, a activação do sistema nervoso simpático e parassimpático dá-se ao mesmo tempo, o que pode originar doença orgânica (como úlceras gástricas referidas no estudo anterior).¹⁹³

Apesar destas pesquisas, não parece existir ainda um amplo consenso acerca da relação/ modo como o stresse emocional provoca o bruxismo.^{28, 44}

4- MODELOS EXPERIMENTAIS

A investigação científica surge geralmente na tentativa de dar resposta a um problema ou a uma questão numa determinada área do conhecimento.²⁰³ Os estudos experimentais em humanos em medicina dentária e noutras áreas relacionadas com a biologia são, frequentemente, complicados pela presença de uma grande variabilidade de respostas às questões tratadas, o que interfere com a interpretação de resultados.²⁰³ Simultaneamente, a indução experimental de bruxismo em humanos apresenta um conjunto de problemas éticos

pelo que os estudos nesta área são essencialmente retrospectivos ou observacionais com pouca manipulação e indução experimental.

Tendo em conta que a etiologia do bruxismo permanece como uma das mais importantes questões na área das disfunções temporo-mandibulares, têm sido desenvolvidos vários modelos experimentais de bruxismo e MMNF com animais com o objectivo de ultrapassar as limitações éticas de experimentação em humanos.³⁰

A definição de modelo experimental baseia-se na simulação de situações fisiológicas ou patológicas, *in vivo* ou *in vitro*, para estudos relativos a processos biológicos e biopatológicos. A utilização de animais de laboratório é um recurso fundamental para a compreensão de vários processos patológicos e fisiológicos importantes.

4.1-A Escolha de um Modelo Experimental

Na escolha de um modelo com humanos ou com animais devemos questionar se as conclusões a tirar do estudo são específicas para o Homem ou a informação referente ao modelo animal é passível de ser aplicada ao Homem, se os procedimentos são passíveis de ser aplicados em humanos e se a metodologia implica um risco à vida, saúde ou conforto destes.²⁰³ Em Medicina, os modelos animais são úteis pois podem ser cuidadosamente controlados. Se houver perigo para a vida humana, o modelo com animais é mandatório. Só após uma série de testes em animais é possível avançar com a pesquisa em humanos e estes estudos só podem ser efectuados sob condições estritas e cuidadosamente monitorizadas.²⁰³ Deste modo, devido às dificuldades de ordem ética em Humanos, têm sido desenvolvidos vários modelos com animais.

No desenho de experiências com animais, estes são divididos em grupos de forma a obter o máximo de informação sem enviesamentos, com o mínimo de animais, tempo e custo possíveis.²⁰³ Aquando da escolha do modelo experimental com animais, há que ter em conta variados factores, nomeadamente o “Princípio dos 3 R’s”: ²⁰⁴⁻²⁰⁵substituição (*Replacement*), redução (*Reduction*) e refinação (*Refinement*). A Substituição (*Replacement*) consiste na utilização de material inanimado em vez de material vivo, através da utilização de sistemas computadorizados, de sistemas avançados *in vivo*, de organismos inferiores e células, de tecidos e da cultura de órgãos. A Redução (*Reduction*) significa a diminuição, ao mínimo indispensável, do número de animais utilizados de forma a obter informação em determinada quantidade e precisão. Para tal, é possível recorrer a estudos piloto ou *in vitro*, partilhar experiências entre

laboratórios e utilizar um desenho cuidadoso da metodologia. Por sua vez, a Refinação (*Refinement*) permite a diminuição da incidência ou da gravidade dos procedimentos laboratoriais aplicados aos animais, utilizando, para esse efeito, pessoal bem treinado, equipamento adequado, a optimização do ambiente e a realização de eutanásia adequada.²⁰⁴⁻²⁰⁵

Existem vários critérios de selecção da espécie animal adequada à experiência, como a disponibilidade de aquisição do animal, a disponibilidade de informação existente sobre a sua anatomia e fisiologia, a presença/ausência de homogeneidade genética, os requisitos de alojamento e manutenção, a adaptabilidade às condições experimentais, os custos e questões ecológicas bem como possíveis implicações éticas e sociais.²⁰³⁻²¹¹

4.2- Modelos Animais em Disfunções Temporo-Mandibulares

Face às dificuldades de ordem ética e experimental em modelos com humanos, têm sido desenvolvidos vários modelos com animais de MMNF.²¹² Após uma revisão da literatura podemos concluir que, historicamente, os primatas, os ratos, os coelhos e os ungulados (divisão de mamíferos que compreende os animais de casco) são os animais mais utilizados no estudo das disfunções temporo-mandibulares.²¹²

O estudo com primatas tem vindo a diminuir ao longo dos tempos, devido à crescente importância da sua protecção nas sociedades ditas mais desenvolvidas. Ao longo dos anos estabeleceram-se normas legislativas de experimentação e de protecção animal. Assim, na União Europeia, foram abandonados alguns procedimentos como a experimentação com primatas. Entre 1973 e 1982, 37% dos estudos da ATM utilizavam primatas, tendo a percentagem diminuído de 18 para 6%, entre 1998 e 2003. A proximidade das linhagens do macaco ao humano não dá garantias da semelhança da ATM. No entanto, se os representantes de outras três diferentes ordens de mamíferos (Rodentia, Lagomorphae, Artiodactyla) suportarem um determinado achado, as probabilidades são elevadas de que esse achado seja válido para humanos também.²¹²

O estudo com ratos é feito, maioritariamente, para fins de investigação sobre nocicepção e sistema nervoso. Os coelhos têm sido utilizados para o estudo de doenças da ATM, nomeadamente condições inflamatórias e de deslocamentos do disco. Os ungulados constituem actualmente modelos de estudo de propriedades de materiais e procedimentos cirúrgicos, realizados anteriormente em primatas e carnívoros.²¹²

Para estudar as disfunções temporo-mandibulares, a dor oro-facial e o bruxismo utiliza-se, com maior frequência, o rato.^{196, 213-218} Tal acontece devido à facilidade de standardização das condições experimentais, ao seu baixo custo de aquisição e alojamento, ao crescimento contínuo dos seus dentes que sofrem uma rápida atrição (que é também fácil de medir), à facilidade de indução de stresse com um rendimento elevado (aproximadamente 100%), ao seu comportamento é fácil de manipular e observar, à fisiologia dos seus órgãos estar muito bem estudada, aos seus órgãos-alvo serem de fácil colheita e à possibilidade de aquisição de estirpes específicas.^{196, 214-219} Como os roedores são criados especificamente para fins de investigação, podem ser prontamente utilizados.

4.3- Modelos Experimentais de Indução de Stresse

O sistema dopaminérgico desempenha um papel fundamental nas parafunções orais e pode ser estimulado pelo stresse emocional. Vários têm sido os estudos que tentam estabelecer, estudar e clarificar o envolvimento do sistema dopaminérgico central (SDC) na etiopatogenia do bruxismo.^{28, 90, 93, 197, 220} Esta hipótese é baseada na similaridade entre as parafunções mastigatórias e os movimentos orais estereotipados observados em algumas doenças como a síndrome de Rett, discinésias orofaciais, distonia oromandibular⁹⁵⁻⁹⁶ e esquizofrenia.⁹⁷ Na maioria destas doenças suspeita-se que uma hiperfunção do SDC seja a causa subjacente. O SDC dos mamíferos parece ser um dos mais sensíveis à estimulação por stresse.²²¹⁻²²³

É conhecido que diversos agentes stressantes físicos e emocionais podem afectar a função motora geral através da estimulação do sistema nervoso simpático²²⁴ e das hormonas glucocorticóides.²²⁵⁻²²⁶ O sistema nervoso simpático actua ao nível muscular, causando vasoconstricção e alterações na contractilidade muscular e na sensibilidade muscular. Alterações específicas no sistema nervoso central dopaminérgico podem estar envolvidas no aumento dos movimentos mastigatórios não funcionais, causados por stresse, apesar do envolvimento de factores sistémicos não poder ser descartado.²²⁷ Estudos prévios em animais^{46, 90, 195, 197, 228} reconhecem que o stresse emocional e psicológico é capaz de induzir comportamentos orais e mastigatórios não funcionais em ratos, despoletando um fenómeno análogo ao bruxismo ou à onicofagia em humanos.^{200 28, 74, 78, 201, 229}

Um parâmetro válido para avaliar as respostas destes animais ao stresse é a medição dos Movimentos Mastigatórios Não Funcionais (MMNF) em ratos.^{28, 90, 195, 197}

Existem vários modelos de indução de stresse com animais, que permitem induzir movimentos mastigatórios não funcionais e que tentam relacionar o envolvimento do sistema dopaminérgico central com o aparecimento destes movimentos.^{28, 90, 92-93, 220} São vários os estudos que utilizam modelos com ratos sob situações de stresse, de forma a induzir o aparecimento de MMNF's. Alguns utilizam caixas de comunicação,^{28, 230} enquanto outros utilizam meios de stresse restritivo, físico ou ainda farmacológico.

O modelo da caixa de comunicação é utilizado para induzir stresse psico-social experimental em ratos.^{28, 230} Este é um método baseado na capacidade de comunicação emocional intra-espécie, em que os ratos são colocados numa caixa de acrílico transparente, dividida em várias gaiolas, de forma intercalada, em que há animais simultaneamente submetidos e não submetidos a stresse. Apesar de não poder existir contacto físico directo entre eles, é um método bastante utilizado para induzir stresse psicológico em animais. Visto esta caixa ser transparente e com divisões, os animais que não são submetidos a stresse conseguem aperceber-se das respostas dos animais vizinhos, os quais são expostos a stresse físico induzido por um choque eléctrico. O sistema permite-lhes receber pistas, como sensações visuais, auditivas e olfativas dos animais vizinhos e comunicar entre si.^{28, 230-231} A comunicação emocional intra-espécies torna os ratos não submetidos a stresse ansiosos, causando-lhes um aumento dos níveis de hormonas plasmáticas, como o cortisol.²³¹

O stresse causado por restrição de movimentos é outro dos métodos possíveis de utilizar. Para tal, um estudo colocou ratos dentro de cilindros restritivos, por períodos de 30 minutos. Através da utilização deste método, Zeredo verificou um aumento dos movimentos mastigatórios não funcionais.²²⁷

É também possível utilizar métodos físicos para induzir stresse em animais. Um desses métodos é o denominado "*tail pinch*", em que os ratos são submetidos a um aperto na cauda. É bastante fiável e apresenta um elevado rendimento. De acordo com o estudo de Gomez,¹⁰⁸ dois grupos de ratos foram submetidos a este método e ambos apresentaram um aumento da actividade dopaminérgica. Em consonância, outros estudos demonstraram que quanto maior esta actividade, maior a severidade dos MMNF's.^{30, 90-91, 159, 223, 232}

De acordo com alguns estudos experimentais surgiu a hipótese de que a expressão de certos comportamentos mastigatórios atenua os efeitos do stresse na transmissão catecolaminérgica central. Apesar de estes resultados não poderem ser directamente aplicados ao Homem, sugerem que o aparecimento de parafunções orais durante eventos stressantes pode ser útil para o organismo, tendo em conta que estas atenuam as

consequências do stresse ou da ansiedade no cérebro.^{108 108, 233-234} Assim, em termos de consequências fisiológicas do stresse, vários estudos comprovam que os ratos aos quais foi dada a oportunidade de expressar a sua agressividade, através do acto de morder (como, por exemplo, blocos de madeira) durante a sessão de stresse, apresentaram níveis mais baixos de cortisol, mantiveram a sua temperatura corporal e desenvolveram menos úlceras gástricas do que os ratos que não tiveram essa oportunidade.²³³⁻²³⁴ Em relação aos efeitos do stresse na neurotransmissão central, os ratos aos quais foi permitido morder, o aumento do *turn-over* noradrenérgico em várias regiões do cérebro foi mais baixo, particularmente nos gânglios basais.^{108, 233 234}

Experiências futuras envolvendo ratos criados pela sua capacidade em exhibir movimentos mastigatórios parafuncionais em resposta ao “*tail pinch*” poderão vir a ser um excelente modelo com o qual investigar como certos factores específicos, como, por exemplo, estímulos stressantes, fármacos ou desarmonias oclusais se podem combinar com características genéticas, de forma a controlar a função dopaminérgica e a modular o comportamento oral subserviente a este caminho neuronal.¹⁰⁸

O stresse experimental pode também ser induzido farmacologicamente, com substâncias que estimulam o sistema dopaminérgico. A apomorfina, a dopamina e a dexanfetamina têm sido associadas à indução de comportamentos orais estereotipados em ratos (como os actos de cheirar, morder e lambar), bem como a comportamentos associados ao acto de roer compulsivo, associado à acção de raspar ocasional dos dentes.⁹¹ Estes comportamentos têm sido considerados como formas de bruxismo experimental induzidas por drogas.⁹⁰

4.4- Métodos de Avaliação do Stresse induzido experimentalmente

As actividades relacionadas com os movimentos mastigatórios não funcionais têm sido extremamente difíceis de medir adequadamente. Vários autores têm procurado desenvolver métodos simples e eficazes para estudar quantitativamente os MMNF nos ratos. Entre estes poderemos referenciar a electromiografia (EMG),^{193, 196, 235 227} os métodos observacionais^{30, 227} e a avaliação da atrição dentária.^{30, 218, 227}

A EMG é um método relativamente simples, mas dispendioso.²²⁷ Permite uma medição automática dos comportamentos mastigatórios dos ratos, em situações de stresse, através da utilização de eléctrodos colocados ao nível do masseter ou temporal, por métodos cirúrgicos.^{28, 193, 227} Estudos como o de Ro indicam que os resultados podem ser condicionados pelo facto de os animais estarem ligeiramente anestesiados para fazer a colocação destes eléctrodos.²³⁵ Alguns estudos efectuam, inclusivamente, registos EMG de movimentos mastigatórios não funcionais através da activação do córtex cerebral. Contudo, estes também requerem anestesia, o que dificulta a obtenção de valores de controlo.¹⁹⁶ Alguns autores referem alguma dificuldade na reprodutibilidade dos valores encontrados entre diferentes estudos. Estas diferenças na magnitude das respostas electromiográficas do músculo podem ser atribuídas à utilização de diferentes tipos de anestésicos, com diferentes graus de depressão muscular, mas com manutenção de algumas respostas reflexas dos ratos.²³⁵

Por vezes os animais conseguem também tocar nos eléctrodos durante actividades como o lambar-se, coçar-se ou lavar-se o que introduz mais artefactos na medição, embora alguns autores tenham testado métodos de remover estas interferências dos registos.²²⁷ Outra desvantagem deste tipo de estudos é a possibilidade de perda de conexão dos cabos ou a impossibilidade de utilizar métodos de indução de stresse como o banho frio.²²⁷ É ainda de referir o facto de ser necessário uma cirurgia para a instalação dos eléctrodos, expondo os animais a stresse adicional e a risco de infecção.²²⁷

Há uma relação positiva entre o aumento da actividade electromiográfica e o aumento da actividade dos músculos mastigadores, reportada por diversos estudos experimentais.^{28, 196-197, 227, 236-237} É sugerido que o comportamento de morder é um componente estereotipado da resposta ao stresse em ratos. A gravação EMG dos músculos mastigadores pode ser útil para quantificar os MMNF, embora uma monitorização vídeo cuidadosa seja aconselhável na tentativa de eliminar outros comportamentos.²²⁷

No estudo de Zeredo, por exemplo, a EMG gerada durante comportamentos como o coçar-se (*grooming*) foi marcada temporalmente e depois removida. Este comportamento em ratos inicia-se, geralmente, com o lambar das patas, seguido do esfregar destas na cabeça e, finalmente, o lambar e esfregar os lados da cabeça, a região anogenital e a cauda.²²⁷

Gravar os sinais EMG dos músculos maxilares pode ser útil na quantificação e na obtenção da amplitude dos comportamentos mastigatórios não funcionais, possibilitando a procura de outros comportamentos orais, descartando sinais EMG que poderão enviesar os estudos.²²⁷

A inspeção visual comprovou que outros comportamentos orais como o lambar ou coçar eram incluídos no registo EMG o que determina que este método isolado não pode ser completamente automatizado para medir os MMNF.²²⁷ Assim, os métodos observacionais através de caixas de observação transparentes e a gravação em cassete de vídeo dos MMNF têm sido usados para avaliar os movimentos orais parafuncionais em modelos com animais de bruxismo.^{30, 218, 227} Um observador treinado e cego mede os MMNF dos animais em relação ao tempo.^{196, 227} Ainda assim admite-se que a medição destes movimentos é difícil de automatizar e deverá ser diferenciada de outras actividades orais.²⁸

Os movimentos como roer ou morder são facilmente avaliados por observação. Alguns estudos procuram, através dos métodos de observação, considerar apenas as respostas que envolvem um comportamento de roer/morder vigoroso da tela metálica da gaiola ou dos blocos de madeira e bruxismo experimental (ranger ou “raspar” os dentes) classificando-os como MMNF. Estes podem ser classificados em função da gravidade e do tempo de duração. A duração é definida como o tempo total em que se apresentam os MMNF durante o período de observação. Os registos observacionais são cumulativos e devem ser efectuados sempre pelo mesmo observador e de forma cega.^{108, 196} A sua classificação varia em função da gravidade e da duração, sendo que alguns estudos requerem um mínimo de 5 segundos de MMNF para poderem ser considerados.¹⁰⁸

4.4.1- O desgaste dentário em modelos animais

O desgaste dentário patológico/exagerado é tido como um dos sinais mais comuns de bruxismo. No entanto tem também sido atribuído a outros factores, como idade, ocupação, factores dietéticos e oclusais, refluxo gastro-esofágico e abuso de drogas.^{151, 238} A quantificação do desgaste dentário em situações específicas seria extremamente útil na elucidação das suas

causas. No entanto os estudos longitudinais em humanos são raros, principalmente porque o desgaste dentário é um fenómeno que ocorre lentamente e também devido à ausência de métodos adequados de medição precisa.^{30, 239}

A medição do desgaste dentário em ratos é relativamente fácil, uma vez que os seus incisivos apresentam um crescimento contínuo, com um equilíbrio, em condições fisiológicas, dos processos de aposição radicular e desgaste incisal.^{30, 239-241} Nestes animais, a atrição depende de vários factores, como a consistência da dieta e a presença de MMNF (como por exemplo o mordilhamento de objectos e o bater ou raspar dos dentes uns contra os outros ou contra as grades da gaiola).²⁴⁰⁻²⁴² Assim sendo, uma situação em que os MMNF do rato são estimulados (como por indução de stresse) resultará numa maior atrição dos bordos incisais.³⁰

5 – A HORMONA CORTISOL

5.1-Mecanismo de Regulação da Secreção do Cortisol

O sistema nervoso central, após receber informação de variados factores internos e externos, tais como sinais de fome, medo, ingestão de alimentos ou composição do sangue, regula a produção apropriada de hormonas nos tecidos endócrinos.²⁴³ O hipotálamo, centro de coordenação do sistema endócrino, recebe e integra as mensagens do sistema nervoso central e produz hormonas reguladoras que vão directamente para a hipófise.²⁴³

A hipófise possui duas partes funcionalmente distintas: hipófise posterior e hipófise anterior (adeno-hipófise). A adeno-hipófise responde às hormonas hipotalâmicas presentes no sangue, produzindo hormonas trópicas, as quais activam as glândulas endócrinas, tais como o córtex das glândulas supra-renais, a glândula tiroideia, os ovários e os testículos. Estas, por sua vez, segregam hormonas que são transportadas pela corrente sanguínea até aos receptores presentes nas células dos tecidos-alvo. A hormona libertadora de corticotropina, segregada no hipotálamo, estimula a segregação de ACTH (hormona adrenocorticotrópica), pela hipófise anterior.^{228, 243-245} A ACTH desloca-se até à zona fasciculada do córtex das glândulas supra-renais, estimulando a libertação de cortisol,^{228, 243, 245} que é quase exclusivamente controlado por esta hormona.²⁴⁴ A estimulação prolongada do córtex supra-renal pela ACTH, não só aumenta a sua segregação como também provoca hipertrofia e proliferação das células córtico-supra-renais, sobretudo nas zonas fasciculada e reticular, onde são segregados o cortisol e os androgénios.²⁴⁴

O cortisol possui um efeito inibidor por *feedback* negativo sobre o hipotálamo (diminui a libertação da hormona libertadora de corticotropina) e sobre a hipófise anterior (reduz a libertação de ACTH). Estes mecanismos de *feedback* auxiliam a regulação da concentração plasmática do cortisol, quando o organismo não está submetido a stresse. Ou seja, sempre que as concentrações do cortisol atingem níveis demasiado elevados, os mecanismos de *feedback* reduzem automaticamente a ACTH, até ser restabelecido o seu valor normal.^{228, 244}

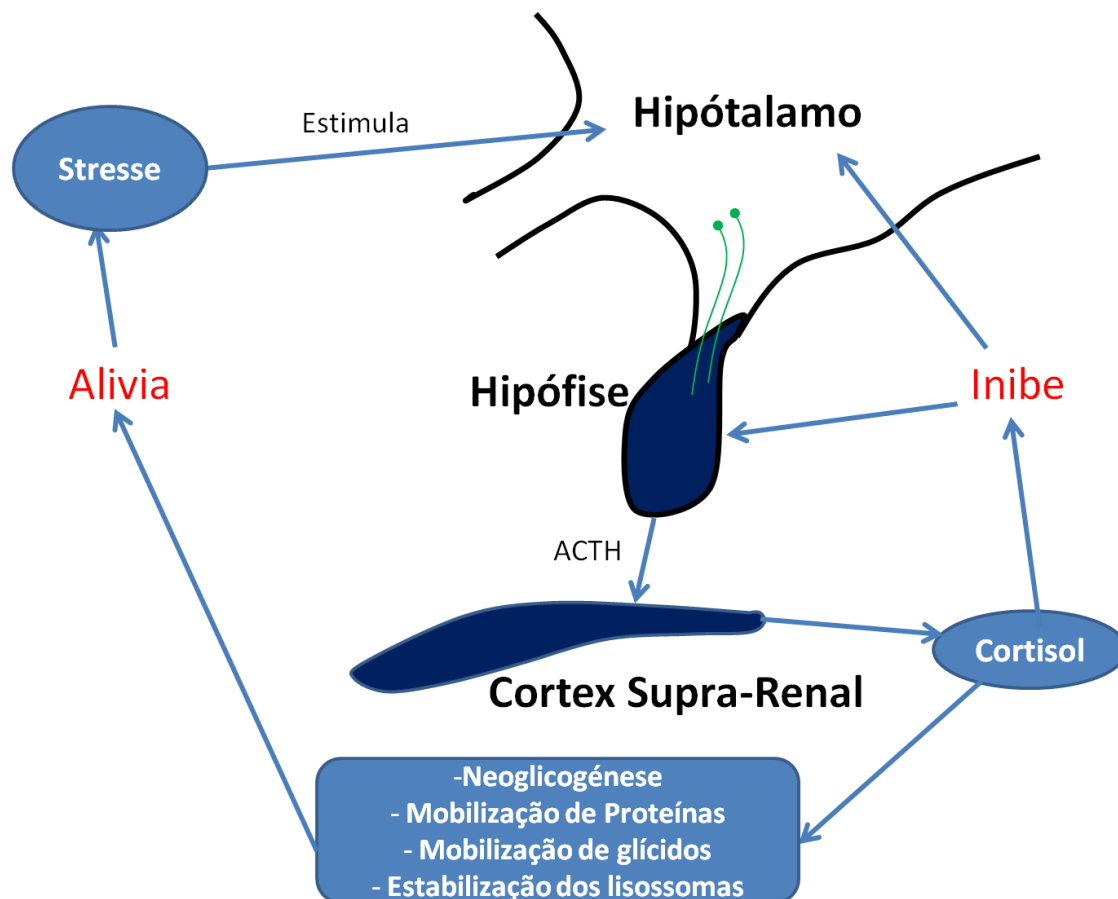


Figura 1- Esquema elucidativo do mecanismo de regulação da secreção do cortisol.

5.2-Ritmo Circadiano do Cortisol

Ao longo do dia, o organismo está sujeito a vários agentes stressantes, os quais podem inibir o mecanismo de *feedback*, causando exacerbações periódicas da libertação de cortisol. Estas flutuações dos níveis de cortisol denominam-se ritmo circadiano do cortisol. As velocidades de segregação e, conseqüentemente, as concentrações da hormona libertadora de

corticotropina, da ACTH e do cortisol, encontram-se elevadas durante a manhã e diminuídas durante a noite, no ser humano.²⁴⁴

O ritmo circadiano do cortisol ocorre devido à alteração cíclica de 24 horas nos sinais do hipotálamo responsáveis pela segregação desta hormona. Assim sendo, quando um indivíduo modifica os seus hábitos diários de sono, o ritmo circadiano também se altera.²⁴⁴ O ritmo circadiano do cortisol apresenta um pico na sua concentração no início da manhã, cerca de uma hora após o indivíduo acordar, diminuindo progressivamente a sua concentração até um valor mais baixo no início ou no ponto intermédio do sono.²⁴⁵

Um ritmo circadiano disfuncional pode estar relacionado com um padrão de sono anormal ou com alterações na temperatura corporal, na função das glândulas supra-renais e no sono REM.²⁴⁶ Os seus valores podem ser mascarados por influências externas, tais como actividade física ou poucas horas de sono.²⁴⁷

As determinações dos níveis sanguíneos de cortisol só se tornam válidas quando são relacionadas com o período do ritmo circadiano em que são efectuadas, uma das razões pelas quais este ciclo é tão importante.²⁴⁴ Assim, torna-se necessário, em qualquer estudo, padronizar e identificar correctamente os horários das colheitas para minimizar quaisquer vieses decorrentes deste factor.²⁴⁴

5.3- Síntese, Degradação e Mecanismo de Actuação do Cortisol

As hormonas esteróides humanas são sintetizadas em vários tecidos endócrinos, tais como o córtex das glândulas supra-renais (cortisol e aldosterona), os ovários (estrogénio e progesterona), os testículos (testosterona) e a placenta (estrogénio e progesterona).²⁴⁴ As glândulas supra-renais situam-se nos pólos superiores de ambos os rins e são constituídas por duas partes distintas. A medula supra-renal, localizada na parte central, segrega hormonas como a epinefrina e a nor-epinefrina em resposta à estimulação do sistema nervoso simpático. O córtex supra-renal segrega um grupo totalmente diferente de hormonas, denominado corticosteróides, os quais são sintetizados a partir do colesterol, possuindo por isso fórmulas químicas semelhantes:²⁴⁴ os mineralocorticóides (aldosterona) e os glicocorticóides (cortisol).²⁴³⁻²⁴⁴

Cerca de 94% das hormonas supra-renais são transportadas na forma ligada (à globulina de ligação do cortisol ou, em menor grau, à albumina) enquanto cerca de 6% são transportadas na forma livre. As hormonas esteróides supra-renais sofrem degradação

principalmente no fígado, sendo que cerca de 25% da forma conjugada é excretada pela bÍlis e depois pelas fezes, enquanto os restantes 75% são excretados na urina.²⁴⁴

Os mineralocorticóides controlam a reabsorção dos iões orgânicos no fígado e regulam as concentrações dos eletrólitos no sangue,²⁴³ enquanto os glicocorticóides (como o cortisol) medeiam a resposta fisiológica ao stresse,²⁴³ auxiliam a regulação da neoglicogénese,^{243, 248} reduzem a resposta inflamatória^{243, 248} e estão envolvidos na coordenação do metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos.²⁴³⁻²⁴⁴ O cortisol possui também uma pequena actividade mineralocorticóide.²⁴⁴ Esta hormona pode actuar de forma relativamente lenta, através do seu receptor em diversas células-alvo, pela alteração do seu metabolismo.²⁴³

No ser humano, a sua concentração média sanguínea é de 12 µg/dl (microgramas por decilitro) e a sua secreção média de 15 a 20 mg/dia.²⁴⁴

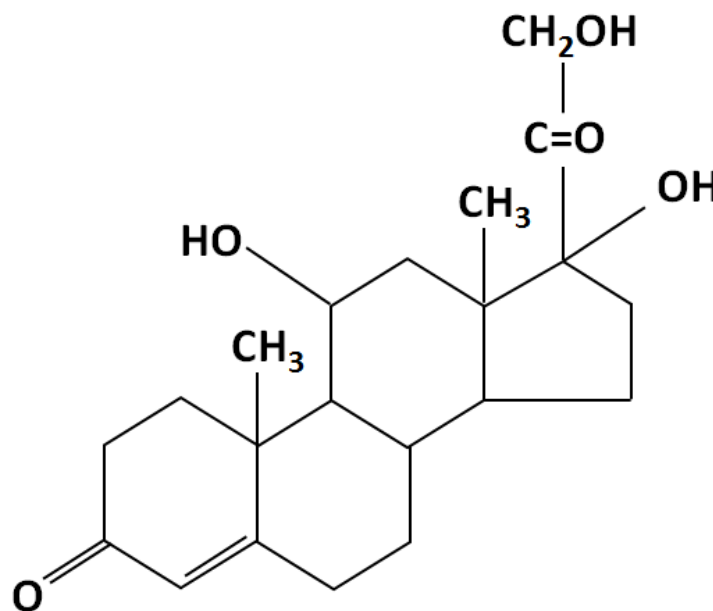


Figura 2- Fórmula química do cortisol.

5.4- Funções do Cortisol no Organismo

No tecido adiposo, o cortisol origina um aumento da libertação de ácidos gordos,²⁴³⁻²⁴⁴ os quais são exportados para outros tecidos para fornecer energia. O mecanismo pelo qual o cortisol promove a mobilização de ácidos gordos, embora ainda não esteja totalmente definido, resulta, em parte, do menor transporte de glicose para as células adiposas. A maior mobilização das gorduras pelo cortisol, associada à oxidação aumentada dos ácidos gordos nas

células, ajuda a desviar os sistemas metabólicos das células em épocas de maior debilidade ou na presença de stresse. Desta forma, a utilização de glicose como energia é substituída pela utilização de ácidos gordos. Contudo, este mecanismo do cortisol requer várias horas para o seu pleno desenvolvimento, não sendo tão rápido ou tão poderoso quanto o induzido pela diminuição da insulina.²⁴⁴

No fígado, a libertação de cortisol é um dos meios mais importantes que promovem a neoglicogénese.²⁴⁴ Os estímulos básicos que desencadeiam o aumento da neoglicogénese são a hipoglicémia e a diminuição dos hidratos de carbono nas células, a qual pode provocar directamente a reversão de muitas das reacções da glicólise e da via do fosfogliconato, permitindo, assim, a conversão de aminoácidos essenciais e glicerol em hidratos de carbono. Quando as células não dispõem de quantidades normais de hidratos de carbono, a hipófise anterior segrega quantidades aumentadas de ACTH, de modo a estimular as glândulas supra-renais a produzir grandes quantidades de hormonas glicocorticóides, principalmente o cortisol.²⁴⁴

O cortisol afecta, também, o metabolismo das proteínas, reduzindo as reservas destas em praticamente todas as células do organismo, excepto nas células hepáticas, através da diminuição da síntese proteica e do aumento do seu metabolismo nas células. Simultaneamente a esta redução de proteínas corporais, ocorre um aumento das proteínas hepáticas e plasmáticas (produzidas pelo fígado e libertadas no sangue). O cortisol diminui o transporte de aminoácidos para as células musculares e para outras células extra-hepáticas, reduzindo as suas concentrações intracelulares e, conseqüentemente, a síntese de proteínas. Contudo, o catabolismo proteico nas células continua a libertar aminoácidos das proteínas já existentes, os quais abandonam as células, aumentando as suas concentrações plasmáticas.²⁴⁴

A concentração plasmática elevada de aminoácidos, associada ao aumento do transporte de aminoácidos para as células hepáticas induzido pelo cortisol, pode explicar a maior utilização de aminoácidos pelo fígado, originando um aumento da velocidade de desaminação dos aminoácidos e da síntese de proteínas, bem como a formação aumentada de proteínas plasmáticas no fígado e a conversão aumentada de aminoácidos em glicose. Grande parte destes aminoácidos é convertida em aminoácidos essenciais no fígado, fornecendo substratos ideais para a conversão em glicose.²⁴⁴

O cortisol provoca, ainda, uma redução moderada da velocidade de utilização da glicose pelas células do organismo, embora a causa dessa redução seja desconhecida.²⁴⁴ Tanto a velocidade aumentada da neoglicogénese quanto a redução moderada da utilização da glicose pelas células provocam a elevação do nível de glicémia.²⁴⁴

A glicose produzida é armazenada no fígado ou exportada imediatamente para tecidos que necessitem de glicose como fonte energética. O efeito destas alterações metabólicas tem como objectivo restabelecer os níveis normais de glicose no sangue e aumentar os níveis de glicogénio, suportando a resposta de *fight-or-flight* associada ao stresse.²⁴³

Quando os tecidos sofrem uma lesão por traumatismo, infecção bacteriana ou qualquer outra causa, quase sempre apresentam algum grau de inflamação, a qual pode ser mais prejudicial do que o próprio traumatismo ou doença. O cortisol pode, em geral, bloquear as fases iniciais do processo inflamatório e, em casos em que já se iniciou a inflamação, causar a rápida resolução do processo aumentando a sua cicatrização. Esta hormona bloqueia também a resposta inflamatória a reacções alérgicas.²⁴⁴

A elevação dos níveis do cortisol influencia directamente o número de linfócitos no sangue, o qual se torna mais reduzido,^{244, 249} originando uma diminuição da imunidade contra microorganismos invasores.²⁴⁴

Embora o mecanismo permaneça desconhecido, o cortisol aumenta a produção de eritrócitos, verificando-se policitémia, quando as glândulas supra-renais segregam cortisol em quantidades excessivas, ou por outro lado anemia, quando a supra-renal não segrega cortisol.²⁴⁴

5.5- Medição dos Valores do Cortisol

O cortisol livre presente no soro pode, comparativamente ao cortisol total, reflectir com maior acuidade, a função das supra-renais. O cortisol salivar tem uma elevada correlação com o cortisol livre presente no soro, sendo um substituto ideal do cortisol plasmático.^{44, 250}

O cortisol salivar é um meio aceitável, não invasivo (não causa stresse) e conveniente de medir a concentração do cortisol.^{44, 250} O cortisol plasmático é transferido rapidamente para a saliva e não é afectado pelo fluxo salivar.⁴⁴ Contudo, o cortisol salivar representa apenas 70% dos níveis de cortisol presentes no soro.²⁵⁰ Para além disso, em estudos experimentais (em ratos) a colheita salivar em quantidades suficientes para permitir um análise bioquímica é tecnicamente mais difícil que a colheita de sangue.²⁵⁰

5.6- Influência do Stresse nos Valores do Cortisol

A nível neuronal, estruturas como a amígdala estão envolvidas na detecção e avaliação de possíveis ameaças, enquanto estruturas como o córtex pré-frontal estão na regulação ou inibição das respostas a ameaças. A amígdala, localizada nos lóbulos temporais mediais, faz parte do sistema límbico e tem como principal função o processamento de memórias e de reacções emocionais.²⁵¹

Estudos prévios demonstraram o envolvimento da amígdala no processamento da informação relacionada com o medo ou ameaças, tais como expressões faciais ameaçadoras. A amígdala está também associada ao condicionamento do medo e às respostas biológicas ao stresse.²⁵¹

Para além de situações como traumatismos de qualquer tipo, infecções, calor ou frio intensos, intervenções cirúrgicas e doenças debilitantes, uma ampla variedade de estímulos não-específicos são capazes de causar aumentos pronunciados da secreção de cortisol pelo córtex supra-renal.²⁴⁴

Vários estudos utilizam como indicador de stresse, as alterações dos níveis de cortisol, os quais aumentam sob stresse agudo.⁴⁴ Como tal, o uso dos níveis salivares e plasmáticos do cortisol como indicador da actividade do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais e do stresse emocional está muito difundido.²⁵²

Estudos efectuados revelaram que os recursos psicológicos estão inversamente relacionados com a resposta do cortisol ao stresse. Taylor *et al* (2003),²⁵³ no seu estudo que integrava factores biológicos, psicológicos e neuronais revelou que doentes com uma auto-apreciação positiva têm uma diminuição da resposta cardiovascular ao stresse, uma recuperação mais rápida deste sistema e uma diminuição dos níveis de cortisol. A associação entre uma auto-apreciação positiva e os níveis de cortisol é mediada por recursos psicossociais, tais como optimismo, auto-estima, mestria, extroversão e apoio social. A reduzida actividade da amígdala medeia a ligação entre melhores recursos psicossociais e a diminuição dos níveis do cortisol. Estes resultados suportam o modelo no qual os recursos psicossociais conseguem reduzir os efeitos relacionados com o stresse, através do aumento da inibição pré-frontal por ameaças durante a regulação destas, ao invés de diminuir a sensibilidade a ameaças. Creswell e colaboradores (2005)²⁵⁴ concluíram também que indivíduos com recursos psicossociais elevados apresentavam menos stresse e, por conseguinte, menores níveis de cortisol.²⁵¹

Um indivíduo pode utilizar uma variedade de processos conscientes ou inconscientes para lidar com a ameaça. Quando comparados com indivíduos com poucos recursos

psicossociais, indivíduos com mais recursos psicossociais podem experienciar uma diminuição da resposta biológica ao stresse, pois os eventos têm menor possibilidade de serem encarados como uma ameaça e os indivíduos têm maior capacidade de a gerir, após ser detectada.²⁵¹

Apesar da libertação do cortisol em resposta a agentes stressantes reais ser adaptativa e essencial para a sobrevivência, a prolongada e intensificada activação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais tem demonstrado efeitos deletérios físicos e psicológicos. A exposição a níveis elevados de cortisol tem sido relatada em condições médicas como a hipertensão, aterosclerose, obesidade, resistência à insulina e desmineralização óssea.²⁵¹

Embora a maioria dos autores defenda a relação entre o aumento dos níveis de cortisol e a presença de agentes stressantes, ainda existe alguma discórdia entre estes. Schulz *et al* (1998)²⁵² e Melamed *et al* (1999)^{252, 255} concluíram que havia um aumento dos níveis de cortisol em indivíduos que referiam stresse, enquanto outros autores não conseguiram replicar estes mesmos resultados.^{252, 256-258}

Os actos de apertar e mastigar após um episódio de stresse alteram a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais diminuindo os níveis de cortisol.⁴⁴ Morita, num estudo com o objectivo de avaliar a relação entre o stresse e a mastigação, concluiu que em indivíduos sujeitos a stresse a mastigação de pastilhas elásticas originou relaxamento, o qual foi avaliado através de alterações dos valores de adrenalina, noradrenalina, hormona adrenocorticotrópica, cortisol plasmático, temperatura facial, pressão sanguínea, pulso e electrocardiograma.⁴⁴

5.7- Disfunções Temporo-Mandibulares e Cortisol

A literatura sobre a avaliação da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais nas DTM é escassa. Contudo, alguns estudos sugerem que pacientes com DTM exibem alterações na dinâmica do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais.⁸

As DTM's são condições relacionadas com o stresse, nas quais os pacientes apresentam, normalmente, um aumento marcado do cortisol durante o dia, bem como um atraso de uma hora no pico máximo do cortisol, os quais podem ser devidos à ruptura dos ritmos circadianos, tais como o ciclo do sono-vigília. Este aumento dos níveis de cortisol indica a provável activação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais. A sua hiperactividade pode representar uma resposta à dor, suportando assim o facto de o aumento do cortisol ser observado durante o dia, quando os pacientes estão acordados e cientes da dor. Outra

justificação para o aumento do cortisol durante o dia, pode ser a diminuição da resiliência do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais em doentes com DTM.²⁴⁵

De modo a apoiar esta hipótese, realizaram-se alguns estudos, nos quais pacientes com DTM exibem uma resposta do cortisol mais pronunciada ao stresse e um aumento de 30-50% dos níveis de cortisol no plasma, quando comparados com doentes sem DTM.⁸

A activação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais no stresse agudo está normalmente associada a analgesia e a hormona libertadora de corticotropina (CRH - *Corticotropin-releasing hormone*) pode afectar o processamento da dor quer a nível central, quer a nível periférico. Além disso, a hormona libertadora de corticotropina produz analgesia na dor dentária pós-operatória. Em contraste com a dor aguda, a exposição crónica ao stresse pode originar hiperalgisia.²⁴⁵

É possível que os elevados níveis de cortisol nas disfunções temporo-mandibulares sejam uma resposta fisiológica ao stresse, com a dor como possível agente causador de stresse associada à libertação crónica da hormona libertadora de corticotropina ou outros mediadores centrais do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais.²⁴⁵

Permanece em aberto a possibilidade de a dor na região facial provocar um maior estímulo para a activação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais, do que a dor proveniente de qualquer outro lugar do corpo. Por exemplo, num estudo de Derbyshire *et al*, 1994²⁵⁹ demonstrou-se que mulheres com dor facial atípica apresentavam diferenças nas respostas cerebrais à dor e tinham um aumento do fluxo sanguíneo no córtex cingulado anterior, enquanto o córtex pré-frontal apresentava uma diminuição.²⁴⁵

Algumas considerações como a inerente variabilidade interpessoal ou individual dos níveis de cortisol em função do período do dia, medicação e alimentação sugerem que esta inconsistência de resultados entre autores pode ser mais aparente do que real. Estes factores aumentam a probabilidade da existência de variações e pouca exactidão na determinação dos valores do cortisol, contribuindo, possivelmente, para a aparente relação entre stresse emocional e cortisol.²⁵²

5.8- Modelos Experimentais do Cortisol

5.8.1-Estudos experimentais em Humanos

Têm sido realizados diversos estudos em humanos, os quais relacionaram os níveis de cortisol salivar com sentimentos de angústia, factores psicossociais e efeitos da mastigação e do pressionamento inter-arcadas.

Vedhara e seus colaboradores, em 2002, examinaram a relação entre índices de angústia referidos por 54 mulheres de uma clínica de diagnóstico mamário (com suspeitas de doença) com as alterações dos seus níveis de cortisol. Foram aplicadas escalas de medição do stresse, da ansiedade e da depressão às participantes, bem como realizadas colheitas de amostras salivares, ao longo de um dia, para a medição do cortisol.²⁵² Foi possível concluir que existem alterações nos níveis de cortisol quando se examina a relação entre a angústia referida pelo próprio indivíduo e o cortisol. Sugere-se ainda que diferentes índices de angústia têm diferentes relações com o cortisol. Esta interpretação é limitada visto a experiência não ter um grupo de controlo e não ter tido em conta variáveis como a qualidade de sono e a ingestão de cafeína (o que poderia afectar não só os níveis de angústia, bem como os níveis de cortisol). Foi possível verificar uma relação aparente entre os níveis de angústia e os do cortisol.²⁵²

Jones, em 1997, realizou um estudo com mulheres, divididas em dois grupos: 39 no grupo controlo e 36 no grupo de doentes com disfunção da articulação temporo-mandibular. A hipótese a testar seria se as diferenças entre os dois grupos e as respostas do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais ao stresse estariam relacionadas com factores psicossociais, tais como estratégias utilizadas para lidar com a dor e a somatização de afecções negativas.²²⁵ O *Trier Social Stresse Test*, no qual os participantes tinham de fazer um discurso e cálculos aritméticos na frente de uma câmara, foi utilizado não só para induzir stresse, como para activar o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais.²²⁵ Foram recolhidas três amostras de saliva de cada participante: uma aos zero minutos (valores base), outra aos trinta minutos (no pico de secreção do cortisol) e outra aos cinquenta minutos (após vinte minutos de descanso). Os níveis de cortisol nos dois grupos, antes de serem submetidos a stresse, eram de aproximadamente 6 nmol/L. Após a indução de stresse, o grupo com DTM apresentou valores significativamente mais elevados das concentrações do cortisol salivar, de 12 nmol/L. O grupo de controlo apresentou uma resposta aumentada, mas sem significância estatística.²²⁵ Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo com DTM no uso

de técnicas para lidar com o stresse ou com outras variáveis psicológicas.²²⁵ O grupo dos doentes com DTM foi sub-dividido em dois grupos (o grupo Hi-SC com valores elevados de cortisol e o grupo Lo-SC com valores baixos de cortisol) de acordo com as respostas marcadamente diferentes ao stresse. Sugere-se que a sub-regulação dos glicocorticóides ou o sistema de *feedback* opiáceo endógeno possam ser a base de uma tendência biológica em hipersegregar cortisol no sub-grupo denominado Hi-SC. Não foi encontrada nenhuma relação entre os factores psicológicos e a hipersecreção de cortisol neste grupo. A resposta do cortisol no sub-grupo Lo-SC é semelhante à observada em indivíduos que sofrem de patologias relacionadas com o stresse. Baixas respostas do cortisol ao stresse parecem reflectir a acção da angústia psicológica crónica, possivelmente afectando a sobre-regulação dos glicocorticóides ou dos receptores opiáceos, ou afectando a capacidade do córtex supra-renal em manter a secreção contínua de cortisol.²²⁵

Outros estudos têm sido sugeridos, tais como a medição dos níveis plasmáticos de beta-endorfinas em conjunto com o cortisol, como foi feito por Hampf *et al.* (1989). Isto ajudaria a diferenciar a desregulação dos glicocorticóides dos sistemas de *feedback* como possíveis factores em populações com dor crónica. Seria também de utilidade medir a produção de ACTH em resposta ao stresse, de forma a auxiliar a determinação da desregulação na resposta do sistema hipotálamo-hipófise-supra-renais. Será necessário mais investigação para determinar de que forma as baixas respostas do cortisol ao stresse num dos grupos de pacientes com DTM diferem das respostas dos indivíduos do grupo de controlo e se os padrões de resposta são estáveis ou, alternativamente, mudam com o tempo.²²⁵

Tahara, em 2007, teve como objectivo investigar os efeitos da mastigação e do pressionamento inter-arcadas nos níveis de cortisol como indicadores de stresse. Para tal, efectuou a sua investigação em 17 indivíduos saudáveis, os quais efectuaram exercícios aritméticos durante um período de 20 minutos, de forma a desenvolver stresse.⁴⁴

Na primeira experiência, após indução de stresse, os indivíduos mastigaram um bloco de parafina enquanto liam livros e revistas em silêncio, durante 10 minutos. Foi efectuado o mesmo procedimento para fins de controlo, mas desta vez os indivíduos não mastigaram o bloco de parafina.⁴⁴ Na segunda experiência (com pressionamento ligeiro), após indução de stresse, os indivíduos efectuaram 5 segundos de pressionamento ligeiro, seguido de 5 segundos de repouso, por um período de 3 minutos. Todo o período de 3 minutos foi repetido três vezes. O controlo do segundo grupo consistia em medições nos períodos de descanso. Foram recolhidas amostras de saliva em ambos os grupos quer antes, quer após cada procedimento, durante intervalos de 1 minuto para medir os níveis de cortisol.⁴⁴ No grupo da

mastigação do bloco de parafina, os níveis do cortisol salivar estavam significativamente diminuídos em relação aos do grupo de controlo. Esta redução foi observada durante um período de 10 minutos após a indução de stresse. No grupo do pressionamento, os níveis também mostraram uma redução significativa, comparativamente com os controlos. Deste modo, é possível concluir que a mastigação e o pressionamento inter-arcadas promovem o relaxamento de indivíduos submetidos a stresse.⁴⁴

Butler e Stallard²⁶⁰ observaram que pacientes sob stresse exibiam contactos dentários mais frequentes e duradouros do que pacientes não submetidos a stresse. Um fenómeno semelhante tem sido reconhecido também em ratos, onde os animais submetidos a stresse exibem actividades semelhantes ao bruxismo, nos músculos masseteres.²⁸ Pelo contrário, outro estudo relatou não haver uma relação significativa entre a frequência do bruxismo e o stresse diário.¹⁹² Existe um número variado de artigos sobre este assunto, mas ainda não se chegou a uma conclusão consensual.⁴⁴

Pensa-se que, após a indução de stresse, os estímulos resultantes da actividade mastigatória moderada e do pressionamento inter-arcadas podem ser transmitidos ao cérebro, activando o mecanismo de controlo do stresse. Contudo, este mecanismo precisa permanecer por esclarecer.⁴⁴

5.8.2-Estudos experimentais em animais

Existe uma imensa literatura sobre a resposta ao stresse em modelos animais experimentais, particularmente nos ratos, o que nos permite chegar ao conhecimento de vários princípios importantes.

O conhecimento científico da actividade do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais na saúde e na doença é relativamente fraco, quando comparado com o conhecimento deste mesmo eixo no rato. Apesar de não se poder extrapolar directamente os resultados obtidos dos ratos para o Homem, a informação experimental em modelos animais é essencial e necessária para servir de base ao desenho de estudos apropriados em humanos.²²⁶

Tanto o rato como o Homem têm um ritmo circadiano da secreção do cortisol bem documentado e a fase em que este ritmo se encontra tem um efeito significativo na resposta a um agente stressante.²²⁶

Uma diferença entre ratos e humanos é a maior sensibilidade ao stresse que os ratos apresentam. Assim sendo, nos ratos, um agente stressante moderado pode provocar um

aumento marcado do cortisol para níveis semelhantes ao pico do ritmo diurno, enquanto no homem as respostas ao stress são muito mais discretas e frequentemente semelhantes à magnitude do pulsar fisiológico da secreção do cortisol.²²⁶ Tal facto origina questões éticas relativamente ao desenho de estudos experimentais bem controlados em humanos, pois não é eticamente correcto submeter humanos a níveis exagerados de stress físico, metabólico ou psicológico. Isto torna por vezes necessário recorrer a estudos observacionais em determinados grupos, sujeitos a stress, na população em geral (exemplo: estudos que usam populações de estudantes universitários), existindo uma maior dificuldade em esclarecer e isolar todas as variáveis, quando comparados com estudos experimentais controlados.²²⁶

A interpretação da informação resultante de indivíduos é severamente complicada devido à antecipação, o que não se coloca em estudos animais. Em estudos de modelos com animais, o início da actuação do agente stressante é claramente definido, tendo em conta que os animais estão alojados nos ambientes familiares das suas gaiolas e os agentes stressantes podem ser aplicados aleatoriamente, sem oportunidade de antecipação. Além disto, os indivíduos têm de ser completamente informados sobre a experiência de que farão parte. Nesta situação, torna-se muito complicado definir temporalmente o início de acção do agente stressante, daí ser também mais difícil analisar as respostas do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais. Os factores ambientais podem também influenciar a resposta do indivíduo.²²⁶

O “stress crónico” é outra das condições que necessita de ser avaliada, tendo em conta que raramente é observado isoladamente no Homem e que indivíduos sob estas condições podem apresentar, em simultâneo, outras que causem um aumento do cortisol, como é o caso da depressão.²²⁶

Existem variadas formas laboratoriais de induzir stress psicossocial, tais como imobilização, ambiente frio, inalação de vapores de éter, ruídos e caixa de comunicação. A caixa de comunicação é um meio eficaz de produzir stress, pois produz ansiedade experimental baseada na comunicação intra-espécies, sem stress físico directo.²⁴⁶

A literatura sobre as respostas ao stress em animais usados em modelos experimentais é extensa, particularmente em ratos. Tal facto permitiu a compreensão de diversos princípios, tais como:²²⁶

- a existência de uma variabilidade genética importante relativamente à magnitude das respostas ao stress;
- o aumento ou diminuição da capacidade de resposta ao stress do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais, devido a eventos precoces da vida;

- activação crónica das respostas neuroendócrinas ao stresse, as quais resultam em alterações hipotalâmicas;
- a grande plasticidade da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais ao stresse, como por exemplo as alterações reversíveis que ocorrem durante a gravidez e aleitamento;
- a variabilidade inter-individual na capacidade de resposta.

Na literatura existem inúmeros estudos experimentais com animais, que pretendem avaliar a presença de stresse através da medição da concentração sérica do cortisol.

Budtz-Jørgensen, em 1980 utilizou seis macacos *Macaca irus*, nos quais colocou uma goteira maxilar, de forma a aumentar a dimensão vertical da oclusão em 3-4 mm e a incorporar interferências na oclusão. Foram efectuadas medições dos níveis plasmáticos e urinários do cortisol. Na primeira e terceira semanas após a colocação da goteira, havia um aumento significativo dos níveis de cortisol, indicadores de stresse emocional relacionado com o trauma oclusal agudo induzido.²²⁸

Ishikawa e seus colaboradores, em 1994, investigaram, em 72 ratos *Wistar* machos, as características fisiológicas do stresse sociopsicológico induzido pelo método da caixa de comunicação e a sua influência no ritmo circadiano do cortisol. Os ratos foram divididos em três grupos: o primeiro era submetido a stresse físico, sendo este o grupo submetido a choque eléctrico na pata. O segundo grupo foi submetido a stresse sócio-psicológico, através da percepção das respostas do primeiro grupo aos choques e o terceiro grupo era o de controlo.²⁴⁶ Foram retiradas amostras sanguíneas para proceder ao doseamento do cortisol, seis vezes ao dia, no dia seguinte, ao 3º, 5º e 10º dias após a exposição ao stresse.²⁴⁶ Concluiu-se que a exposição prolongada ao stresse, induzido pela caixa de comunicação, influencia significativamente o ritmo circadiano do cortisol, aumentando a sua amplitude e mantendo os seus níveis elevados durante o período nocturno. Um maior aumento dos níveis do cortisol é observado após a aplicação de estímulos stressantes quando os seus níveis estão no seu ponto mais baixo e não quando o ritmo circadiano do cortisol apresenta um pico.²⁴⁶ Assim sendo, podemos concluir que o aumento dos níveis do cortisol, em resposta a estímulos stressantes, varia de acordo com a fase do ritmo circadiano.²⁴⁶ De acordo com este estudo, os níveis do cortisol demonstraram um aumento do ritmo circadiano na última metade do período de luz e um pico máximo duas horas após a luz ter sido desligada.²⁴⁶ Sugere-se, ainda, que o stresse sociopsicológico, induzido por este método, desempenha um importante papel na procura da etiologia de doenças humanas relacionadas com alterações do ritmo circadiano do cortisol.²⁴⁶

O mecanismo muscular subjacente ao stresse emocional não está bem compreendido e parece ser complexo.²³¹

Yong-Jin Chen *et al.*, em 2010, de forma a investigar os efeitos do stresse fisiológico nos músculos mastigatórios de ratos, nomeadamente no masseter, a nível da sua ultra-estrutura e do seu metabolismo energético, utilizaram uma caixa de comunicação. Para tal, foram utilizados 48 ratos *Wistar*, do género masculino, com aproximadamente 35 dias.²³¹ A caixa de comunicação é um método muito utilizado para induzir stresse psicológico nos animais. Os animais que não são submetidos a stresse são capazes de se aperceber das respostas dos seus vizinhos que estão sob a influência dos agentes stressantes, neste caso, o choque eléctrico na pata. Isto torna o grupo de animais, não submetidos a stresse, ansioso, podendo aumentar o nível de hormonas no plasma, como por exemplo o cortisol.²³¹ O êxito do procedimento deste estudo foi comprovado pela elevação dos valores séricos da ACTH. A concentração do cortisol foi de $12,46 \pm 2,67$ ng/ml (nanogramas) e $11,78 \pm 2,35$ ng/ml, no grupo submetido a stresse psicológico. Estes valores eram marcadamente mais elevados, quando comparados com os do grupo de controlo.²³¹

Neste estudo foram ainda observadas diferenças subtis, mas significativas, na ultra-estrutura dos músculos mastigatórios dos ratos submetidos a stresse. Por microscopia electrónica de transmissão foi possível observar mitocôndrias edemaciadas com perda das cristas e redução da densidade da matriz, em ratos submetidos a stresse durante três semanas, e severas alterações do vacúolo em ratos submetidos a stresse durante períodos de tempo mais alargados. Pode assim concluir-se que o stresse psicológico pode causar danos nas mitocôndrias e hiperémia dos capilares dos músculos mastigatórios, bem como causar alterações no seu metabolismo energético. Após longos períodos de stresse, as alterações podem ser mais severas. Isto pode ser o reflexo de um possível mecanismo para a patogénese das disfunções dos músculos mastigadores.²³¹

O stresse psicológico, tal como a ansiedade e a tensão, tem sido referido como um factor que provoca o aumento da mioelectricidade e excessiva actividade dos músculos mastigatórios, incluindo bruxismo.²³¹

6- A ENZIMA CREATINA-CINASE

6.1- Funções

A creatina-cinase (CK), também denominada creatina fosfocinase (CPK),²⁶¹⁻²⁶² é uma enzima que se encontra em abundância nos músculos.^{247, 261, 263} Apresenta grande importância para o metabolismo energético,²⁶³ tendo em conta que catalisa a transferência reversível do grupo fosfato entre a creatina-fosfato e o ATP.^{262, 264-266} Quando a necessidade de energia diminui, o ATP produzido pelo catabolismo é usado para reabastecer a reserva da creatina-fosfato através da reversão da reacção catalisada pela creatina-cinase.²⁴³ A reacção química apresenta-se na *Figura 3*.

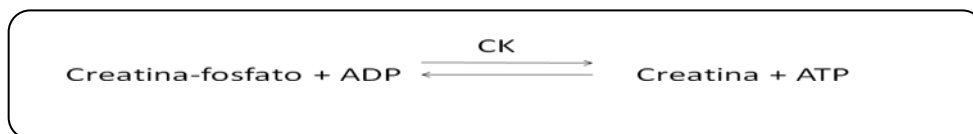


Figura 3 – Reacção química catalisada pela CK.

A creatina-fosfato é usada pelo músculo e por outras células para armazenar energia, sob a forma de ATP, numa forma prontamente disponível.²⁶²

6.2- Isoformas da Creatina-cinase e suas propriedades

Determinados tecidos possuem isoenzimas específicas, as quais influenciam os níveis totais da CPK.²⁶⁵

As células musculares expressam três sub-unidades das isoformas da CK: M, B (sub-unidades citosólicas) e mitocondrial.^{262, 264} As sub-unidades M e B formam as isoenzimas diméricas MM (presentes maioritariamente no músculo esquelético), MB (que se encontra no miocárdio) e BB (presente a nível cerebral).^{262, 265, 267}

O músculo esquelético contém a maior quantidade de CK, quando comparado com outros tecidos,²⁶⁵ com a isoforma MM a predominar, como referido anteriormente.^{265, 268} A CK-MM corresponde a 95% da CK total do músculo esquelético.²⁶¹

As isoformas da CK diferem, entre si, na sua composição por aminoácidos, nas suas constantes catalíticas e na respectiva mobilidade electroforética.²⁶⁸ Desta forma, visto cada isoenzima possuir diferentes propriedades electrostáticas,²⁶⁵ é possível determinar o conteúdo da isoenzima por separação electroforética.²⁶⁸

6.3- Distribuição da Creatina-cinase nas células e nos tecidos

A CK está presente em diferentes tipos de células, contudo apresenta-se no organismo em maior quantidade no citosol e nas mitocôndrias dos músculos esqueléticos e cardíacos. Para além das miofibrilhas, a CK pode estar, também, localizada em diferentes áreas celulares, como a mitocôndria, o retículo sarcoplasmático e o sarcoplasma.²⁶⁵ Um estudo realizado em ratos encontrou uma relação entre a CK-BB e a termoregulação dos animais. Revelou também que os ratos com deficiências neste tipo de CK apresentavam menor ganho de peso corporal, menor acumulação de gordura e adipócitos menores, sugerindo uma possível relação com o metabolismo lipídico. Os níveis de glucose, triglicerídeos e leptina também se encontravam diminuídos.²⁶⁹

As isoenzimas da CK estão localizadas também nos locais de produção de energia. Parte da CK MM citosólica, predominante no músculo esquelético, encontra-se associada a enzimas glicolíticas.^{264, 270-271}

A distribuição das isoenzimas da CK nos músculos depende do seu tipo de metabolismo. Nos músculos cardíaco e esquelético, de contracção lenta, com um nível permanentemente elevado de produção e utilização de energia, existe uma proporção relativamente elevada de CK mitocondrial e uma proporção das subunidades citosólicas relativamente baixa. Os músculos esqueléticos de contracção rápida, que têm o seu metabolismo baseado na actividade glicolítica, têm uma baixa proporção da isoforma mitocondrial e uma elevada proporção de CK citosólica. Estas diferenças na distribuição das isoformas da CK têm dado origem a hipóteses de existência de diferentes papéis do sistema da CK nos tecidos oxidativos e glicolíticos.²⁶⁴

6.4- O uso da Creatina-cinase como marcador de patologia muscular

A medição de enzimas presentes no soro é um método de diagnóstico bastante utilizado quando há suspeitas de doença muscular,²⁶¹ o que leva a CK a ser utilizada como marcador de dano no músculo cardíaco ou esquelético, desde há muitas décadas.^{247, 262}

A CK é o marcador preferível para avaliar o dano muscular, porque, ao contrário de outras enzimas presentes no músculo esquelético (como a aldolase, a desidrogenase láctica e as transaminases), tem uma relativa predominância neste tecido, não se encontra falsamente elevada por processos de hemólise e, uma vez que não se encontra ligada ao citoplasma das células, é prontamente libertada quando ocorre dano celular.²⁶¹

Apesar destas vantagens, a CK pode apresentar dificuldades de diagnóstico. Os seus valores podem encontrar-se elevados não só devido a miopatias ou doença cardíaca como há ainda que ter em conta a possível ocorrência de falsos positivos devido a situações transitórias normais, como câibras ou após actividade física, ou situações em que os seus valores base já se encontrem elevados.²⁶¹

Para além destas situações, também lesões directas no músculo, as quais podem ocorrer após isquémia, ou lesões devido a injeções intramusculares ou agulhas de electromiografia podem causar um aumento da presença da CK no soro. Alguns episódios patológicos não neuro-musculares como convulsões, psicose aguda e comportamento violento parecem aumentar também os níveis da CK no soro.^{247, 272 261, 266} O grau de elevação da CK em casos de dano muscular reflecte o processo subjacente da doença devendo-se, na maioria dos casos, a mionecrose ou defeitos de membrana.²⁶¹

Como cada tipo de isoenzima é específica para um tipo de tecido, é possível diagnosticar com maior precisão se o dano muscular provém do tecido muscular esquelético, cardíaco ou cerebral, consoante a elevação for a da isoforma MM, MB ou BB, respectivamente.²⁶¹

Em situações normais, o soro contém CK proveniente, predominantemente, do músculo esquelético, quase exclusivamente sob a isoforma CK-MM.²⁶¹

Os valores médios normais da CK no soro humano são difíceis de estimar, devido a variações inter-individuais e na população.²⁷³⁻²⁷⁴ Contudo, é possível afirmar que a raça negra apresenta geralmente valores mais elevados quando comparada com outras raças, os homens mostram concentrações mais elevadas desta enzima do que as mulheres e indivíduos com maior massa muscular podem também apresentar valores mais elevados.²⁶¹

Os valores serológicos da CK no Homem podem variar entre 22 U/L (unidades/litro) e 198 U/L.²⁷² Em casos de degradação muscular aguda, os níveis de CK podem aumentar para valores de 50,000 U/L até 200,000 U/L.²⁷²

Nuttali, no seu estudo, indicou que se poderiam encontrar 1754 U/L, por cada grama de peso de tecido muscular esquelético, em ratos.²⁷⁵

Matte realizou um estudo com ratos, com o objectivo de avaliar as diferenças da concentração da CK serológica em situações de stresse e de luta. De acordo com o seu estudo, os ratos do grupo de controlo apresentavam uma concentração serológica média de CK de 953 ± 329 U/L (unidades por litro).²⁷⁵

Em conclusão, como os níveis serológicos da CK variam com os estados fisiológicos e patológicos, na ausência de factores fisiológicos (como exercício excessivo) a estimativa de CK no soro é considerada um bom parâmetro bioquímico de investigação de doenças musculares.²⁶⁶ Apesar de todas as demonstrações de que a avaliação da concentração serológica da CK é um bom biomarcador, alguns autores referem esta enzima como um indicador de dano muscular pouco fiável,²⁷⁶ uma vez que o seu valor pode ser afectado por variações individuais, pelo género, pela intensidade e duração do exercício, pela predisposição genética e pela distribuição das fibras do músculo esquelético.²⁷⁷⁻²⁸¹

6.5- Modelos Experimentais da Creatina-cinase

6.5.1-Estudos experimentais em Humanos

Têm sido realizados alguns estudos em humanos referentes às variações da concentração da creatina-cinase em diversas situações, nomeadamente de elevado esforço físico.

Magal *et al.* (2009) estudou a actividade da creatina cinase após dano muscular induzido por exercício.²⁸¹ O protocolo de dano muscular excêntrico induzido provocou um aumento da creatina-cinase durante as 96 horas do período de recolha das amostras serológicas. Comparativamente com os valores-base ($146,2 \pm 32,2$ U/L), a creatina-cinase mostrava-se significativamente elevada 24 horas após o exercício. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os picos de creatina-cinase e os tipos de fibras musculares (I, IIa e IIb), apesar dos autores Epstein, Cohen-Sivan, Hirschorn, Khomenok, & Moran (2006)

sugerirem a existência de uma relação indirecta entre a creatina-cinase sérica e a percentagem de fibras musculares tipo II. Os valores da creatina-cinase obtidos neste estudo foram semelhantes ou ligeiramente inferiores aos obtidos em estudos semelhantes.²⁸¹⁻²⁸⁵

Com o objectivo de avaliar a existência de uma possível relação entre as concentrações séricas da creatina-cinase e a existência de disfunção temporo-mandibular, Cox realizou um estudo em humanos. Para tal, efectuou punções venosas em três grupos de indivíduos (o primeiro grupo consistia em sujeitos sem qualquer patologia temporo-mandibular, o segundo grupo era composto por pacientes disfuncionais e o terceiro grupo era formado por sujeitos sem patologia temporo-mandibular, mas aos quais foi indicado mimetizar movimentos parafuncionais durante três minutos). Não foram registadas alterações significativas na CK em nenhum dos grupos. Contudo, dois pacientes disfuncionais apresentaram resultados serológicos significativamente elevados.²⁶⁶

6.5.2-Estudos experimentais em animais

São vários os estudos experimentais em modelos com animais que procuram avaliar as funções da CK no tecido muscular e relacionar os valores desta enzima com o dano muscular, com o stresse e com o exercício físico.

De forma a estudar o papel da CK no tecido muscular, Veksler realizou um estudo em ratos com deficiência na isoforma M da CK. Os seus resultados confirmaram que os ratos mutantes eram anatomicamente semelhantes aos animais do grupo de controlo, sem diferenças macroscópicas a nível dos órgãos, nem alterações nas outras isoformas da CK. As principais alterações regiam-se pela diferente sensibilidade mitocondrial da CK ao ADP, nos músculos oxidativos e glicolíticos. Os resultados obtidos neste estudo mostram um diferente padrão de regulação da respiração mitocondrial pelo ADP e diferentes tipos de adaptação à deficiência da CK-M, dando apoio à hipótese dos diferentes papéis do sistema da CK nos músculos.²⁶⁴

Como é difícil avaliar o grau de dano dos músculos mastigatórios em humanos, foram introduzidos vários modelos de indução de microtrauma em animais. Inicialmente, utilizaram-se modelos com cães e suínos para avaliar a fadiga dos músculos mastigatórios induzida experimentalmente. Posteriormente, roedores e coelhos foram considerados modelos alternativos, uma vez que a fisiologia e a adaptação dos seus músculos mastigatórios estava bem estudada. Actualmente, os ratos são os animais mais escolhidos para este tipo de estudos porque os seus músculos mastigatórios têm uma área seccional menor e apresentam

vantagens na investigação dos efeitos das contracções excêntricas nos músculos dos membros.²⁸⁶

As fibras musculares esqueléticas são susceptíveis ao dano e à lesão por contracções excêntricas, particularmente quando contraem com carga e em elevada velocidade. Assim, o objectivo do estudo de Hutchins consistia na simulação mecânica das contracções dos músculos mastigadores de ratos *Sprague-Dawley* anestesiados e na determinação da ocorrência de fraqueza muscular e de sinais de microtrauma.²⁸⁶ Para tal, dividiu aleatoriamente 50 ratos por três grupos: o grupo de controlo, o grupo em que se efectuou abertura bucal passiva repetitiva e o grupo em que se efectuaram contracções isométricas tetânicas e repetitivas, com alongamento da abertura bucal.²⁸⁶ Em cada grupo foi avaliado o dano muscular através de parâmetros como a tensão contráctil, a creatina cinase plasmática e o glicogénio muscular.²⁸⁶ Relativamente à creatina cinase, detectou valores da sua concentração plasmática média no grupo de controlo, após 4 horas da realização do protocolo, de $17,9 \pm 1,5$ U/L. Este valor é significativamente inferior ao detectado nos grupos com manipulação experimental, já que nestes últimos a CK se encontrava significativamente elevada, quatro horas após os animais terem sido submetidos a contracção/distensão repetitiva. Contudo, esta elevação não se verificava às 72 horas.²⁸⁶ Hutchins concluiu, deste modo, que o aumento significativo da CK no plasma, após as contracções excêntricas simuladas, é semelhante aos resultados apresentados por humanos e por outros animais.²⁸⁶

O estudo de Matte e colaboradores utilizou ratos com nove semanas de idade. Estes foram submetidos durante nove semanas a um protocolo de diferentes condições stressantes, nomeadamente isolamento, imobilização, luta e banho frio. Após este período, os ratos foram sacrificados e foi colhido o seu sangue para análise dos valores da CK. Os resultados revelaram aumentos significativos da CK nos grupos submetidos a stresse (cerca de 2 a 30 vezes acima dos valores base, obtidos no grupo de controlo). Segundo o autor, tal pode indicar que as situações induzidas resultaram num aumento da actividade da CK muscular. Apesar da subida destes níveis, não se pode afirmar que tal se deva a uma alteração primária da membrana muscular, tendo em conta que o mecanismo de aumento da actividade da CK no tecido muscular, devido ao stresse, permanece obscuro.²⁸⁷ Matte fez também uma extrapolação dos seus resultados para o Homem, afirmando que o aumento da CK sob situações físicas exigentes poderia significar o aumento da actividade da CK no músculo.²⁸⁷

Armstrong *et al.* utilizaram a CK como um marcador bioquímico do dano muscular em ratos submetidos a exercício.²⁸⁶

Hallberg e seus colaboradores, no seu estudo, utilizaram suínos que dividiram em dois grupos: o primeiro grupo era composto por 16 animais resistentes ao stresse e o segundo grupo consistia em 16 animais susceptíveis ao stresse.²⁶⁵ Entre outros, um dos objectivos deste estudo era o de estudar os níveis das isoenzimas da CK no soro e determinar quais as isoenzimas responsáveis pela elevação da CK total no sangue.²⁶⁵ Os resultados obtidos foram os esperados. Os suínos susceptíveis ao stresse apresentaram níveis significativamente mais elevados de CK no soro, nas amostras recolhidas quer duas, quer quatro horas após a indução de stresse. Estes resultados estavam de acordo com os trabalhos de Woolf *et al.* (1970), Allen and Patterson (1971), Reddy *et al.*(1971) e Watson (1976). Os suínos susceptíveis ao stresse apresentavam a isoforma CK-MM em maior quantidade, no soro, contudo a diferença para o grupo controlo não foi significativa.²⁶⁵

Relativamente aos estudos com animais, há que ter em conta que a creatina-cinase pode encontrar-se elevada se estes apresentarem grande actividade física, como, por exemplo, lutas entre si.²⁶⁶ Matte detectou um aumento da CK em ratos agressivos.^{275, 287}

Yong-Jin Chen *et al.*, em 2010, de forma a investigar os efeitos do stresse fisiológico nos músculos mastigatórios de ratos, nomeadamente no masseter, a nível da sua ultra-estrutura e do seu metabolismo energético, utilizaram uma caixa de comunicação. Para tal, foram utilizados 48 ratos *Wistar*, do género masculino, com aproximadamente 35 dias.²³¹ Neste estudo foram observadas diferenças subtis, mas significativas, na ultra-estrutura dos músculos mastigatórios dos ratos submetidos a stresse. Por microscopia electrónica de transmissão foi possível observar mitocôndrias edemaciadas com perda das cristas e redução da densidade da matriz, em ratos submetidos a stresse durante três semanas e severas alterações do vacúolo em ratos submetidos a stresse durante períodos de tempo mais alargados. Pode assim concluir-se que o stresse psicológico pode causar danos nas mitocôndrias e hiperémia dos capilares dos músculos mastigatórios, bem como causar alterações no seu metabolismo energético. Após longos períodos de stresse, as alterações podem ser mais severas. Isto pode ser o reflexo de um possível mecanismo para a patogénese das disfunções dos músculos mastigadores.²³¹

7-ANFETAMINAS

7.1-Introdução

A anfetamina (1-metil-2-fenetilamina; sintetizada pela primeira vez na Alemanha em 1887)^{98, 288-290} foi introduzida na prática clínica em 1920 como tratamento para a asma⁹⁸, tendo sido comercializado em 1932 um descongestionante nasal que continha este composto.^{98, 291} Em 1959, a *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu estes inaladores devido ao seu consumo excessivo e potencial de abuso.⁹⁸

Há mais de 5000 anos que tem sido usada na medicina tradicional chinesa com o intuito de tratar doenças respiratórias. De origem vegetal é extraída a partir do composto químico efedrina (derivado da Ma huang).⁹⁸

Graças às suas propriedades farmacológicas, estes estimulantes foram amplamente utilizados e prescritos a muitos soldados durante a II Guerra Mundial uma vez que estimulavam e melhoravam o seu desempenho físico.^{98-100, 288} Nos anos subsequentes, verificou-se um aumento do fabrico e do consumo ilícito e clandestino destas substâncias.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Apesar da utilização clínica de anfetamina não ser aprovada na Europa, nos EUA este estimulante tem como indicações clínicas a síndrome de hiperactividade e défice de atenção e a narcolepsia.²⁸⁸

A anfetamina foi a primeira de um grupo de compostos com estruturas e propriedades farmacológicas semelhantes, coletivamente chamado de estimulantes do tipo anfetamínico (*amphetamine-type stimulants* ou ATS).^{99, 292 293}

7.2- Características farmacodinâmicas e farmacocinéticas da anfetamina e seus análogos

Os ATS são uma subclasse de psicoestimulantes caracterizados pela presença de a-metilfenilamina na estrutura nuclear.²⁹⁴ Derivados da feniletilamina, apresentam semelhanças estruturais com as catecolaminas (dopamina e adrenalina) e são potentes estimulantes do sistema nervoso central (SNC) com um importante potencial de abuso. Estas substâncias, para além da anfetamina, incluem também a metanfetamina (metilanfetamina ou desoxiefedrina), o ecstasy (MDMA ou 3,4-metilenodioximetanfetamina), o metilfenidato, a metcatinona e a fenetilina.²⁹⁵⁻²⁹⁶

Todas elas são estimulantes viciantes que activam diversos sistemas do SNC, sendo que a

metanfetamina se destaca por promover maiores efeitos.²⁹⁷

A anfetamina existe como dois estereoisómeros que diferem nos seus efeitos. A levoanfetamina (l-anfetamina) que produz mais efeitos periféricos e cardiovasculares do que a dextroanfetamina (d-anfetamina). Em relação à l-anfetamina, a d-anfetamina tem maior actuação a nível central do que periférico, provocando maiores efeitos estimulantes comportamentais.²⁹⁸ Neste estudo será utilizada a d-anfetamina.

A anfetamina e seus análogos são bases fracas lipofílicas, apresentando uma boa biodisponibilidade e grandes volumes de distribuição.⁹⁸ No Homem a semi-vida da anfetamina varia entre 7-32h em função do pH da urina, verificando-se uma acumulação no organismo após administração repetitiva. Não sendo passíveis a métodos de eliminação extracorporal, esta pode ocorrer por diversas vias, sendo sobretudo pela combinação da biotransformação hepática e dependendo do pH da urina de excreção renal.⁹⁸

Em ratos a sua semi-vida varia entre 20 a 50 minutos. Também se verifica igualmente acumulação no organismo após administração repetitiva.^{294, 299}

7.3-Efeitos Clínicos

As ATS produzem uma vasta gama de efeitos periféricos e centrais mediados pelo aumento maciço das aminas biogénicas dopamina, norepinefrina e serotonina na fenda sináptica.^{288, 294, 297}

As anfetaminas podem aumentar os níveis sinápticos de monoaminas, inibindo a sua reabsorção.^{294, 300} Como resultado da sua acção aguda verifica-se um aumento da neurotransmissão de dopamina, norepinefrina e serotonina. A metanfetamina e MDMA diferem na sua afinidade para os transportadores de monoamina.³⁰⁰

A entrada de anfetaminas no citoplasma da célula ocorre sobretudo através da recaptação neuronal de monoaminas transportadoras. Podem difundir-se ou ser levadas pelos terminais nervosos através destes transportadores e conseqüentemente causar um transporte reverso de monoaminas a partir do citoplasma para a fenda sináptica. Agem também como substratos competitivos para os transportadores e estimulam um mecanismo de difusão de trocas de forma a obter um transporte mediado pela libertação do neurotransmissor.^{98, 294, 300}

Levam assim à libertação de dopamina e de serotonina a partir das vesículas de armazenamento e previnem a absorção para as mesmas, aumentando as concentrações citoplasmáticas do neurotransmissor e tornando-as disponíveis para o transporte reverso. Esta acção parece estar na origem dos seus efeitos comportamentais e psicológicos.²⁹⁴

O quadro clínico típico traduz a saturação do sistema adrenérgico: taquicardia, taquipnéia, sudorese, hipertensão, midríase, hiperreflexia e tremor.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Estes efeitos periféricos das anfetaminas são sobretudo mediados pela interacção com o transportador de noradrenalina e estão associados a um aumento da concentração de noradrenalina extracelular.²⁹⁴

Na sequência da sua utilização por curtos períodos de tempo podem observar-se efeitos subjectivamente positivos como aumento da energia,²⁹⁴ atenção, vigília e diminuição da fadiga,³⁰⁰ mas também emoções e efeitos negativos como paranóia, ansiedade ou alucinações auditivas e visuais²⁹⁴, euforia, hipertermia e suores generalizados (eg. mãos suadas e dormentes), aumento da frequência cardíaca e respiratória, diminuição do apetite²⁹⁷, midríase, hiperreflexia e tremor.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Por outro lado, estas substâncias podem provocar dependência, vício, psicoses, défices na função neurocognitiva²⁹⁷ e perda de peso quando usadas durante longos períodos²⁹¹. Foram ainda descritas tonturas, dor de cabeça, irritabilidade,⁹⁹⁻¹⁰⁰ agitação, desinibição, hemorragia intracerebral, convulsões e coma.^{98, 101}

A principal queixa dos abusadores destas drogas é a xerostomia havendo diversos factores a contribuir para esta situação. Apesar de apresentarem sede, tornam-se hiperactivos e raramente param para beber água, levando a uma desidratação generalizada.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Segundo Connell, um dos sinais e/ou manifestações clínicas por toxicidade de anfetamina, é a perda de peso²⁹¹. Esta pode ser explicada pelo estado agudo de ansiedade.²⁹¹ Jones, avaliou o efeito da anfetamina no consumo de energia diário, pesos corporais diários, medidas diárias de taxa metabólica e quociente respiratório em ratos. Injecções de anfetamina durante o dia reduzem o consumo total de energia, produzem alterações bifásicas da taxa metabólica e os valores do quociente respiratório diminuem. Em contraste, as injecções nocturnas de anfetamina têm pouco efeito sobre o consumo de energia e taxa metabólica mas reduzem os valores do quociente respiratório nas primeiras 4 horas após a injecção. Estes efeitos mostram que as anfetaminas interagem com a organização circadiana do comportamento.³⁰¹ Ao nível do sistema nervoso central também se verificam várias alterações, como é o caso do bruxismo.⁹⁸⁻¹⁰²

7.4-Anfetaminas, Modelos Animais e Bruxismo

A hiperactividade é referida como uma sensibilização de comportamento e está relacionada com um aumento de libertação de dopamina estriatal.^{102, 294} Desta forma, drogas que alteram a estimulação dopaminérgica podem causar bruxismo. O uso de anfetaminas aumenta a actividade

locomotora, podendo este efeito ser reforçado através da administração repetida desta droga. Depois da última dose administrada, estes efeitos podem persistir durante meses.²⁹⁴

Em 1965 Aschcroft¹⁰² chamou a atenção para os movimentos não funcionais repetidos, incluindo o ranger de dentes (bruxismo) em consumidores de ATS.^{19, 98-102} Diversos estudos apoiam o envolvimento dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico centrais na etiopatogénese do bruxismo.^{30, 41, 94, 108}

Com efeito, o uso destas substâncias aumenta a actividade locomotora e os movimentos estereotipados (incluindo bruxismo) podendo este efeito ser reforçado através da administração repetida desta droga como acontece em cenários de abuso e dependência.¹⁰⁰

Animais experimentais sujeitos a doses agudas e elevadas de anfetamina apresentam alterações dos neurónios dopaminérgicos que inervam o corpo estriado; bem como animais expostos a elevadas doses de MDMA que alteram os neurónios serotoninérgicos.²⁸⁸

A administração parenteral em roedores pode produzir aumento ou redução de axónios dopaminérgicos, redução dos terminais dopaminérgicos e défices de serotonina. Défices em terminais nervosos nem sempre são acompanhados por lesão aparente dos órgãos que contêm dopamina nos corpos celulares da substância negra, no entanto podem durar durante anos, mesmo após a abstinência. Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade da anfetamina não foram completamente identificados.²⁸⁸

Durante o consumo de drogas, os consumidores tornam-se extremamente activos. Como resultado, ficam inquietos, ansiosos, irritados, cansados, disfóricos⁹⁹⁻¹⁰⁰ e aumentam a contracção muscular.¹⁰² Tal leva ao ranger dos dentes e bater dos maxilares, contribuindo assim para discrepâncias oclusais e para o desgaste dentário.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Além destes sintomas, a saúde oral geral apresenta elevada decadência, também devido à hipossalivação e muitas vezes à inexistência de higiene. O carácter ácido destas drogas, principalmente quando fumadas, e a xerostomia associada, contribuem para a erosão do esmalte e para a fractura dentária.⁹⁹

Estudos realizados em ratos, mostraram que o aumento da actividade mastigatória não funcional pode ser induzido pela estimulação repetida do sistema dopaminérgico com apomorfina (agonista dos receptores de dopamina). Tal provoca uma estimulação repetida do sistema dopaminérgico, que por sua vez induz o aumento da actividade mastigatória não funcional, estando estes movimentos mastigatórios relacionados com a taxa de atrição incisal. Foi igualmente observado que o bruxismo ocorre sobretudo durante a transição entre o sono e a vigília, ao mesmo tempo que os neurónios dopaminérgicos exercem os seus efeitos excitatórios nas áreas motoras corticais e límbicas.^{19, 102} Um distúrbio no sistema nervoso simpático pode também estar envolvido.

102

8-ACUPUNCTURA

A acupunctura teve origem na China, há mais de 3000 anos, sendo uma prática terapêutica integrante da Medicina Tradicional Chinesa, que visa a prevenção ou o tratamento de inúmeras doenças.³⁰²⁻³⁰³ Quando chegou à Europa Ocidental, começou a ser usada como terapia em casos de doenças crónicas ou em pacientes que não respondiam a mais nenhum tipo de tratamento³⁰⁴ e ganhou popularidade e aceitação como uma ferramenta valiosa no controlo e alívio da dor.³⁰⁵⁻³⁰⁷ A acupunctura foi evoluindo ao longo dos anos e assim têm nascido diferentes explicações sobre o seu modo de actuação.³⁰⁵

A acupunctura é essencialmente uma técnica que corrige malfunções fisiológicas reversíveis de várias partes do corpo, por meios fisiológicos.³⁰⁸ A sua eficiência parece ser elevada como sedativo, anti-inflamatório, anestésico e analgésico, regulando ainda o Sistema Nervoso Central (SNC), Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema neurovegetativo.³⁰⁴ A acupunctura é considerada um tratamento convencional utilizado em conjunto com medicamentos e procedimentos cirúrgicos.³⁰⁴

Sabe-se que a acupunctura é benéfica no alívio da dor, mas também em disfunções musculares e de tensão, patologias de ordem psicossomática e desregulação dos sistemas linfático e imunitário, tal como foi confirmado por vários estudos.³⁰⁹ De acordo com a OMS, a acupunctura é útil como terapêutica adjuvante em mais de cinquenta patologias, incluindo o stresse crónico.³¹⁰ Apesar de tudo isto, sabe-se que possui também um enorme efeito placebo.³¹¹⁻³¹²

Esta prática envolve a inserção de finas agulhas em várias partes do corpo com intenção curativa³⁰⁶, baseando-se na premissa da Medicina Tradicional Chinesa de que existem padrões de energia -Chi- que fluem através do corpo. As interrupções destes fluxos de energia e o conseqüente aparecimento de doenças, pode ser corrigido através da acupunctura.^{169, 313} O Qi flui através dos meridianos, ao longo dos quais estão localizados os pontos de acupunctura.³¹³ Segundo *A Academia de Medicina Tradicional Chinesa, 1975*, existem 361 pontos, na sua maioria dispostos em "meridianos", sendo que cada um recebe o nome de um órgão do corpo.³⁰⁴ Os pontos de acupunctura estão organizados em meridianos. Todos os pontos estão numerados em sequência e normalmente têm o nome de um órgão, embora não estejam associados a ele.³⁰⁴

Nos anos 70, a investigação nesta área começou a fornecer os meios para compreender os mecanismos envolvidos na acupunctura. O estudo de Han & Terenius (1982)³¹⁴ comprovou que a acupunctura provoca a libertação de endorfinas. A associação da

acupunctura e das endorfinas, denominada de peptídeos opióides endógenos, facilitou o estabelecimento de credibilidade desta terapia, a qual foi reforçada ao longo dos anos pela descoberta de outros mecanismos de acção.³⁰⁴

A estimulação por agulhas de forma propositada, aplicada a pontos específicos da pele ou mucosa activa a auto-regulação do organismo e as suas capacidades moduladoras.³⁰⁹ Um dos resultados mais importantes na investigação da dor é a activação de endorfinas e neurotransmissores quando os estímulos da acupunctura estão a ser aplicados.³⁰⁹ Os resultados de alguns estudos clínicos e com animais demonstraram evidência no envolvimento do sistema nervoso autónomo e do sistema endócrino na acção da acupunctura. Estudos laboratoriais com humanos e com animais demonstraram que a acupunctura causa múltiplas respostas biológicas que ocorrem localmente e à distância.³⁰⁸

8.1-Mecanismo de acção da Acupunctura

Uma variedade de mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos analgésicos da acupunctura. Estes mecanismos são baseados em conceitos que variam desde perspectivas tradicionais que se centram nos desequilíbrios do fluxo de energia (Chi) através do corpo, até aos conceitos modernos ocidentais de que o stresse activa sistemas neurais e opióides endógenos.³¹² A investigação moderna sobre dor descobriu vários efeitos da acupunctura, providenciando, ao mesmo tempo, explicações neurofisiológicas.

O envolvimento de sistemas analgésicos clássicos tem sido comprovado pela neuroimagem e por estudos em animais e humanos.³¹⁴⁻³¹⁷

Os diferentes mecanismos de acção envolvem o SNC, os músculos e ainda alguns efeitos locais.³⁰⁴ Com a inserção da agulha, há um aumento no sangue e no cérebro dos níveis de β -endorfina, endomorfina, encefalina, serotonina e dopamina.³⁰² Podem ocorrer efeitos locais, analgesia segmentária, analgesia extra-segmentária e efeitos reguladores centrais.³⁰⁴

A nível central, sabe-se que a acupunctura activa as fibras nervosas mielínicas encontradas nos músculos. Estas fibras enviam o impulso para a medula espinhal, activando assim o mesencéfalo, o hipotálamo e a hipófise. Foi demonstrado que participam deste processo a encefalina, β -endorfina, dinorfina, serotonina e noradrenalina.³¹¹

A nível local, sabe-se que a inserção da agulha num ponto de acupunctura origina a chamada sensação de Qi, a qual é representada pela sensação de dormência, distensão, peso e dor.^{304, 318-319} Cria, também, um pequeno processo inflamatório, e consequente libertação de neurotransmissores como a bradicinina e histamina, entre outras, e subsequente estímulo das

fibras A- δ localizadas na pele e nos músculos. As fibras A- δ impedem a transmissão do impulso e da sensação de dor através da libertação da encefalina. A vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo local e formação de neovasos facilitam a reparação tecidual.³²⁰ Este modelo segmental é o modelo de acção mais simples e corresponde ao efeito analgésico da acupunctura na maioria dos casos.³¹¹

8.2-Efeitos secundários

Os efeitos secundários mais comuns, segundo Ernest e White, são dor devida à penetração da agulha (1 a 45%), cansaço (2 a 41%) e hemorragia (0,003 a 38%). O desmaio e a síncope são pouco frequentes (0 a 0,3%), mas por outro lado o relaxamento é relatado pela maior parte dos indivíduos (86%).³²¹

Os efeitos adversos *minor* são bastante comuns, mas transitórios: dor ao perfurar a pele, hemorragia no local da perfuração ou hematoma, fadiga e cefaleia ligeira.³²¹

Os mais sérios, embora raros, são a perfuração de órgãos (pneumotórax). Estes efeitos adversos ocorrem devido ao pouco treino dos terapeutas ou à prática ilícita (sem licença para a prática clínica). O conhecimento de anatomia e o manuseamento correcto das agulhas são fundamentais e suficientes para evitar ou minimizar que este tipo de problemas ocorra na prática corrente normal.³²¹

8.3- Acupunctura no tratamento das DTM's

A acupunctura tem sido utilizada para o tratamento de DTM assim como de outras dores de origem músculo-esquelética, por ter uma analgesia de curta duração.^{305, 315}

Em casos de dor do sistema estomatognático, e disfunção da ATM, pontos remotos situados nas mãos, esterno e área retromolar mandibular têm sido indicados como eficientes.³⁰⁹

A dor muscular é um dos sintomas mais comuns das disfunções mandibulares. Uma das observações efectuadas durante o tratamento com acupunctura de indivíduos com disfunções mandibulares e dor miofascial foi o facto de os pontos de acupunctura

normalmente coincidirem com zonas dos músculos mastigatórios que exibiam sensibilidade à palpação.³⁰⁷

Segundo várias revisões sistemáticas concluiu-se que a acupunctura pode ser uma terapia a curto-prazo eficaz para a dor miofascial dos músculos do sistema mastigatório.^{313, 322-325}

A revisão sistemática de Cho revelou evidência moderada na eficácia da acupunctura no tratamento das DTM's (englobando dor muscular e articular) e redução dos sintomas por elas provocados. Os efeitos da acupunctura são a curto-prazo, mas trazem importantes benefícios clínicos.³²³ Refere também que os resultados da acupunctura são equivalentes a outros tratamentos como goteiras oclusais e fisioterapia.³²³

De acordo com a revisão sistemática de La Touche (2010), existe evidência dos efeitos benéficos da acupunctura, mas é limitada em quantidade; existem efeitos benéficos a curto prazo no tratamento de DTM com origem muscular; a acupunctura local apresenta melhores resultados, mas em pontos distantes também tem eficácia. Este autor sugere o uso dos pontos ST-6, ST-7 e LI4 no tratamento de DTM com origem muscular.³²⁴

Apesar de existirem vários estudos sobre a eficácia da acupunctura no tratamento das DTM's e dor miofascial, é difícil encontrar estudos que relacionem directamente os efeitos da acupunctura no bruxismo.

8.4-Acupunctura e Pontos de Gatilho Miofasciais

O ponto de gatilho miofascial pode ser definido como uma zona hipersensível inserida numa banda tensa do músculo-esquelético, localizada no tecido muscular ou na fásia associada. Pode estar activo, provocando dor, ou latente. Um ponto activo pode tornar-se latente com o tratamento, assim como o inverso.³⁰⁴ O tratamento destes pontos pode ser dividido em invasivo e não-invasivo. Recentemente, tem aumentado o uso de terapias invasivas, em particular o agulhamento.³²⁶⁻³³³

Apesar da utilização da acupunctura em pontos de gatilho estar bem documentada na literatura este não é o objectivo deste estudo.

8.5- Acupunctura e Stresse

Poucos estudos investigaram os efeitos da acupunctura na resposta ao stresse. Estes utilizaram modelos com animais, revelando evidência de que a acupunctura reduz os níveis de noradrenalina quer no cérebro, quer no sangue; reduz a secreção de hormonas adrenais em animais submetidos a imobilização como factor de stresse; induz uma depressão comportamental e cardio-vascular de longa duração em ratos hipertensos e produz um efeito ansiolítico em animais submetidos a stresse de natureza restritiva.³⁰⁸

Yang, 2002, no seu estudo em ratos *Sprague-Dawley* sujeitos a imobilização como agente stressor, demonstrou que a electroacupunctura diminuiu a tensão arterial e a frequência cardíaca e aumentou os níveis de catecolaminas no sangue dos animais.³⁰⁸

Vários estudos realizados em humanos³³⁴⁻³³⁸ e roedores³³⁹⁻³⁴⁰ comprovam que a acupunctura tradicional é eficaz no tratamento do stresse, quando esta é realizada nos pontos de acupunctura certos e de forma correcta.

Parte B

Estudo Experimental em Modelo com Animais

1- OBJECTIVOS

Este estudo experimental pretende avaliar “in vivo”, através de um protocolo de indução de stresse, pela administração de anfetamina e pelo tratamento com acupunctura, os seguintes parâmetros:

- a gravidade dos movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) e da atrição incisal induzidos pelo stresse, anfetamina e tratamento com acupunctura, bem como a influência destes últimos nestes parâmetros.

- alterações da concentração sérica do cortisol e da creatina-cinase após a indução dos MMNF.

- alterações do peso do timo, baço e glândulas supra-renais em função da indução de stresse, administração de anfetamina e tratamento com acupunctura.

2. ESTUDO IN VIVO

2.1-Amostra

O presente trabalho experimental foi desenvolvido com base numa amostra constituída por 40 ratos machos da estirpe Wistar (divididos em 4 grupos de 10 elementos, Charles River), adultos, com 9 semanas de idade aquando o início do estudo, e com pesos compreendidos entre 290g e 325g.

Os animais utilizados, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foram submetidos a um período de quarentena de oito dias, com a finalidade de confirmar a inexistência de qualquer tipo de patologia. A necessidade de incluir apenas animais do sexo masculino pretende evitar influências hormonais no processo experimental.

2.2-Manutenção, manipulação e bem-estar animal

A selecção, manutenção, garantia de bem-estar e avaliação das condições gerais de saúde dos animais foram efectuadas por técnicos qualificados do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), de modo a excluir todos aqueles que apresentavam patologias crónicas ou agudas, do tipo infeccioso ou outros, respeitando o protocolo aprovado na instituição e de acordo com a legislação em vigor.

A manutenção e manipulação dos animais foram executadas no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Foi efectuado um registo individual para cada um dos animais, no dia de chegada, que incluía uma descrição do seu estado clínico e peso. Após uma avaliação inicial por um técnico veterinário qualificado, os animais foram aleatoriamente colocados, dois a dois, em gaiolas metálicas, adequadas à sua espécie, com espaço suficiente para se movimentarem. Cumpriram, antes de qualquer intervenção, um período de quarentena de uma semana.

Os animais foram mantidos em condições padronizadas de climatização do biotério (temperatura de 22°C, 60-65% de humidade e renovação de ar) e de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro). Estas condições foram permanentemente monitorizadas e registadas.

Todas as gaiolas foram identificadas com as seguintes informações: responsável pelo projecto, estudo em causa, número do animal, sexo e alguma indicação especial, caso necessário. Os animais foram igualmente identificados através de marcas, feitas com caneta de acetato na cauda, permitindo a sua identificação individual e da gaiola a que pertenciam.

A dieta foi providenciada com ração seca, de origem comercial, com concentrações controladas e analisadas pelo fabricante. Foi fornecida água *ad libitum*, com origem no sistema de abastecimento municipal. Não se supõe que, quer a ração quer a água, tenham causado qualquer risco de interferência nos resultados do presente estudo.

A vigilância para rastreio de alterações patológicas, por parte dos técnicos veterinários qualificados do biotério, foi diária.



Figura 4- Imagem de uma gaiola de alojamento

2.3- Protocolo experimental

Os protocolos experimentais estiveram de acordo com a autorização da Comissão Consultiva do Bem Estar Animal e de Protecção dos Animais utilizados para Fins Experimentais e/ou outros Científicos, da Direcção Geral de Veterinária, sendo observadas as normas técnicas de protecção do rato, como animal de experimentação que constam da legislação Portuguesa actualmente em vigor (Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro; Portaria nº 466/95, de 17 de Maio; Portaria nº1131/97 de 7 de Novembro) e na Legislação da Comunidade Europeia para o Bem Estar Animal (Diretiva Nº86/609/CEE de 24 de Novembro de 1986).

2.3.1- Grupos experimentais

Os 40 ratos Wistar machos, adultos, com 9 semanas de idade no início do estudo, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, cada um dos grupos constituído por 10 ratos:

Grupo I – Grupo de controlo negativo – Grupo de controlo mantido sem qualquer manipulação experimental (sem indução de stresse ou injeção de anfetaminas).

Grupo II – Grupo de controlo da manipulação experimental – Grupo experimental ao qual foi efectuado o protocolo de indução de stress, e no qual foi injectado diariamente Soro Fisiológico e não o agente indutor. Os animais deste grupo funcionam como controlo para verificar o padrão de alterações produzidas pela manipulação animal. Para isso injectamos, diariamente, solução salina neste grupo de ratos, durante 14 dias.

Grupo III - Grupo com protocolo de indução – Para induzir movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) injectou-se anfetamina por via intraperitoneal, segundo um protocolo de habituação, com doses sucessivamente maiores durante 14 dias. A anfetamina foi administrada diariamente, de acordo com o peso que foi sendo reavaliado todos os dias.

Grupo IV – Grupo com indução e tratamento – Foi administrada anfetamina por injeção intraperitoneal, seguindo o mesmo protocolo efectuado no Grupo III e foi feita acupunctura duas vezes por semana, no músculo masseter.

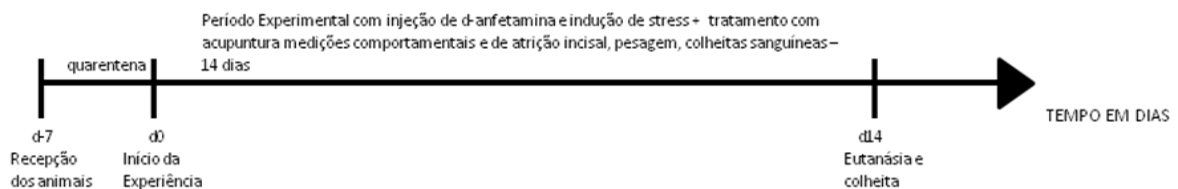


Figura 5- Esquema do desenho experimental.

2.3.2- Pesagem dos animais

Em todos os grupos experimentais, a pesagem dos animais foi realizada de dois em dois dias, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

A pesagem foi efectuada com o auxílio de uma balança digital e de um recipiente de plástico que permitia a imobilização do rato no seu interior.

2.3.3- Medidas pré-anestésicas

A manipulação destes animais para administração de fármacos anestésicos ou outros pode apresentar algumas dificuldades, mesmo para profissionais com bastante experiência. Os ratos assustam-se com facilidade quando em situações de stresse, efectuam movimentos violentos dos membros e procuram agarrar-se à gaiola ou a outros pontos de tracção. Assim, torna-se importante recorrer a pessoal devidamente treinado de modo a providenciar uma manipulação adequada, bem como um ambiente tranquilo.

Para além de um cuidadoso manuseamento, foi colocado um pano escuro e opaco sobre a cabeça e o corpo de cada animal, com o objectivo de o relaxar, proteger e restringir a acção dos seus membros anteriores e posteriores.

2.3.4- Anestesia

Os ratos dos quatro grupos experimentais foram anestesiados previamente à realização das marcas dentárias. Como anestesia foi utilizada uma combinação anestésica de cloridrato de cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e cloropromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória), administrando aproximadamente 0,5ml/100g de animal, por via intraperitoneal.

Com a utilização desta combinação anestésica, o início de acção da anestesia surge normalmente em 10 minutos, permitindo uma tolerância cirúrgica de 20 a 40 minutos, obtendo-se um bom relaxamento muscular.

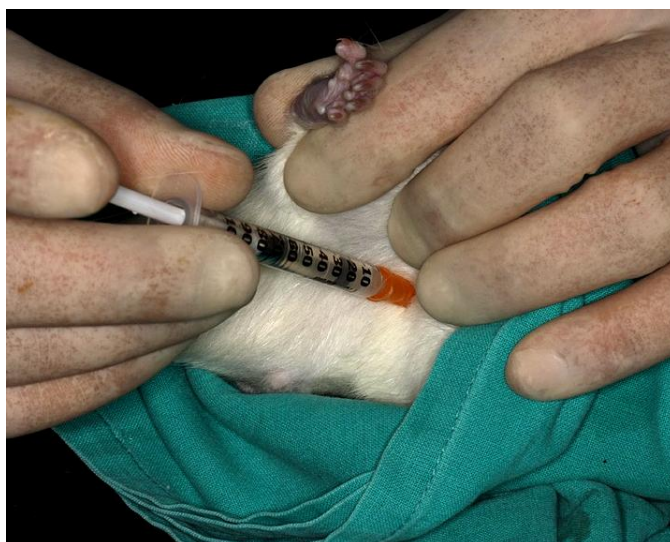


Figura 6- Administração de solução anestésica por via intra-peritoneal.

2.3.5- Marcas dentárias / Atrição incisal

Com o intuito de avaliar a atrição incisal efectuou-se, em todos os grupos experimentais, uma marca dentária nos incisivos centrais inferiores dos ratos.

O método de avaliação da atrição incisal é um método de fácil execução, o qual requer um grupo de controlo, de modo a possibilitar a comparação com os resultados obtidos nos grupos de indução. Este método pode ser utilizado na avaliação do stresse induzido, bem como na avaliação da gravidade dos movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF).

Para efectuar estas marcas, os animais foram anestesiados e protegidos com um pano, de modo a expor apenas a zona de intervenção (cabeça e cavidade oral).

As marcas foram realizadas na superfície vestibular dos incisivos inferiores, junto à zona cervical do dente, com um disco montado em peça de mão a baixa velocidade e com irrigação adequada. Estas foram efectuadas 24 horas antes do início do período experimental e da exposição aos agentes stressantes e/ou início da injeção de soro ou d-anfetamina.³⁰

No dia em que as marcas foram efectuadas (dia 0), mediram-se as distâncias entre estas e o bordo incisal dos incisivos centrais (X1), com o auxílio de uma craveira digital. No sétimo dia experimental, como as primeiras marcas estavam já muito próximas do bordo incisal, efectuaram-se novas marcas junto à zona cervical e a medição da distância entre a primeira e a 2ª marca (X2). No último dia mediu-se a distância entre a segunda marca e o bordo incisal (X3). O grau de atrição incisal foi obtido através da soma das subtracções das medidas iniciais pelas medidas finais.

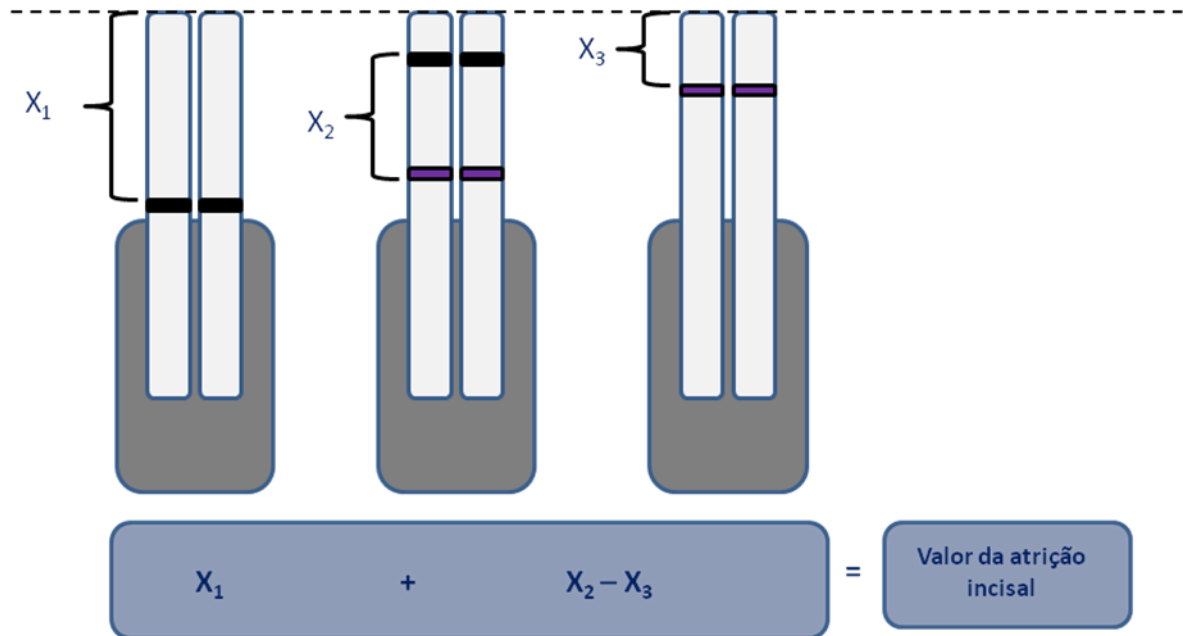


Figura 7- Esquema da medição da atrição incisal.



Figura 8- Realização das marcas dentárias com um disco montado em peça de mão.

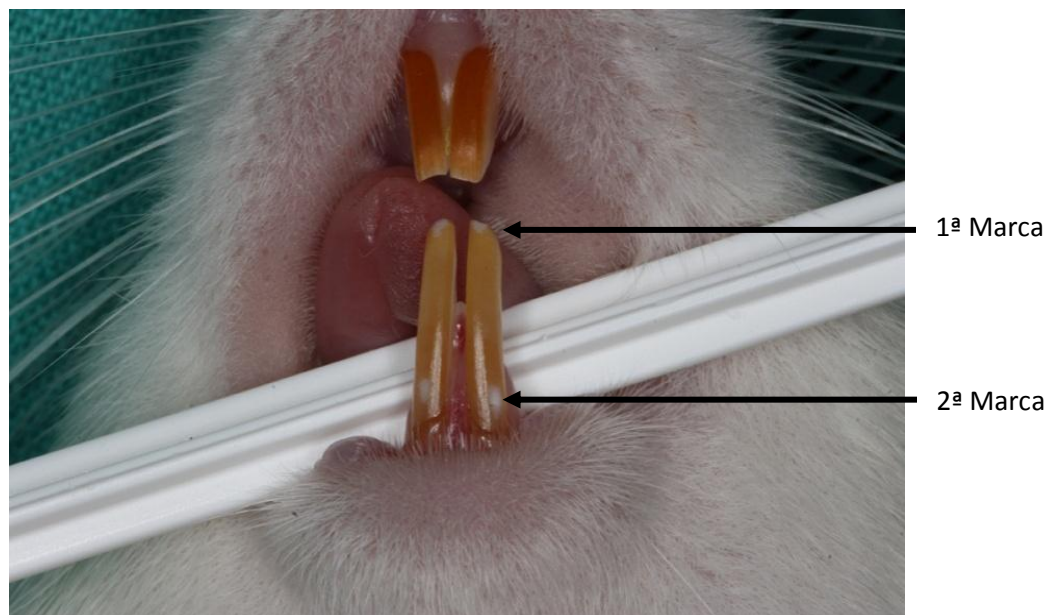


Figura 9- Observação das marcas dentárias

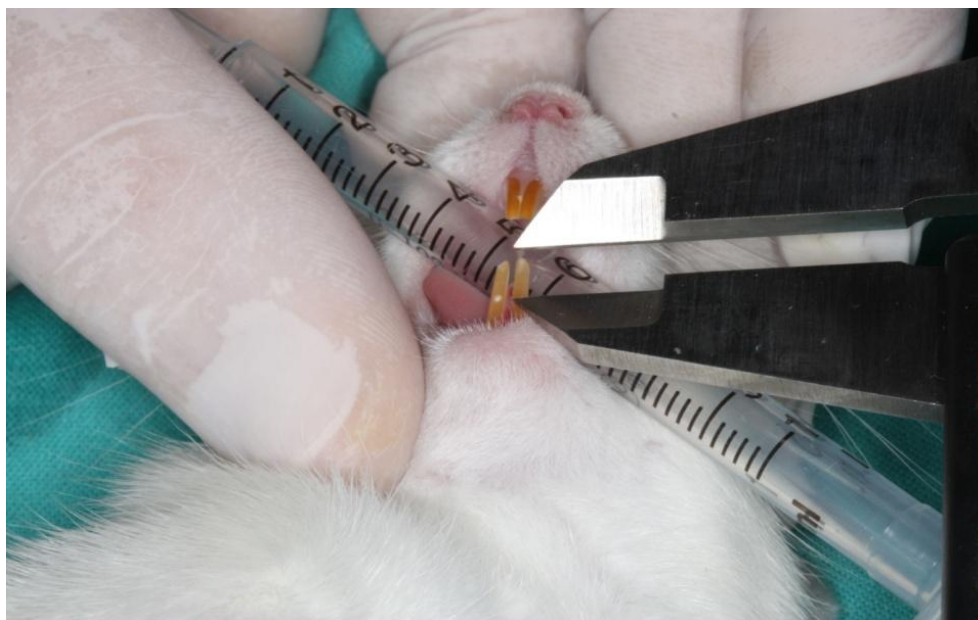


Figura 10- Medição da distância das marcas ao bordo incisal, com craveira digital

2.3.6- Recuperação da anestesia

Após a elaboração das marcas dentárias efectuadas em todos os grupos experimentais, os animais recuperaram numa sala de recobro, escura, silenciosa e confortável, durante 2h. Este é um período fundamental para permitir o conforto e o bem-estar dos animais, reduzindo desta forma a magnitude das respostas metabólicas à manipulação experimental.

Foram constantemente vigiados em relação à hipotermia e à aspiração de água ou comida, sendo mantidos dois animais em cada gaiola, embora monitorizados de forma a evitar agressões. As gaiolas estavam limpas de qualquer material que pudesse interferir com as vias respiratórias e isentas de qualquer material que pudesse ser responsável por eventuais traumatismos no início da recuperação da locomoção.

Foi efectuado um controlo pós-operatório, nos dias seguintes, através de uma monitorização diária de eventuais alterações aos hábitos normais de ingestão de comida ou água, do peso corporal, dos padrões de comportamento considerados próprios da espécie e ainda da presença de sinais clínicos ou reacções anómalas à espécie.

2.3.7- Injecção de solução salina e de anfetaminas

As injeções de soro e anfetaminas foram administradas por via intraperitoneal, diariamente, entre as 9 e as 11:30 horas.³⁰ Previamente a cada injeção, os ratos foram ambientados ao local onde a experiência decorreu, durante cerca de 15 minutos.³⁰

No Grupo experimental II injectou-se soro fisiológico, enquanto nos Grupos experimentais III e IV injectou-se d-anfetamina. O Grupo I, sendo o grupo de controlo, não foi submetido à injeção de nenhuma substância.

As injeções de soro e de anfetamina foram efectuadas 15 minutos antes da indução de stresse, segundo os protocolos posteriormente descritos.

Para induzir movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) injectamos d-anfetamina, por via intraperitoneal segundo um protocolo de habituação, com doses sucessivamente maiores durante 14 dias. A d-anfetamina foi administrada durante os 7 dias da semana, de acordo com o peso que foi reavaliado diariamente.

Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Dose única														
diária	0,8	1,6	2,4	3,2	4,0	4,8	5,6	6,4	7,2	8,0	8,8	9,6	10,4	11,2
(mg/kg)														

Figura 11: Protocolo de doses crescentes de anfetamina utilizado

2.3.8- Agentes stressantes

Existem variadas formas laboratoriais de induzir stress psicosocial, tais como imobilização, ambiente frio, inalação de vapores de éter, ruídos e caixa de comunicação, entre outros.^{30, 246}

Para avaliar o efeito do stress no bruxismo e na atrição incisal, os ratos dos Grupos II, III e IV foram expostos a um conjunto de agentes stressantes, usando um protocolo variável durante os 14 dias.

De entre os vários agentes disponíveis foram seleccionados, como agentes stressantes: ruídos (urbanos, de espécies predadoras e uma mistura de ambos), aglomeração e vibração corporal.

Segundo alguns autores, a repetição da exposição dos animais ao mesmo tipo de agente stressante evoca a diminuição da resposta hormonal de sessão para sessão.^{246, 267, 341-344} Assim, tendo em conta que os ratos apresentam uma capacidade de adaptação fisiológica ao stress induzido repetidamente pelo mesmo agente³⁴¹, os agentes stressantes seleccionados foram aplicados de forma intercalada, em função dos dias de experimentação (14 dias), da seguinte forma:

1º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 1 (através da utilização de sons urbanos: veículos, multidões, entre outros)

2º Dia de manipulação experimental - protocolo de realização de aglomeração (através da colocação de 5 ratos por gaiola em competição por água e comida durante 12 horas)

3º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 2 (através da utilização de sons de espécies predadoras: aves, cães, lobos, entre outros)

4º Dia de manipulação experimental - protocolo de vibração corporal (através da utilização de um vibrador de gesso)

5º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 3 (através da utilização de um misto de sons de espécies predadoras e ruídos urbanos)

6º Dia de manipulação experimental - protocolo de realização de aglomeração

7º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 1

8º Dia de manipulação experimental - protocolo de vibração corporal

9º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 2

10º Dia de manipulação experimental - protocolo de realização de aglomeração

11º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 3

12º Dia de manipulação experimental - protocolo de vibração corporal

13º Dia de manipulação experimental - protocolo de ruído 1

14º Dia de manipulação experimental - protocolo de realização de aglomeração

Os diversos protocolos de stresse foram executados diariamente entre as 9 e 11:30 horas,^{30, 246} com a duração de 10 minutos, com a excepção da aglomeração, que durou 12 horas.³⁴⁵



Figura 12- Animais durante o protocolo de aglomeração

2.3.9-Tratamento com Acupunctura

A acupunctura foi realizada no GIV três vezes por semana, com a duração de 10 minutos para cada animal, depois da injeção de anfetamina. Os pontos utilizados foram o sete do coração (07 Co) e o seis do pericárdio (06 Pe).

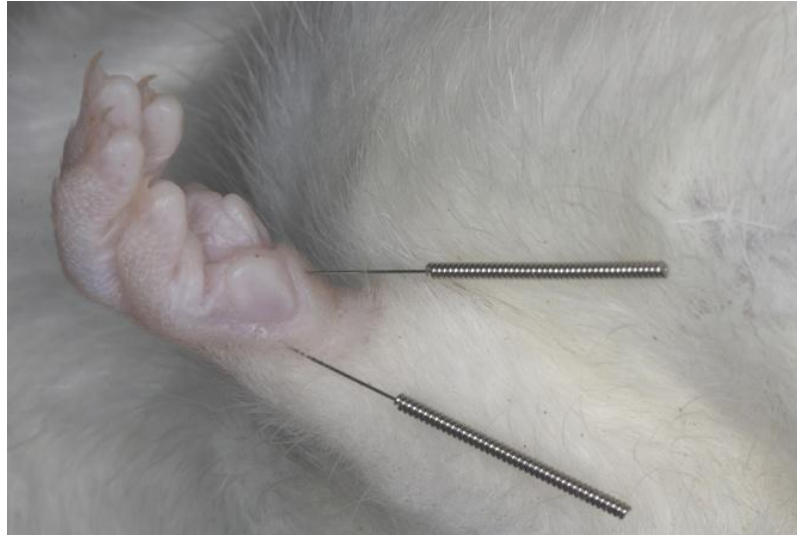


Figura 13 - Pontos de acupunctura utilizados

2.3.10- Colheitas sanguíneas

Foram efectuadas 3 colheitas sanguíneas a cada grupo experimental nos dias 1, 7 e 14 da experiência, entre as 9 e as 11:30 horas, a fim de avaliar as variações das concentrações séricas do cortisol e da CPK.

Através da quantificação da concentração sérica do cortisol e observação dos comportamentos dos animais, é possível avaliar a presença ou não de stress e a sua relação com o bruxismo, visto a concentração do cortisol aumentar perante situações de stress.^{30, 46, 108, 228} A avaliação da concentração sérica da Creatina-cinase (CK) tem por objectivo avaliar o grau de trauma e o de destruição muscular induzidos pelo stress, pelo protocolo indução e pelos MMNF resultantes.

As colheitas foram efectuadas por punção da veia da cauda do rato e colhidas, posteriormente, para um tubo tipo “*eppendorf*” não heparinizado. Foram colhidas amostras de cerca de 0,4ml de sangue, o qual foi mantido à temperatura ambiente durante cerca de 20 minutos permitindo a sua coagulação. O sangue foi posteriormente centrifugado, para a obtenção do soro. O soro foi posteriormente pipetado e dividido em duas porções iguais para

avaliação da concentração sérica do cortisol e da CK. O procedimento experimental foi realizado por técnicos qualificados de um Laboratório de Análises Clínicas acreditado.

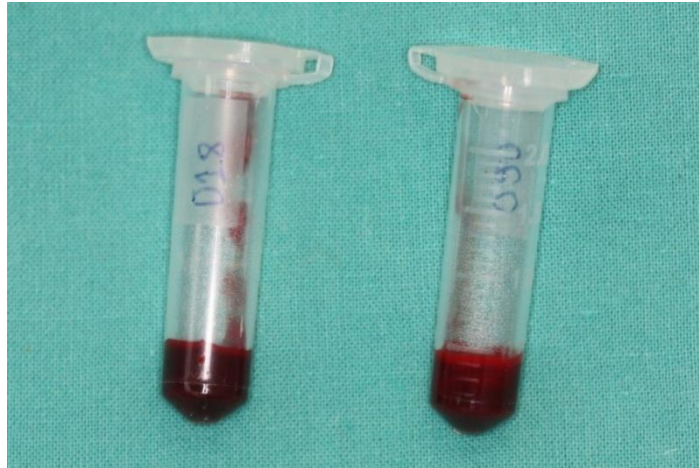


Figura 14- Amostras sanguíneas em tubos tipo Eppendorf

2.3.11- Determinação da actividade mastigatória não funcional

Os métodos observacionais de avaliação e gravação dos MMNF têm sido usados para avaliar os hábitos parafuncionais em vários estudos envolvendo modelos animais de bruxismo.^{30, 91} Neste estudo, foi utilizado, para além do método de avaliação comportamental, um método de avaliação dos MMNF baseado na medição da atricção dos incisivos inferiores.^{30, 91, 159}

Após a indução de stresse, os ratos foram filmados (gravação vídeo e áudio) de modo a efectuar a observação comportamental, para avaliar a gravidade dos MMNF. As filmagens decorreram dentro das gaiolas de alojamento, as quais eram transparentes, num local ao qual os ratos já estavam habituados/previamente ambientados. Os comportamentos foram registados durante 60 segundos a cada 5 minutos durante um período de 50 minutos depois da injeção de d-anfetamina ou solução salina. No caso do grupo de controlo, os registos foram efectuados da mesma forma, contudo, neste grupo não se injectou nem solução salina, nem d--anfetamina.

A intensidade dos movimentos mastigatórios não funcionais foi classificada/avaliada segundo uma escala de comportamentos orais, adaptada das escalas anteriormente descritas por Gomez,³⁰ Ernst⁹¹ e Kinon¹⁵⁹ e descrita na figura 15. Esta escala permite avaliar os comportamentos orais relacionados com os movimentos mastigatórios não funcionais, tais

como morder (“biting”), bater (“Chattering”), ranger (“gnashing”) e raspar (“scraping”) os dentes nos blocos de mordida (conforme a figura 15) e/ou também na caixa.^{30, 91, 159}

Os registos do comportamento foram sempre efectuados pelo mesmo observador, o qual desconhecia o grupo experimental dos ratos. Por cada minuto de observação foi dada uma pontuação a cada 30 segundos. Obteve-se um resultado diário para o comportamento de cada animal, baseado na média dos resultados de cada observação (10 períodos de observação).^{30, 91}



Figura 15– Blocos de madeira mole visivelmente desgastados

Valor base limiar para ausência de MMNF	Valor de 1
Ranger/morder	Ranger/morder do bloco de madeira ou gaiola de forma persistente durante pelo menos 5 segundos
Bruxismo Experimental	Movimentos audíveis como morder (“biting”), bater (“Chattering”), ranger (“gnashing”) e raspar (“scraping”) os dentes nos blocos de madeira ou gaiola de forma persistente durante pelo menos 5 segundos
Pontos de Gravidade	
0 Ausência	<ul style="list-style-type: none"> os ratos em repouso, não mostram movimentos de mordedura ausência de Gnawing/biting ou bruxismo experimental
1 Passear, lambe grades	<ul style="list-style-type: none"> os ratos passeiam pela gaiola, farejando as grades, ocasionalmente lambendo os fios e colocando o nariz nas grades da gaiola ausência de Gnawing/biting ou bruxismo experimental
2 5 a 10 segundos	<ul style="list-style-type: none"> Os ratos movimentam-se pela gaiola, mordendo ocasionalmente e mastigando os fios Comportamento de freezing induzido pelo protocolo de stresse movimentos ligeiros de Gnawing/biting ou bruxismo experimental (períodos de 5 a 10segds)
3 11 a 20 segds	<ul style="list-style-type: none"> os ratos restringem a sua locomoção a pequenas áreas da gaiola; mordem intensamente o fundo, ou apresentam esteriotipias relacionadas com a anfetamina movimentos moderados de Gnawing/biting ou bruxismo experimental (períodos de 11 a 20segds)
4 21 a 30segds	<ul style="list-style-type: none"> os ratos mantêm-se no mesmo local enquanto, compulsivamente, por longos períodos, mastigam e apertam com força os dentes à volta dos fios, por vezes com pequenas interrupções movimentos persistentes e intensos de Gnawing/biting ou bruxismo experimental (períodos de 21 a 30segds)

Figura 16: Valores de classificação dos MMNF observados.

2.4 - Eutanásia, necrópsia dos animais e colheita do material

Todos os animais, que chegaram ao fim da experiência foram eutanasiados e necropsiados, segundo as normas em vigor.

2.4.1 – Eutanásia

A eutanásia foi realizada por *overdose* com associação de cloridrato de cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e cloropromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória), seguida de deslocamento cervical e exsanguinação por punção intra-cardíaca.

2.4.2- Necrópsia dos animais e colheita do material

Foi realizada a necrópsia completa de todos os animais para avaliar o impacto sistémico dos procedimentos experimentais e para efectuar o rastreio de patologia espontânea que pudesse interferir com o protocolo.

Efectuou-se um registo pormenorizado da informação referente à observação macroscópica dos hábitos externo e interno dos animais. Foram colhidos, pesados e medidos os principais órgãos (coração, fígado, pulmões, rins, baço, timo, glândulas supra-renais e estômago) e fragmentos dos músculos masseter, temporal, diafragma e músculo da marcha (músculos gastrocnémios). Enquanto alguns fragmentos dos órgãos e músculos colhidos foram processados para estudos histológicos, segundo um protocolo próprio em utilização no Instituto de Patologia Experimental, outros fragmentos foram seleccionados para congelação rápida em azoto líquido e posterior conservação a -70°C. Estes fragmentos poderão ser posteriormente utilizados para análise metabólica e da expressão genética.

O processamento histológico do material foi realizado no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Todos os fragmentos colhidos para histopatologia de rotina foram incluídos em parafina, tendo sido realizados, posteriormente, cortes de micrótomo. A partir destas amostras foi feito o estudo histológico de rotina, usando a metodologia padrão para coloração de Hematoxilina e Eosina.

O peso *post-mortem* (em miligramas) da glândula supra-renal, do timo e do baço e a diminuição do peso corporal (em gramas) são indicadores úteis da gravidade do stresse percebido pelos animais. Assim sendo, estes dados foram avaliados e comparados com os respetivos grupos de controlo, visto estes valores poderem ser afectados pelo stresse.^{28, 30, 346-}

348

Os cadáveres e os resíduos procedentes da eutanásia foram posteriormente incinerados, de acordo com a legislação em vigor.

3-RESULTADOS

3.1- Tratamento estatístico

A análise dos dados foi realizada em ambiente Windows® 7, com recurso ao programa de tratamento estatístico de dados *SPSS Statistics* versão 19.0 (SPSS Co., Chicago, Illinois).

Neste estudo, utilizou-se um teste de hipótese de diferenças de médias (ANOVA). Para aplicar o teste de hipótese de diferenças de médias em cada uma das variáveis descritas, é exigido, sendo este um teste paramétrico, que as variáveis tenham uma distribuição normal e que as variâncias populacionais sejam homogêneas.

Para verificar o pressuposto da normalidade foi utilizado o teste *Shapiro-Wilk* que é uma alternativa ao teste *Kolmogorov-Smirnov*, sempre que a dimensão da amostra é menor ou igual a 50. Para testar a homogeneidade das variâncias aplicou-se o teste de *Levene*. Para ambos os testes um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo, de acordo com o intervalo de confiança de 95% previamente estabelecido. No caso das variáveis que cumpriram os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias aplicou-se o teste ANOVA. No caso das variáveis que não cumpriram na integridade os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias aplicou-se o teste de *Kruskal-Wallis*, alternativa não paramétrica a ANOVA, para um nível de significância de 0,05.

Para calcular quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os pesos corporais totais iniciais e finais dos grupos usou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. Posteriormente utilizou-se o teste LSD de *Fisher* para calcular as diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos diferentes grupos para os mesmos dias de estudo.

Relativamente ao estudo estatístico do Cortisol e da CK, o teste Anova de *Friedman* foi utilizado para comparar as análises do CK e Cortisol ao longo dos três tempos medidos intra-grupo. Para avaliar amostras emparelhadas com mais do que duas repetições (neste caso três repetições), o teste Anova de *Friedman* ($p < 0,05$) é um dos testes de uso mais frequente. Para as comparações entre grupos, na mesma análise, utilizou-se o teste LSD de *Fisher*.

Para avaliar as diferenças de variação dos valores de peso do timo, baço e supra-renais, e dos valores da atrição em função dos grupos usou-se também o teste LSD de *Fisher*.

O teste de *Wilcoxon* foi usado para avaliar a variação dos MMNF ao longo dos 14 dias da experiência para o mesmo grupo, enquanto que as diferenças entre grupos para os mesmos dias da experiência foram avaliados pelo teste LSD de *Fisher*.

Foram efectuadas tabelas descritivas dos dados obtidos, para cada parâmetro em estudo, com descrição da média, desvio padrão, erro padrão, intervalo de confiança e valor mínimo e máximo de cada parâmetro. Efectuaram-se também tabelas resultantes da análise de variâncias ANOVA, com referência ao nível de significância estatística após o teste SNK e t-student.

Os dados resultantes foram depois importados para ambiente EXCEL (Microsoft Office 2000®) e efectuados gráficos representativos dos parâmetros avaliados. Os resultados estão representados por médias \pm E.P.M (erro padrão na média).

3.2- Análise dos Resultados

3.2.1-Observação Geral dos Animais

Os animais utilizados neste estudo apresentaram uma adequada recuperação aos procedimentos de elaboração das marcas dentárias e sobreviveram saudáveis durante todo o período experimental, excepto um animal do grupo de controlo, que não sobreviveu ao procedimento de anestesia intra-peritoneal para a realização das marcas dentárias e um animal do Grupo IV que morreu após uma injeção de anfetamina. Presumiu-se que estes não sobreviveram por reacção procedimento da anestesia intra-peritoneal ou injeção de anfetamina. Esta infiltração terá sido realizada mais profundamente do que o devido, lesando algum órgão interno e provocando a morte do animal.

Nos animais que sobreviveram não foram detectadas quaisquer complicações pós-operatórias, sistémicas ou locais, decorrentes dos procedimentos efectuados.

3.2.2-Variação do Peso Corporal

As variações de peso dos animais durante o período do estudo estão representadas na Figura 17. Em todos os grupos experimentais, a pesagem dos animais foi realizada diariamente, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

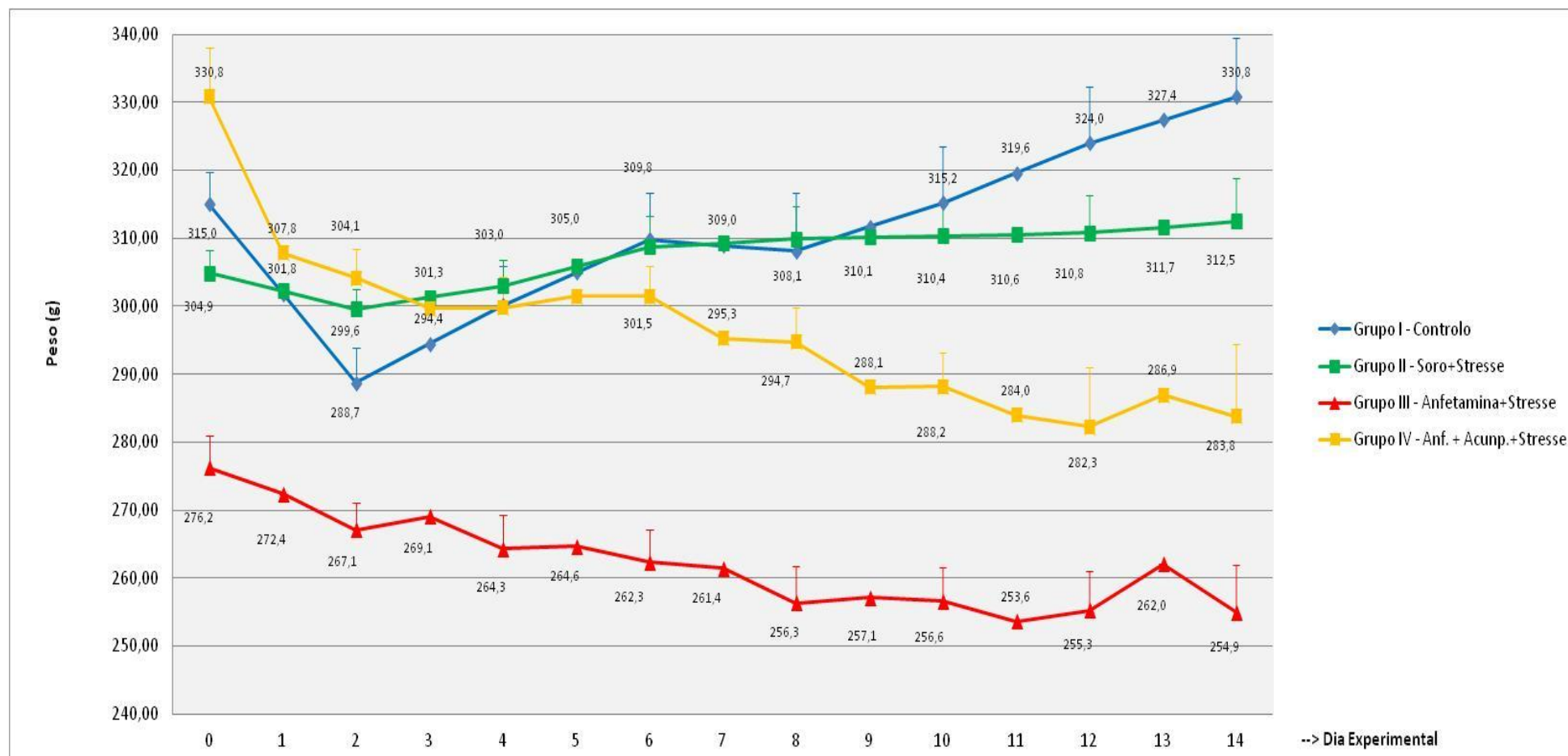


Figura 17 – Gráfico representativo da Variação do Peso dos Animais em função dos dias de experiência.

Os dados experimentais foram analisados pelo método ANOVA de análise de variâncias e o teste de *Kruskal-Wallis* foi posteriormente utilizado para calcular quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os pesos inicial e final dos grupos. Posteriormente utilizou-se o teste LSD de *Fisher* para calcular as diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos diferentes grupos para os mesmos dias de estudo.

Em todos os grupos observou-se uma queda de peso após a manipulação experimental, nomeadamente após injeção anestésica e realização das marcas dentárias. A inflexão desta tendência iniciou-se no dia 3. O peso no dia 2 foi, em média, menor que o peso inicial para quase todos os ratos do estudo. A queda de peso no Grupo de controlo ($26,3 \pm 5,2g$ correspondendo a 8,4% da massa total) foi, ao contrário do esperado, maior do que no Grupo II sujeito a stresse ($5,3 \pm 3,4g$ correspondendo a 1,7% da massa total). Os ratos do Grupo III perderam em média $9,16g \pm 4,8g$ (correspondendo a 3,3% da massa total), enquanto que o Grupo IV foi o que mais peso perdeu até ao dia 2 ($28,87g \pm 7,73g$, 8,7% da massa total), observando-se uma diminuição geral do peso destes animais (GIV) até ao último dia de experimentação.

Após o dia 2 todos os animais dos Grupos I e II recuperaram gradualmente de peso. Verificou-se um aumento do peso individual em todos os animais destes grupos, relativamente à fase inicial do estudo (diferença entre dia 0 e 14). Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos animais do Grupo I e Grupo II nos diversos dias da experiência, podemos afirmar que existiu uma recuperação de peso mais marcada no Grupo I, não sujeito a stresse ($+15,84 \pm 14,66g$) do que no Grupo II, sujeito a stresse. ($+7,65 \pm 15,06g$). De facto a diferença do valor do Peso_GI_0 ($M= 314,98 \pm 14,42$; $SEM= 4,8$) relativamente ao Peso_GII_14 ($M= 330,82 \pm 25,72$; $SEM= 8,57$) corresponde a uma diferença estatisticamente significativa $t(8)=-3,241$; $p=0,012$ (teste de *Kruskal Wallis*). Já para o Grupo II a variação de peso não é significativa $t(9)=-1,606$; $p=0,143$ (teste de *Kruskal Wallis*) considerando o Peso_GII_0 ($M= 304,89 \pm 10,86$; $SEM= 3,4$) relativamente ao Peso_GII_14 ($M= 312,54 \pm 20,08$; $SEM= 6,35$).

Relativamente aos Grupos III e IV não se verificou uma recuperação de peso como nos Grupos I e II, observando-se uma diminuição geral do peso destes animais até ao último dia de experimentação. A variação de peso, agora no sentido negativo (perda de peso) é significativa para o Grupo III ($-21,28 \pm 16,43g$) em que $t(9)=4,094$; $p=0,03$ (teste de *Kruskal Wallis*), mas ainda mais significativa ($-49,37 \pm 29,83g$) para o Grupo IV ($t(8)=4,96$; $p=0,001$ (teste de *Kruskal Wallis*)).

3.2.3- Variação do Peso do Timo, Baço e Supra-Renais

Os pesos finais do Timo e Baço estão representados abaixo na Figura 18 e os pesos das Supra-renais na Figura 19.

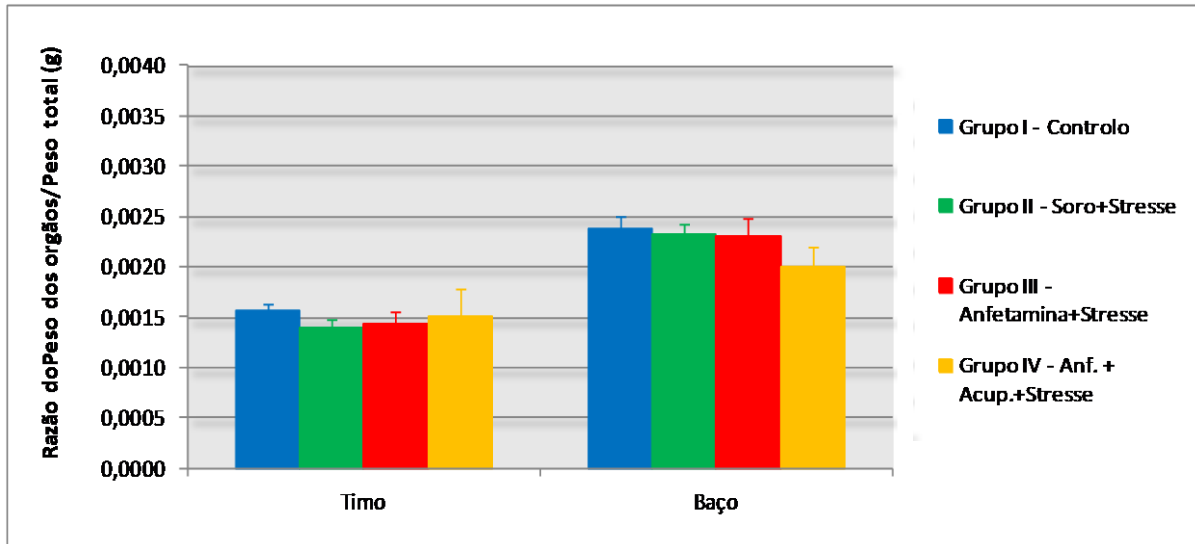


Figura 18 – Gráfico representativo da variação dos valores da Razão Peso do timo/ Peso total e do Peso do baço/ Peso total em função dos grupos.

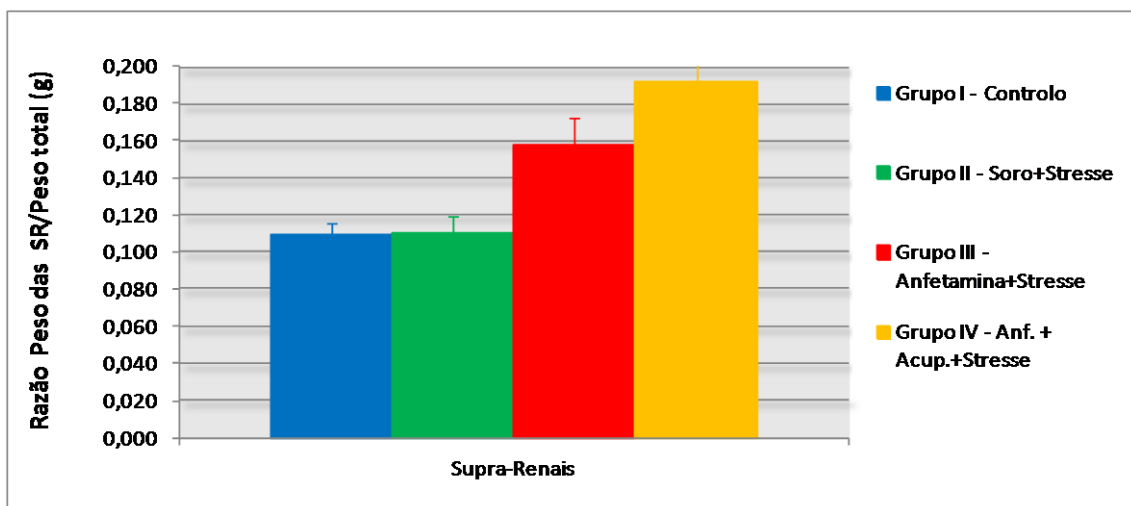


Figura 19 – Gráfico representativo da variação dos valores da Razão (Peso das supra-renais/ Peso total) x1000 em função dos grupos. Os valores foram multiplicados por 1000 para facilitar a leitura devido ao elevado nº de casas decimais do resultado.

No início da experiência (dia 0), existiam, entre alguns grupos, pesos totais estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; Teste LSD). Este dado poderá eventualmente corresponder a um viés do nosso estudo, na medida em que os ratos deveriam apresentar no dia 0, pesos iniciais não estatisticamente diferentes. No entanto, esta diferença de peso é-nos alheia na medida em que os ratos foram distribuídos aleatoriamente pelos três grupos e foram solicitados ao fornecedor sempre com a mesma idade. Tendo em conta este dado, a nossa análise estatística do peso dos órgãos baseou-se na razão entre o peso dos órgãos e a massa dos animais no sentido de normalizar e tornar comparáveis estes valores.

Relativamente à razão Peso do Timo/Peso Total podemos verificar que o Grupo I apresenta o valor mais elevado de todos os grupos ($0,00157 \pm 0,007$ g). Por sua vez, o Grupo II, submetido a stresse, apresenta o valor mais baixo de todos ($0,00140 \pm 0,007$ g) enquanto o Grupo III ($0,00142 \pm 0,000133$ g) e o Grupo IV ($0,00154 \pm 0,00019$ g) apresentam valores crescentes. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos ($p > 0,05$, teste LSD).

Relativamente à razão Peso Baço/Peso Total pode mais uma vez verificar-se que o Grupo I apresenta o valor mais elevado de todos os grupos [GI ($0,0020 \pm 0,0001$ g), GII ($0,0023 \pm 0,0001$ g) e GIII ($0,0023 \pm 0,0001$ g)]. O Grupo IV apresenta o valor mais baixo de todos ($0,002010 \pm 0,0001$ g). O Grupo IV é estatisticamente diferente do Grupo I ($p = 0,046$, teste de LSD). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os restantes grupos ($p > 0,05$, teste LSD).

Relativamente à razão (Peso das Supra-renais/Peso Total) $\times 1000$ podemos verificar que, neste caso, o Grupo I apresenta o valor mais baixo de todos os grupos ($0,10908 \pm 0,0066$ g), enquanto que o Grupo II ($0,110 \pm 0,009$ g), o Grupo III ($0,157 \pm 0,014$ g) e o Grupo IV ($0,19152 \pm 0,02$ g) apresentam o valores sucessivamente crescentes. O Grupo IV e o Grupo III são estatisticamente diferentes dos Grupos I e II ($p < 0,008$, teste de LSD). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos I e II e entre o Grupo IV e o Grupo III ($p > 0,05$, teste LSD).

3.2.4-Variação da Concentração Sérica do Cortisol

Os resultados das colheitas sanguíneas e da análise do cortisol estão representados na Figura 20 expressos em microgramas por decilitro de soro ($\mu\text{g}/\text{dl}$).

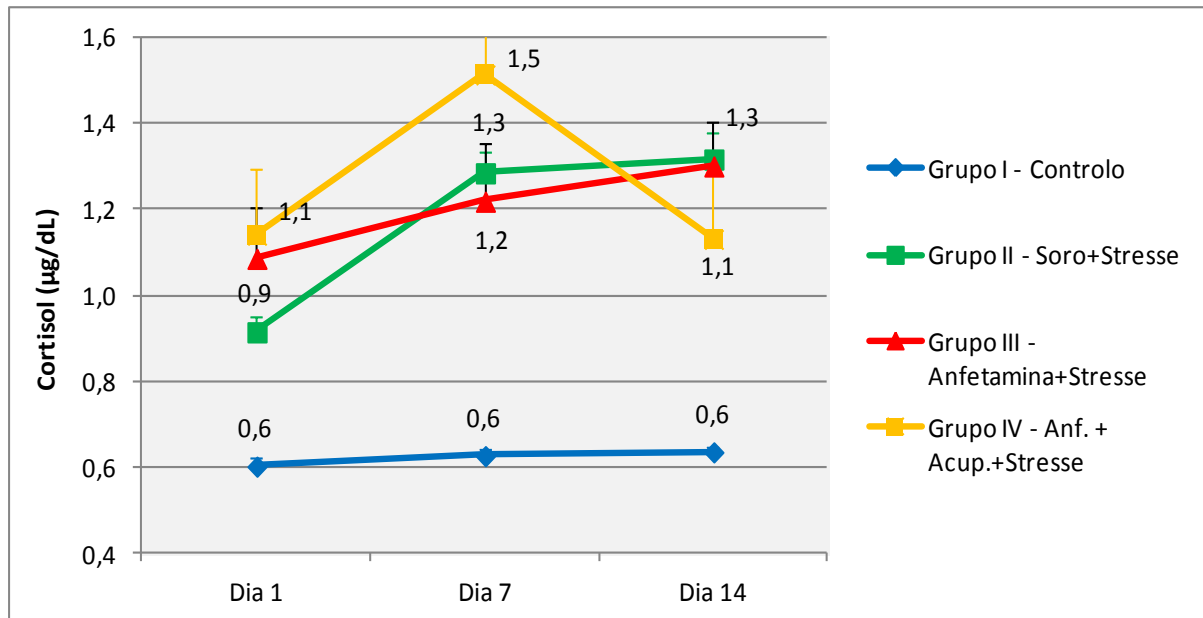


Figura 20 – Gráfico representativo da variação da concentração média do Cortisol, em função da Análise 1 (dia 1), Análise 2 (dia 7) e Análise 3 (dia 14).

Na Análise 1 observa-se que os valores do cortisol são mais elevados para o Grupo IV ($1,142 \mu\text{g}/\text{dl}$) e gradualmente decrescentes para o Grupo III ($1,087 \mu\text{g}/\text{dl}$), Grupo II ($0,91 \mu\text{g}/\text{dl}$) e Grupo I ($0,60 \mu\text{g}/\text{dl}$). Os valores do Grupo I são estatisticamente diferentes de todos os outros grupos (quer na Análise 1 quer nas restantes) em que $p < 0,01$ (teste LSD). Na Análise 1 não existem diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos II, III e IV ($p > 0,05$, Teste LSD).

Após a primeira semana de indução de stresse obtivemos, como esperado, um aumento considerável dos valores de cortisol no soro dos animais dos Grupos II, III e IV, enquanto os animais do Grupo I mantiveram valores muito semelhantes ao longo das 3 análises ($0,60$; $0,62$ e $0,63 \mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente).

Em todos os tempos analisados, os valores de cortisol dos grupos GII e GIII, sendo superiores aos valores controlo, não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$; teste LSD). Enquanto que os valores de cortisol se mantiveram constantes ao longo do tempo para o Grupo I, estes aumentaram no dia 7 (2ª colheita) no Grupo II, mantendo-se estáveis até ao fim da experiência. Por outro lado, os valores de cortisol para o Grupo III mantêm-se superiores ao controlo mas sem variações ao longo do tempo. Com efeito, a alteração que ocorreu ao longo das três medições de cortisol não foi estatisticamente significativa para o Grupo I ($p = 0,244$; Teste Anova de *Friedman*) e Grupo III ($p = 0,078$; Teste Anova de *Friedman*). Já para o Grupo II a diferença obtida entre as Análises 1 e 3 revelou-se significativa ($p = 0,001$; Teste Anova de *Friedman*).

Um pico inesperado e estatisticamente significativo surgiu entre a GIV_Análise 1 e GIV_Análise 2 ($p = 0,000$; Anova de *Friedman*), para diminuir depois para um valor muito semelhante ao inicial na Análise 3 (1,132 $\mu\text{g/dl}$). Esta diminuição na Análise 3 torna a variação GIV_Análise 1 \leftrightarrow GIV_Análise 3 não estatisticamente significativa ($p = 0,278$; teste Anova de *Friedman*), à semelhança do que aconteceu nos Grupos III e I.

De referir ainda que na Análise 3 observa-se que os valores do cortisol são mais elevados para o Grupo II (1,318 $\mu\text{g/dl}$), menores para Grupo IV (1,132 $\mu\text{g/dl}$) e Grupo III (1,302 $\mu\text{g/dl}$), e marcadamente menores para o Grupo I (0,60 $\mu\text{g/dl}$). De facto na Análise 3 o Grupo I é estatisticamente diferente de todos os outros. Já o Grupo II, Grupo III e o Grupo IV não são diferentes entre si na Análise 3 ($p > 0,05$; teste LSD).

3.2.5- Variação da concentração sérica da creatina-cinase

Os resultados das colheitas sanguíneas e da análise da enzima creatina-cinase estão demonstrados na Figura 21. Os resultados estão expressos em unidades de enzima por litro de soro (U/l).

Na primeira análise efectuada não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$ teste LSD de *Fisher*). A partir da Análise 1 é notório um aumento dos valores da CK no Grupo II (2297,9 U/l) relativamente ao Grupo I (1435,35 U/l), sendo esses valores marcadamente mais elevados para o Grupo III (2705,3 U/l) e Grupo IV (2811,9 U/l).

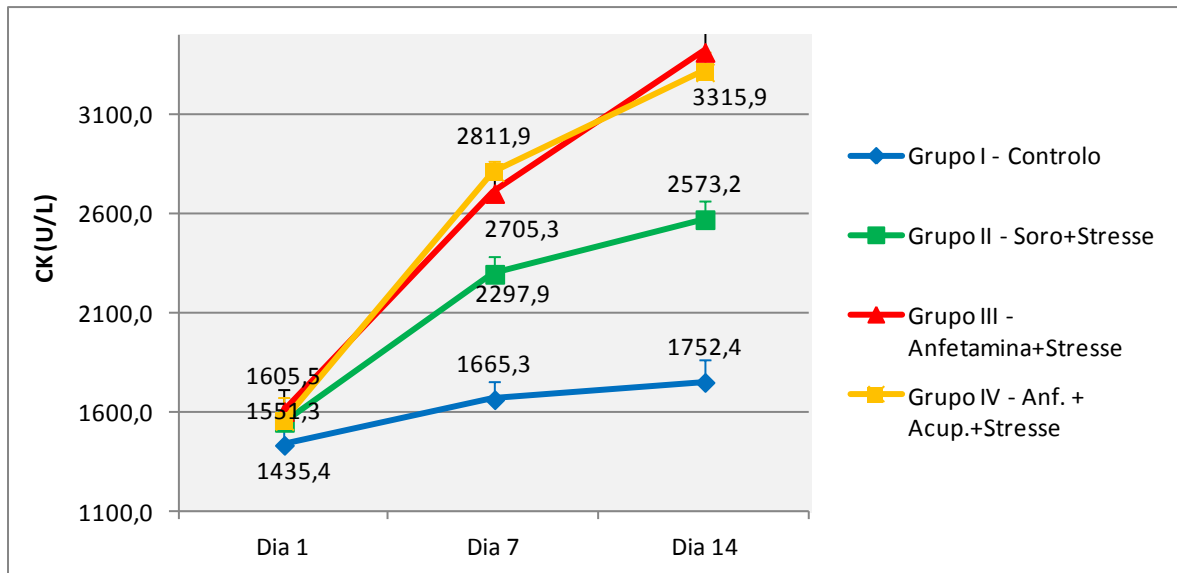


Figura 21 – Gráfico representativo da variação da concentração sérica dos valores da CK em função da Análise 1 (dia 1), Análise 2 (dia 7) e Análise 3 (dia 14).

À semelhança do que aconteceu com os valores do cortisol, embora aqui com uma diferença menor, ocorreu na Análise 2 um pequeno pico no valor da CK do Grupo IV (2837,28 U/l), com um valor ligeiramente superior ao Grupo III (2705,29 U/l), para depois se inverter novamente na Análise 3 em que o valor do Grupo IV (3291,17 U/l) é ligeiramente inferior ao do Grupo III (3416,90 U/l).

Os valores da CK no Grupo II e Grupo III são significativamente superiores aos valores do Grupo I nas análises subseqüentes, aumentando ao longo do tempo, sendo sempre estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$; Teste LSD). Apesar do aumento considerável da expressão da enzima também no Grupo IV, não houve diferenças estatisticamente significativas entre Grupo III e IV nos três períodos testados ($p > 0,05$, teste LSD).

Observa-se ao longo do período experimental uma grande similaridade na evolução entre o Grupo III e o Grupo IV em que os valores da CK são muito semelhantes nos três períodos testados. A anfetamina potencia a acção do stresse nos tempos 7 e 14, embora o protocolo de acupunctura utilizado não pareça trazer qualquer diferença.

Analisando as diferenças dos valores da CK dos quatro grupos, do dia 14 para o dia 1, podemos concluir que essas diferenças são estatisticamente significativas ($p = 0,000$, teste Anova de *Friedman*) para todos os grupos excepto para o Grupo I, onde a alteração que ocorreu ao longo das três medições não é significativa ($p = 0,057$, teste Anova de *Friedman*).

3.2.6- Avaliação da Atrição Dentária

Os resultados da medição da atrição incisal estão demonstrados na Figura 22. Os resultados estão expressos em milímetros (mm). A medição da atrição incisal foi efectuada com uma craveira digital nos dois incisivos inferiores dos ratos. Com os valores obtidos foi efectuada uma média de atrição por grupo.

As diferenças dos valores de atrição entre os quatro grupos experimentais foram analisadas pelo teste LSD. O Grupo III ($7,24 \pm 0,41$ mm) exhibe valores superiores ao Grupo II ($6,82 \pm 0,34$ mm) e estes exibem uma atrição consideravelmente superior aos do Grupo I ($6,37 \pm 0,23$ mm).

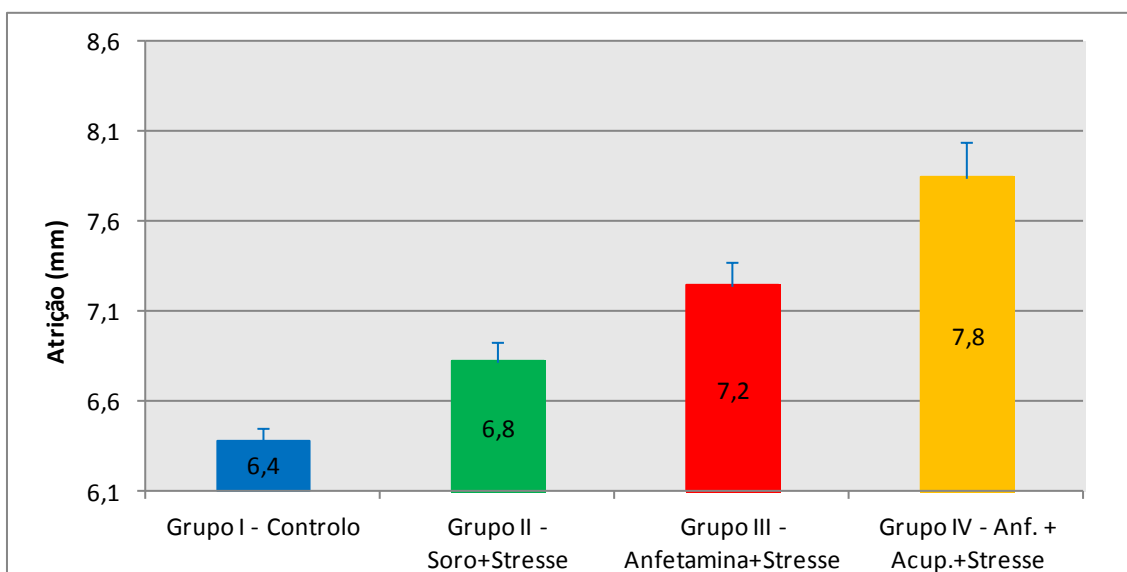


Figura 22 – Gráfico representativo da variação dos valores de atrição em função dos grupos.

O stresse produziu um aumento estatisticamente significativo na atrição dentária nos animais do Grupo II em comparação com o Grupo I ($p < 0,009$; teste de LSD). Adicionalmente, a atrição produzida pela anfetamina e stresse no Grupo III ($7,24 \pm 0,41$ mm) é significativamente superior à verificada nos animais só submetidos a stresse no Grupo II ($6,82 \pm 0,34$ mm) em que Grupo II vs Grupo III é igual a $p < 0,009$; teste de LSD; sugerindo que este psicoestimulante potenciou o efeito do stresse neste parâmetro. Não era no entanto expectável encontrar um valor de atrição mais elevado no Grupo IV ($7,84 \pm 0,62$ mm), submetido a anfetaminas e

acupunctura. Estas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,009$, teste de LSD) entre todos os grupos.

Curiosamente, a diferença média entre o Grupo I e o Grupo II (0,443mm) é maior que a diferença entre o Grupo II e o Grupo III (0,4225mm) sugerindo que o stresse poderá ter um efeito isolado na atrição maior que a própria anfetamina. No entanto, a diferença entre Grupo III e Grupo IV (0,6067mm) é maior do que qualquer uma existente entre as anteriormente descritas.

3.2.7- Avaliação dos Movimentos Mastigatórios Não Funcionais

Na Figura 23 é possível avaliar as alterações dos Movimentos Mastigatórios Não Funcionais (MMNF) dos animais dos grupos experimentais ao longo do tempo.

Em função da escala utilizada podemos observar que os MMNF apresentam esporadicamente picos, sendo o Grupo II o mais representativo deste comportamento. Neste caso, podemos constatar que os picos apresentados pelo Grupo II nos dias 4, 6, 9 e 11 são estatisticamente significativos em comparação com o Grupo I ($p < 0,05$, Teste de LSD de *Fischer*). Estes dias correspondem quase sempre aos dias de execução dos protocolos de aglomeração ou de vibração corporal, o que está de acordo com a descrição feita noutros estudos em que são estes protocolos os que mais causam stresse aos animais.^{28, 30} No entanto esta variação por picos esporádicos já não é tão evidente nos Grupos III e IV, à excepção de picos esporádicos do Grupo IV nos dias 6, 9 e 11.

Analisando os valores iniciais e finais (dia 1 e dia 13) para os diferentes grupos podemos verificar que as variações sofridas pelo Grupo I e Grupo II não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$, teste de *Wilcoxon*). No entanto podemos afirmar que existem variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$, teste de *Wilcoxon*) se compararmos algumas variações isoladas que acontecem por exemplo, nos dias dos picos do Grupo II e nos dias que imediatamente os antecedem ou sucedem. Já para os Grupos III e IV, a variação que ocorreu entre o valor inicial (dia 1) e o final (dia 13), corresponde a uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$ para o Grupo III e $p = 0,04$ para o Grupo IV; teste de *Wilcoxon*).

Ao longo dos diversos dias da experiência podemos constatar que, entre grupos:

- o Grupo I é sempre estatisticamente diferente de todos os outros excepto do Grupo II nos dias 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12 e 13 (dias em que não ocorrem picos de MMNF), em que $p > 0,05$, Teste LSD;

- os Grupos III e IV são diferentes do Grupo II em todos os dias da experiência excepto nos dias 1, 2 e 4 em que $p > 0,05$ (teste LSD).

- Os Grupos III e IV são diferentes entre si nos dias 5, 6, 8, 9, 12 e 13 em que $p < 0,05$ (teste LSD).

Na generalidade os Grupos III e IV exibem em média um comportamento MNF maior do que o apresentado pelo Grupo I e II. O Grupo IV, submetido a acupunctura, apresenta dos dias 5 a 10 uma maior taxa de MMNF, o que vai ao encontro dos valores aumentados de cortisol, como foi visto anteriormente, e poderá justificar uma maior atrição final exibida pelos animais deste grupo.

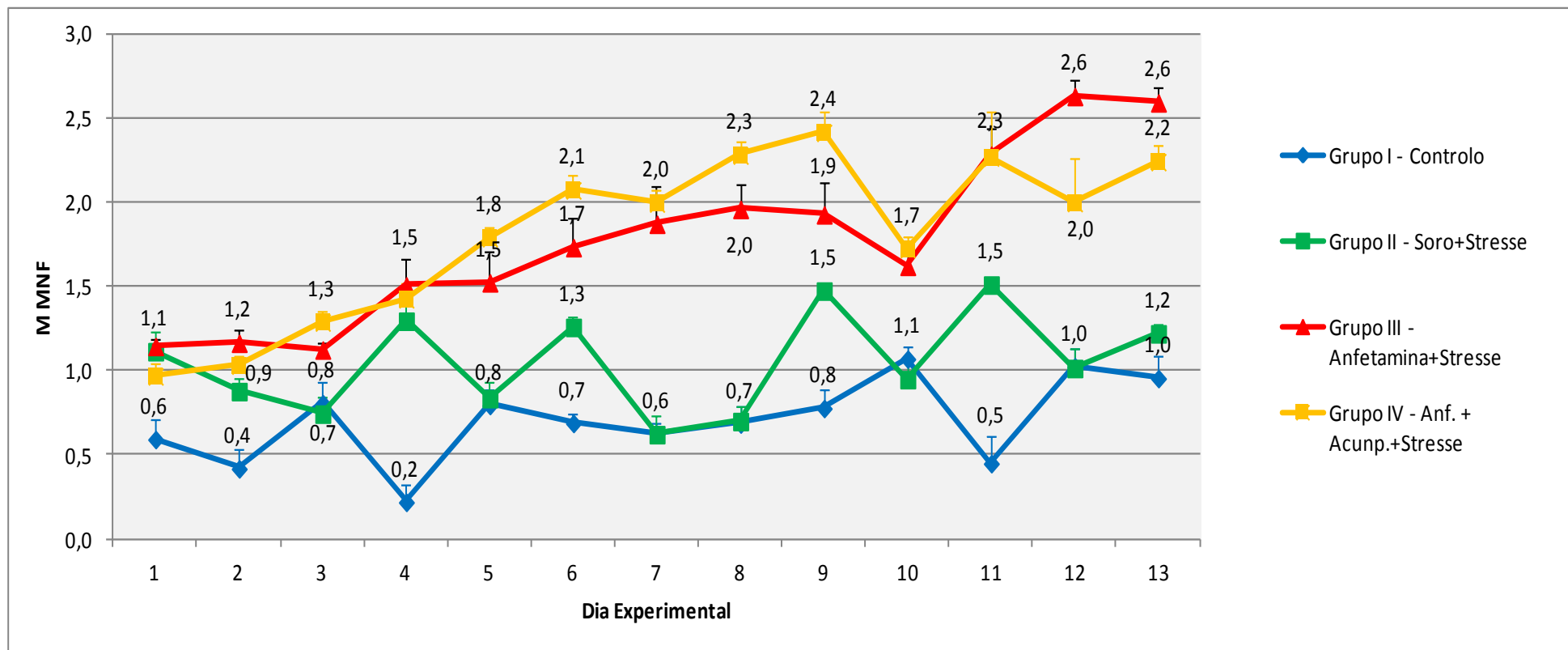


Figura 23 – Gráfico representativo da variação dos valores de MMNF segundo a escala utilizada em função dos grupos.

4-DISCUSSÃO

O presente estudo experimental teve como objectivo contribuir para um melhor conhecimento da relação entre stresse, atrição e os MMNF, avaliar o efeito das anfetaminas e da acupunctura nos mesmos e estudar as variações das concentrações séricas da creatinase e do cortisol.

O stresse tem sido sugerido como um factor causal de parafunções e DTM.³⁸ Para compreender os mecanismos envolvidos nesta interacção, têm sido desenvolvidos numerosos estudos com humanos e animais. Com efeito, tal como acontece com as DTM e outras parafunções, também o bruxismo parece estar relacionado com sintomas de stresse.³⁸ Apesar da relação stresse-bruxismo permanecer muito discutida na comunidade científica o bruxismo é cada vez mais considerado como sendo uma resposta física ao stresse.⁴⁴

Por outro lado, o consumo de anfetamina e seus análogos tem sido associado a bruxismo, reforçando a hipótese da etiologia central. A utilização da acupunctura no tratamento do stresse é conhecida e relativamente estudada. No entanto não existia até à data qualquer estudo que relacionasse o efeito da acupunctura na atrição dentária.

Os estudos do bruxismo em humanos estão, por questões éticas (relação favorável benefícios-riscos para o sujeito da investigação; imprescindibilidade da utilização de sujeitos humanos entre outras), limitados a estudos observacionais em determinados grupos sujeitos a stresse na população em geral (exemplo: estudos que usam populações de estudantes universitários), existindo uma maior dificuldade em esclarecer e isolar todas as variáveis, quando comparados com estudos experimentais controlados.²²⁶

A finalidade da investigação médica com seres humanos é a melhoria dos procedimentos profilácticos, diagnósticos e terapêuticos e o conhecimento da etiologia e patogénese da doença. Mesmo as melhores metodologias devem ser continuamente aprimoradas do ponto de vista da eficácia, eficiência, acessibilidade e qualidade. Não é eticamente correcto submeter humanos a níveis exagerados de stresse físico, metabólico ou psicológico o que origina enormes dificuldades no desenho de estudos experimentais controlados em humanos. A interpretação da informação resultante de seres humanos é gravemente complicada devido à antecipação, o que não se coloca em estudos animais. Em estudos de modelos com animais, o início da actuação do agente stressante é claramente definido, tendo em conta que os animais estão alojados nos ambientes familiares das suas gaiolas e os agentes stressantes podem ser aplicados aleatoriamente, sem oportunidade de

antecipação. Além disto, os indivíduos têm de ser completamente informados sobre a experiência de que farão parte. Nesta situação, torna-se muito complicado definir temporalmente o início de acção do agente stressante, daí ser também mais difícil analisar as respostas do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais. Os factores ambientais podem também influenciar a resposta do indivíduo.²²⁶

Utilizando modelos animais tem-se procurado desenvolver protocolos experimentais que reproduzam situações similares às que ocorrem em humanos sob condições de stress. Para tal têm sido utilizados modelos com roedores sob a influência de inúmeros agentes stressantes.^{30, 348-349}

4.1-Amostra

Este trabalho experimental foi desenvolvido com base numa amostra de 40 ratos (Wistar, n=10), machos, adultos jovens com cerca de 10 semanas de idade. A necessidade de incluir apenas animais do sexo masculino pretende evitar influências hormonais, diferenças comportamentais e na intensidade de resposta a drogas no processo experimental.³⁵⁰ Estas diferenças são documentadas em alguns estudos, quer em humanos³⁵¹ quer em ratos³⁵², o que leva a maior parte dos autores a utilizar ratos machos nos seus estudos.^{28, 30, 91, 235, 346}

4.2-Agentes stressantes

Procurando simular em modelos animais situações semelhantes às que ocorrem no Homem, diversos estudos referem formas laboratoriais de induzir stress psicossocial, tais como imobilização, ambiente frio, inalação de vapores de éter, ruídos,^{30, 246} caixa de comunicação,^{40, 300, 353} apertar a cauda, privação de água, entre outros^{30, 108, 354}

Apesar das conclusões nem sempre serem consonantes, diversos estudos com animais como os de Pohto⁹⁰, Budz-Jorgensen²²⁸ e Byrd¹⁹⁵ apoiam a associação positiva entre o stress e o bruxismo. Rosales, num estudo experimental com ratos, tentou simular um ambiente stressante através da utilização de uma caixa de comunicação de modo a induzir parafunções nos músculos mastigadores. Concluiu que, após a indução, os animais desenvolveram parafunções, tais como o bruxismo.¹⁹³ Gomez e Areso realizaram experiências com ratos em

caixas de comunicação, através das quais concluíram que a duração de indução e o tipo de agentes stressantes estariam relacionados com a capacidade do stress induzir bruxismo.¹⁶

Neste estudo experimental, de entre as inúmeras formas de indução de stress possíveis, seleccionaram-se três protocolos de ruídos (predadores, urbanos e mistos), vibração corporal e aglomeração. Estes agentes foram seleccionados e adaptados a partir de um conjunto de estudos em que estes foram aplicados com boa indução e resultados.^{30, 103, 345, 353} Esta selecção foi feita com o intuito de induzir stress sociopsicológico e físico de modo a reproduzir algumas condições que reproduzem o bruxismo no Homem. A disponibilidade dos materiais e questões logísticas foram também tidas em conta.

Os agentes indutores de stress foram aplicados num protocolo variável durante os 14 dias. Esta necessidade da alternância de protocolos deve-se à capacidade de adaptação dos ratos a um só tipo de agente stressante, como comprovado em alguns estudos.^{30, 246-247}

Adicionalmente, para além destes agentes stressantes, os animais foram submetidos a doses crescentes de anfetamina durante 14 dias para reproduzir um protocolo de sensibilização a ATS.

O stress físico e emocional tem a capacidade de afectar a função motora geral através da estimulação do SNS²²⁴ das hormonas glucocorticoides.²²⁷ O sistema nervoso simpático actua ao nível muscular causando vasoconstrição, alterações na contractilidade e tónus muscular. Alguns autores sugerem que determinadas alterações no SNC induzidas por stress podem aumentar os MMNF, no entanto, o envolvimento de factores periféricos não poderá ser descartado.²²⁷

Tendo em conta que o grupo submetido a stress apresentou valores superiores de atrição, estatisticamente significativos, comparativamente ao grupo de controlo, é possível concluir que o protocolo de stress foi eficiente na indução de movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF).

4.3-Métodos observacionais e Movimentos Mastigatórios não Funcionais

As actividades relacionadas com os MMNF são difíceis de quantificar adequadamente. Os métodos mais utilizados em estudos experimentais com animais são a observação comportamental,^{30, 227} a electromiografia (EMG)^{193, 196, 227, 235, 246} e a medição da atrição incisal.

18

Alguns estudos com animais procuram, através dos métodos de observação, avaliar hábitos parafuncionais tais como os MMNF, quantificando-os numa escala de severidade em função da gravidade e do tempo de duração.¹⁰⁸ Este método é frequentemente acompanhado de gravações de vídeo, de modo a que um observador externo classifique movimentos como o roer e morder vigorosos como MMNF.^{30, 91, 159, 218, 227}

Neste estudo, foi utilizado, para além do método de avaliação comportamental e filmagem, um método de avaliação dos MMNF baseado na medição da atrição dos incisivos inferiores.^{30, 91, 159}

Reconhecemos que os métodos observacionais apresentam uma inevitável subjectividade. No entanto eles têm sido usados na maioria dos estudos com mamíferos.³⁵⁵ Nos estudos em que foram usados procedimentos mais objectivos houve sempre algum grau de restrição física dos animais ou necessidade de um procedimento cirúrgico ou administração anestésica.¹⁸ Para além disso os MMNF são difíceis de isolar na EMG. A maioria das metodologias envolve a gravação dos movimentos da mandíbula ou da actividade dos músculos mastigadores,^{92, 196} mas não avaliam a presença simultânea de contacto dentário. Assim a quantificação da atrição dentária poderá constituir um método mais adequado e fiável para medir a gravidade dos MMNF com uma intervenção mínima.³⁰

Vários estudos demonstraram a relação entre o aumento da actividade EMG dos músculos mastigadores e os MMNF,^{28, 193, 196-197, 227, 235-237, 246} em situações de stresse. A electromiografia permite uma medição automática dos comportamentos mastigatórios dos ratos em situações de stresse.^{28, 193, 196-197, 227, 235-237, 246} Assim sendo, pode ser considerada um método útil na quantificação e obtenção da amplitude dos comportamentos mastigatórios não funcionais. Contudo, na sua utilização em modelos com animais é essencial fazer uma cuidadosa interpretação dos resultados, tendo em conta que alguns comportamentos orais normais e toques acidentais dos animais nos eléctrodos podem ser considerados

parafuncionais, introduzindo vieses nos estudos.^{193, 196, 227, 235} Por este motivo a EMG não deve ser utilizada isoladamente, sem uma complementação com os métodos observacionais.²²⁷ Adicionalmente este método é de facto mais dispendioso e expõe também os ratos a um maior risco de infecção e stresse, uma vez que a colocação dos eléctrodos é feita cirurgicamente.²²⁷

O desgaste dentário excessivo é considerado, por muitos autores, como um dos sinais mais frequentes e visíveis de bruxismo. Devido à capacidade das ATS induzirem alterações comportamentais em humanos, diversos estudos têm sido realizados em ratos de forma a avaliar estes comportamentos.²⁹⁰ O comportamento estereotipado, alterações nos estímulos do comportamento controlado e aumento de comportamentos locomotores espontâneos, estão entre as alterações comportamentais provocadas por ATS.²⁹⁰

Entre os comportamentos mais comuns provocados por ATS em roedores podem destacar-se o aumento de comportamentos locomotores espontâneos e comportamentos estereotipados.²⁸⁹⁻²⁹⁰ Paralelamente, os MMNF são respostas típicas de roedores a condições de stresse.

A soma dos resultados decorrentes do período de observação, deu origem ao resultado diário do comportamento de cada animal.³⁰ Verificaram-se picos esporádicos, principalmente no GII. De forma consistente com a literatura, estes animais apresentaram picos de MMNF nos dias em que foram submetidos a aglomeração ou vibração corporal.^{28, 30}

No presente estudo, globalmente, o Grupo III e Grupo IV apresentam um comportamento de MMNF superior ao apresentado pelos restantes grupos. Isto é consistente com a elevada contribuição do aumento da actividade locomotora bem como dos movimentos estereotipados provocados pela administração crónica de anfetamina. O intervalo entre os dias 5 e 10, em que o Grupo IV apresenta MMNF superiores ao Grupo III coincide com a altura do pico da Análise 2 do cortisol, correspondendo a um período onde os animais apresentam maior stresse. A partir do dia 11, os movimentos no Grupo IV diminuem, levando novamente à correlação com os níveis de cortisol que também diminuíram na Análise 3. Estes dados poderão de certa forma justificar parcialmente os maiores níveis de atrição revelados pelo Grupo IV.

Também para o Grupo II e Grupo III, os valores mais elevados de MMNF são consistentes com a maior atrição dentária observada nestes grupos.

Parece existir uma tendência de diminuição dos MMNF nos dias finais do protocolo para os animais do Grupo IV, relativamente ao Grupo III, pelo que poderia ser útil avaliar o

efeito do protocolo de acupuntura utilizado num tempo experimental mais longo e, dessa forma, inferir se poderia ocorrer uma inversão também nos valores da atrição.

4.4- Atrição

A medição do desgaste dentário em animais roedores é relativamente fácil, já que os seus incisivos apresentam um crescimento e desgaste contínuos, equilibrados em condições fisiológicas pelos processos de aposição radicular e desgaste incisal.^{30, 239-241} Nestes animais, o processo de desgaste dentário é influenciado por diversos factores, tais como a consistência da dieta e a presença de MMNF (como por exemplo o mordilhamento de objectos e o bater ou raspar dos dentes uns contra os outros ou contra as grades da gaiola).²⁴⁰⁻²⁴² Neste estudo, os grupos experimentais tiveram todos acesso ao mesmo tipo de alimentação e ração seca, de forma a excluir qualquer influência destes no desgaste incisal.^{240, 242}

Weinreb, no seu estudo, observou que apesar da redução do desgaste dentário resultante da alimentação a um mínimo, continuou a ocorrer um desgaste incisal considerável devido a actividades especiais de atrição.²⁴⁰ Assim sendo, uma situação em que os MMNF do rato sejam estimulados (como por indução de stresse) terá como resultado uma maior atrição dos bordos incisais dos seus dentes.³⁰

De entre os vários parâmetros existentes para avaliar a gravidade dos MMNF em modelos com ratos, seleccionou-se a avaliação da taxa de atrição incisal, visto ser um método de fácil medição, que permite obter resultados quantitativos e válidos, realizado com o mínimo de intervenção.³⁰ Este método permite também eliminar um conjunto de desvantagens e dificuldades inerentes aos estudos electromiográficos e observacionais, já descritos anteriormente, considerando sempre que os animais têm um valor intrínseco e não meramente instrumental, havendo, por isso, uma obrigação directa de não lhes causar dano desnecessário.

As diferenças dos valores de atrição entre os quatro grupos são estatisticamente significativas ($p < 0,009$, teste de LSD). No entanto, o contrário do que era esperado, a atrição revelou-se maior no Grupo IV ($7,84 \pm 0,62$ mm), submetido a acupuntura do que no Grupo III ($7,24 \pm 0,41$ mm). De salientar que a diferença média entre o Grupo I e o Grupo II ($0,443$ mm) é maior que a diferença entre Grupo II e Grupo III ($0,4225$ mm) sugerindo que o stresse poderá ter um efeito isolado na atrição maior do que a própria anfetamina. No entanto a diferença

entre Grupo III e Grupo IV (0,6067mm) é maior do que qualquer uma existente entre as anteriormente descritas. Estes dados são discutidos nos parágrafos seguintes assim como nos parágrafos relativos à discussão dos valores do cortisol.

Como esperado, a atrição revelou-se maior no Grupo II ($6,82 \pm 0,34$ mm), submetido a stresse, do que no grupo de controlo ($6,37 \pm 0,23$ mm) não submetido a stresse. A média de atrição diária no grupo de controlo considerando os 14 dias de experiência foi de 0,455mm e no Grupo II foi de 0,487mm. Embora representando uma média diária superior estes dados estão de acordo com os obtidos por Kiliaridis e Gomez.^{30, 242} Os resultados do presente estudo são relativamente semelhantes aos obtidos por Gomez, no que diz respeito ao valor médio da atrição por dia de experiência. Gomez obteve para o grupo de controlo valores de 0,45 mm/dia, enquanto esta experiência obteve 0,455 mm/dia. Para os grupos submetidos a stresse, Gomez obteve uma média de atrição de 0,463mm/dia e o presente estudo obteve 0,487 mm/dia para o Grupo II e superior para os restantes. No entanto, enquanto este estudo obteve uma diferença estatisticamente significativa para os valores médios de atrição entre grupos, Gomez não, levando-o a afirmar que o stresse, de modo geral, poderia não ser um factor relevante para o desgaste dentário. O facto de Gomez não ter conseguido encontrar esta relação estatisticamente significativa, não quer dizer que ela não exista, mas apenas que o seu estudo não a conseguiu comprovar (se de facto existir). Este pressuposto é defendido por alguns autores, que afirmam que o protocolo de stresse pode não ter sido suficientemente efectivo para induzir alterações nos valores de atrição.³⁰

Estudos realizados em ratos, mostraram que o aumento da actividade mastigatória não funcional pode ser induzido pela estimulação repetida do sistema dopaminérgico com apomorfina, um agonista dos receptores dopaminérgicos. É possível relacionar estes movimentos mastigatórios com a taxa de atrição incisal.^{91, 102} A apomorfina, a dopamina e a d-anfetamina têm sido associadas à indução de comportamentos estereotipados em ratos (actos de cheirar, morder e lambar). O acto compulsivo de roer contribui para o desgaste dentário, podendo este efeito ser consequência destes estimulantes.^{99-100, 102} Estes comportamentos têm sido considerados como formas de bruxismo experimental induzidas por drogas.⁹⁰

O protocolo de acupunctura utilizado neste estudo não diminuiu a atrição apresentada pelos ratos do Grupo IV. Este valor parece estar em concordância com os MMNF avaliados (que apresentam valores mais elevados do dia 5 ao 10) e poderá fazer sentido se considerarmos também o pico de cortisol que os animais apresentaram no dia 7. Esta percepção inicial de stresse pelos animais deste grupo poderá justificar o aumento da atrição.

Para além disso, se considerarmos o estudo de Sato, em que os ratos poderão utilizar os MMNF como forma de regular/diminuir o stresse (e dessa forma o cortisol sérico), poderemos compreender os valores dos MMNF aumentados no Grupo II e, conseqüentemente, a maior atrição e a queda do cortisol sérico no dia 14. Segundo Sato, o aumento dos MMNF e a expressão de agressividade pode sugerir um mecanismo de *coping* que mantém a homeostase do organismo e desta forma reduz os efeitos adversos do stressante.¹⁹³ Considerando a diminuição do cortisol na Análise 3 e na escala de comportamentos orais, poderia ser interessante avaliar um efeito mais longo da acupunctura na atrição, pois a manutenção desta tendência poderia levar a uma diminuição da atrição a longo prazo quando comparado com o Grupo I.

Contudo, não existem estudos na literatura que relacionem o efeito da acupunctura na atrição incisal. No entanto, considerando que a indução de stresse e anfetamina provocam um aumento significativo da atrição, e o facto da manipulação dos ratos no decorrer do protocolo de acupunctura poder ser, por si só, um agente stressante, a conjugação de ambos poderá aumentar ainda mais e de forma considerável os valores da atrição dentária.

4.5- Peso corporal

O peso *post mortem* (em miligramas) da glândula supra-renal, do timo e do baço e a diminuição do peso corporal (em grama) são indicadores úteis da gravidade do stresse percebido pelos animais.^{28, 30, 193, 246, 346-348}

No início da experiência, dia 0, os diferentes grupos apresentaram valores de pesos diferentes entre si. Neste dia específico apenas os pares GI–GII e GI–GIV não são diferentes entre si ($p > 0,05$, Teste LSD). Este dado poderá corresponder a um viés do nosso estudo na medida em que os ratos deveriam apresentar no dia 0, pesos iniciais não estatisticamente diferentes. No entanto esta diferença de peso é-nos alheia na medida em que, os ratos foram distribuídos aleatoriamente pelos três grupos e foram solicitados ao fornecedor sempre com a mesma idade. Tendo em conta este dado, a nossa análise estatística baseou-se na variação do peso corporal ao longo dos 14 dias e não na comparação entre grupos desse peso. Pelo mesmo motivo, a análise estatística do peso dos órgãos foi baseada na razão entre o peso dos órgãos e a massa dos animais no sentido de normalizar e tornar comparáveis estes valores.

No 2º dia de pesagens, observou-se uma diminuição de peso de todos os grupos, sendo mais notável no Grupo I. Esta diminuição poder-se-á dever à mudança do meio em que

os animais estavam inseridos, bem como à manipulação experimental efectuada pela primeira vez (colheita de sangue, administração de agentes anestésicos e realização das marcas incisais). Segundo Connell (1966), esta perda de peso poderá também ser explicada por um estado agudo de ansiedade.²⁹¹

Após o segundo dia e até ao último dia experimental, os animais dos grupo Grupo I e Grupo II recuperaram gradual e individualmente de peso, relativamente à fase inicial do estudo (diferença entre dias 0 e 14). Contudo, o Grupo I (não sujeito a stresse) teve um aumento mais marcado (15,84 g). A diferença entre o peso final e o peso inicial foi menor no Grupo II (7,85 g) e não estatisticamente significativa. Poder-se-á afirmar que o stresse e a ansiedade não permitiram que os ratos do GII aumentassem de peso. Contudo, não se pode eliminar a hipótese de que poderiam aumentar de peso se o período em análise fosse mais alargado.

Para os Grupos III e IV observou-se uma manifesta perda de peso após a manipulação experimental. A variação de peso no sentido negativo (perda de peso), é significativa para o Grupo III (-21,28±16,43g) em que $t(9)=4,094$; $p=0,03$ (teste de Kruskal Wallis), mas ainda mais significativa (-49,37±29,83g) para o Grupo IV $t(8)=4,96$; $p=0,001$ (teste de Kruskal Wallis). Isto pode dever-se ao facto de que a manipulação dos ratos para a elaboração do protocolo de acupuntura ser, por si só, um agente stressante, levando por isso a uma maior perda de peso corporal.

A perda de peso no Grupo III e Grupo IV parece ser potenciada pela administração de d-anfetamina. Segundo o estudo de Jones (1992),³⁵⁶ que por sua vez é apoiado por outros estudos, o consumo crónico de anfetamina suprime o consumo de alimentos, reduz o peso corporal devido ao aumento do gasto energético e promove uma alteração da taxa metabólica e do metabolismo de gordura em ratos, quando administrada durante o dia.^{301, 357-358} Segundo Connell, a toxicidade de anfetaminas pode manifestar-se em perda de peso, devido ao estado agudo de ansiedade que as mesmas provocam.³⁵⁹ Em consequência da restrição alimentar e do aumento de tensão, pode observar-se rabdomiólise, que leva à contracção muscular (bruxismo, apertamento dos maxilares e constante inquietude de movimentos) e até mesmo à necrose muscular.³⁶⁰⁻³⁶¹ Ocorre ainda uma substituição de tecido muscular funcional por tecido conjuntivo, refletindo-se na perda de peso corporal.³⁶¹

Um estudo realizado por Sund, demonstra que, após a toma de anfetamina, houve uma perda de peso ou um não aumento do mesmo, durante o primeiro ano.³⁶² No estudo de Jones, chegou-se à conclusão de que a anfetamina reduz o peso corporal por alteração da taxa

metabólica e metabolismo da gordura em ratos quando a droga é dada durante o dia.³⁵⁶

No entanto, atendendo à maior significância da perda de peso no Grupo IV surgem algumas questões relativamente ao efeito ansiolítico da acupuntura em modelos animais, ou pelo menos, dos efeitos do protocolo utilizado neste estudo.

4.6- Peso do Timo, Baço e Supra-renais

Em relação à avaliação *post-mortem* do peso do timo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$; Teste LSD). Já no que ao baço diz respeito apenas encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre o Grupo I e o Grupo IV ($p = 0,046$, Teste LSD).

Relativamente às supra-renais dos Grupos GI e GII, estas não apresentam diferenças ($p > 0,05$; Teste LSD). No entanto, quer a anfetamina quer a acupuntura (embora aqui no sentido contrário ao esperado) demonstram o seu efeito na ansiedade, uma vez que o Grupo III e Grupo IV se mostram diferentes do Grupo I e Grupo II ($p < 0,008$ para o Grupo III e $p < 0,01$ para o Grupo IV; Teste LSD)

As diferenças de peso do baço e supra-renais, estatisticamente significativas para o Grupo IV reforçam a ideia de que os animais desse grupo perceberam um maior volume de stresse. A acupuntura terá aqui efeito e esse poderá ser essencialmente atribuído a perda de peso total que esses animais sofreram mas também à sua maior percepção do stresse como documenta o cortisol, os MMNF e até a própria atrição.

Diversos estudos referem que alterações do peso total e do peso de órgãos como o timo, baço e supra-renais avaliados *post-mortem*, podem estar relacionadas com o stresse induzido. Estas alterações podem ser úteis como indicadores da severidade do stresse crónico. Contudo, nem todos os estudos obtiveram resultados concordantes.^{193, 346-347} Na literatura, os resultados obtidos em diversos estudos relativamente à relação entre o peso do baço, timo, peso corporal e o stresse induzido nem sempre estão de acordo. No entanto, parece mais consensual afirmar que o peso *post-mortem* das glândulas supra-renais representa um indicador útil para avaliar a severidade do stresse crónico.³⁴⁶

Segundo o estudo de Sato¹⁹³, o peso do baço e do timo foi significativamente mais baixo com significância estatística em ratos sujeitos a stresse do que em ratos do grupo de

controlo. A observação histológica demonstra também um decréscimo no volume do córtex do timo, um aumento de volume da medula do timo, uma diminuição de volume da medula branca do baço relativamente ao grupo de controlo.¹⁹³

No entanto, nem todos os estudos realizados por outros autores obtiveram resultados concordantes. Enquanto Marsh (1960) também observou uma diminuição significativa no peso de ambos os órgãos,^{193, 347} já Ishikawa (1995) e Rosales (2002) não observaram alterações estatisticamente significativas no peso corporal nem no peso individual dos órgãos.^{28, 246} Ao contrário do que aconteceu no peso total, no nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas no peso dos órgãos individuais. Tal pode dever-se ao facto do efeito do stresse induzido não ter sido suficientemente forte para produzir uma diminuição de peso destes órgãos.⁶⁸ Alguns autores chegam a sugerir que o bruxismo ou a expressão de agressividade tem um efeito protector atenuando a redução de peso induzida pelo stresse nestes órgãos.¹⁹³

De facto, no nosso estudo, parece haver diferenças nos pesos, quando se combina o stresse com a anfetamina e a acupunctura, sendo que esta última não parece trazer alterações significativas na diminuição do stresse, à excepção das supra-renais. Nestas últimas, o aumento poderá ser lógico, considerando o efeito ansiolítico da acupunctura, a diminuição do cortisol observada na Análise 3 do Grupo II, bem como uma aparente diminuição dos MMNF na fase final do estudo.

As alterações observadas são atribuídas ao protocolo de indução efectuado e não à existência de quaisquer patologias, tendo em conta que após a necrópsia, a análise de todos os órgãos se encontrava normal.

4.7-A Creatina Cinase e o Cortisol

Foram efectuadas 3 colheitas sanguíneas a cada grupo experimental nos dias 1, 7 e 14 da experiência. Através da quantificação da concentração sérica do cortisol e observação dos comportamentos dos animais, é possível avaliar a presença ou não de stresse e a sua relação com o bruxismo.^{30, 108} A avaliação da concentração sérica da Creatina cinase (CK) tem por objectivo avaliar o grau de trauma e de destruição muscular induzidos pelo stresse, pelo protocolo de indução e pelos MMNF resultantes.

4.7.1-Creatina Cinase

A creatina-cinase é um biomarcador composto pelas isoformas MM, MB e BB, frequentemente utilizado para avaliar o dano no tecido muscular.^{247, 262} Após lesões directas no tecido muscular, tais como as que são produzidas por contracções excêntricas, injecções intramusculares, isquémia ou esforço excessivo, ocorre normalmente uma elevação da CK no soro.^{247, 272, 286}

Visto a isoforma MM ser a predominante no músculo esquelético, o doseamento desta pode ser indicativo de uma lesão no tipo de músculo referido.²⁶² O soro, na ausência de patologia cardíaca, contém apenas a isoenzima MM, que, em condições não patológicas, representa 95% da CK total.^{261, 268} Desta forma, fazendo o doseamento da CK total, obtém-se, de forma indirecta, a expressão dos valores desta isoforma, avaliando o dano muscular induzido.

É possível detectar um aumento da actividade do músculo masseter em animais que apresentam bruxismo, tal como o indicado nos estudos de Landgren,³⁶³ Weiner³⁶⁴ e Sitthisomwong.^{28, 365} Este aumento da actividade muscular pode ser avaliado através do aumento da concentração sérica da CK. Os modelos com roedores foram considerados bons modelos de indução de alterações musculares, tendo em conta que a sua fisiologia e a adaptação está bem estudada. Os estudos iniciais de Hutchins e Skjonsby causavam dano muscular através de contracções isométricas repetitivas.²⁸⁶

Estudos efectuados em ratos submetidos a stresse concluíram a existência de um aumento da actividade da CK muscular comparativamente com ratos do grupo de controlo, tal como indicado nos trabalhos de Woolf, Allen e Patterson, Ready e Watson.^{265, 287}

O presente estudo demonstra que o stresse aumenta os valores da CK, a anfetamina potencia o aumento dos valores de CK produzidos pelo stresse físico e a acupunctura parece não trazer qualquer efeito. Por um lado estes resultados são consistentes com o estudo de Matte (1975), que mostrou que a indução de stresse resulta num aumento da actividade da CK.²⁷⁵ Por outro lado, os resultados obtidos no GIII podem ser atribuídos ao uso de anfetamina que leva à existência de aumento de actividade locomotora,^{289, 366} aumento da contracção muscular,¹⁰² espasmos musculares e rabdomiólise tal como sugerido por outros autores.³⁶⁷⁻³⁶⁸ Adicionalmente, lesões directas no tecido muscular (contracções excêntricas, injecções intramusculares, isquémia ou esforço excessivo) levam ao aumento da concentração de CK no soro.^{247, 272, 286}

Na primeira amostra não existem diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$; Teste LSD de Fisher) pois os valores da CK apenas se encontram elevados algumas horas após o dano muscular.³⁶⁹ Como a colheita sanguínea foi realizada imediatamente após a indução de stresse, é provável que não tenha passado tempo suficiente para que o protocolo de indução causasse efeito. Hutchins, no seu estudo em ratos Sprague-Dawley, pretendeu avaliar a relação entre o dano causado por contracção muscular e a concentração da CK. Após o protocolo de dano, só quatro horas depois se verificou um aumento da concentração da CK no soro.³⁶⁹

A acupunctura não parece trazer alterações significativas quando comparados os resultados com o GI. Um estudo de Lin, observou que não houve alterações estatisticamente significativas na concentração da CK após tratamento com acupunctura, aplicada na dor muscular provocada por exercício induzido. Assim, tendo em conta que a anfetamina aumenta a rabdomiólise, a acupunctura poderá não ter um efeito suficiente para a contrariar. De salientar que isso também não acontece aquando apenas do exercício físico, como descrito por este autor.³⁷⁰

Os valores da CK obtidos estavam de acordo com o estudo de Matte, no qual os ratos foram submetidos a diferentes tipos de stresse, como a imobilização e o isolamento. Estes apresentavam valores superiores, comparativamente com os do grupo de controlo. Tal como este autor, é possível concluir, através da presente experiência, que a indução de stresse resultou num aumento da actividade da CK.²⁷⁵

Como referido anteriormente, a libertação da creatina-cinase para o soro é um indicador de dano miofibrilhar interno. Contudo, a quantificação da sua actividade como indicador de dano muscular tem gerado alguma discussão,²⁷⁶ uma vez que, para além da indução de stresse, existem outros factores que podem originar um aumento dos seus níveis séricos.^{286 277} Algumas das explicações para estas variações incluem o género, intensidade e duração do exercício físico e administrações intra-musculares.²⁷⁷⁻²⁸¹ Nesta experiência, utilizaram-se apenas ratos machos, de modo a evitar oscilações nas suas concentrações hormonais e nas concentrações da CK. Como tal, o género pode ser excluído como factor de influência nos valores da CK.

Como referido, esta enzima pode encontrar-se elevada em animais com grande actividade física, tais como aqueles que lutam entre si.^{286 277} Neste estudo este tipo de comportamento foi observado esporadicamente em todos os grupos, não se sabendo, no entanto, a sua influência real nos valores da concentração da creatina-cinase.

Outras das razões pelas quais a CK pode estar elevada é devido ao dano muscular provocado pela penetração na membrana de células musculares, causada por injeções

intramusculares.²⁶⁶ Erickson e colaboradores no seu estudo, verificaram um aumento dos níveis séricos da CK após injeção intramuscular de uma solução anestésica no músculo masseter. Na presente experiência devido à injeção, quer de anestesia, soro fisiológico e anfetamina, os níveis elevados da CK poderiam estar de alguma forma elevados também por este motivo. No entanto, neste estudo, as injeções foram efectuadas intraperitonealmente por um operador devidamente treinado e não directamente em nenhum músculo mastigador ou da marcha, como noutros estudos.

Como referido na literatura, o aumento da CK total pode ser devido ao aumento da isoforma MB, o qual pode ser observado aquando do dano no músculo cardíaco.^{262, 268} Esta hipótese pode ser descartada tendo em conta que, na histologia, foram excluídas quaisquer patologias cardíacas.

4.7.2-Cortisol

Vários estudos utilizam as alterações dos níveis de cortisol como um fiável indicador da presença de stresse.⁴⁴ Para efectuar as medições do cortisol podem ser recolhidas amostras salivares ou serológicas.²⁵² O aumento dos níveis de cortisol tem sido descrito, em vários estudos, como uma resposta à presença de stresse⁴⁴, relacionado com o bruxismo.^{30, 46, 108, 228} e com o consumo de ATS.^{252, 361, 371}

O cortisol salivar é um meio aceitável, não invasivo (não causa stresse) e conveniente para efectuar estas medições.^{44, 250} Contudo, o cortisol salivar representa apenas 70% dos níveis de cortisol presentes no soro.²⁵⁰ Para além disso, em estudos experimentais (em ratos) a colheita salivar em quantidades suficientes, para permitir um análise bioquímica, é tecnicamente mais difícil que a colheita sanguínea.²⁵⁰

Nesta experiência recolheram-se amostras sanguíneas de modo a determinar as variações na concentração de cortisol plasmático, após a indução de stresse.

O cortisol é regulado por um mecanismo de retrocontrolo negativo (*biofeedback*), o qual pode ser inibido por vários agentes stressantes, causando exacerbações periódicas da libertação de cortisol em vários períodos do dia. Estas alterações são denominadas de ritmo circadiano e ocorrem devido à alteração cíclica de 24 horas nos sinais do hipotálamo, responsáveis pela segregação desta hormona.

Os ratos desta experiência foram submetidos a um ciclo claro de 12 horas, desde as 07:00 às 19:00 horas e a um ciclo escuro, igualmente com um período de 12 horas, das 19:00 às 07:00 horas. Visto os ratos serem animais noctívagos, os seus níveis de cortisol plasmático apresentam um ritmo circadiano marcado, com um aumento gradual na última parte do período de luz, apresentando um pico máximo duas horas após o início do período escuro (às 21:00 horas).²⁴⁶ São obtidas respostas mais evidentes do cortisol quando os estímulos stressantes são aplicados em períodos em que a concentração se encontra a um nível mínimo, no início ou no ponto intermédio do sono, o qual ocorre entre as 09:00 e as 13:00 horas nos ratos.²⁴⁶

Sabe-se que os ratos apresentam um pico na concentração sérica do cortisol quando são expostos a novos ambientes.²⁴⁶ Neste estudo os ratos foram previamente habituados às gaiolas de observação, e existia sempre um período prévio de habituação diária antes da indução de stresse.

Sabe-se também que o pico plasmático do cortisol muda em ratos em que apenas é oferecida comida em alturas restritas do dia. Nestes casos o pico aparece poucos minutos antes da fase de alimentação.²⁴⁶ No caso dos roedores, que são animais noctívagos o pico do cortisol aparece na primeira metade da fase escura. No nosso estudo foram respeitados os ciclos de claro-escuro e a comida e água estavam disponíveis *ad libitum* pelo que estas influências foram minimizadas. Na medida em que os ratos são animais noctívagos os animais pertencentes ao grupo de controlo dormiam durante a maior parte do período de observação à semelhança do que era observado noutros estudos.¹⁹³

As determinações dos níveis sanguíneos de cortisol só se tornam válidas quando são relacionadas com o período do ritmo circadiano em que são efectuadas. Assim torna-se necessário, em qualquer estudo, padronizar e identificar correctamente os horários das colheitas de modo a minimizar quaisquer enviesamentos decorrentes deste factor.^{193, 244}

Na presente experiência, as colheitas foram efectuadas sempre entre as 09:00 e as 11:00 horas, após a indução de stresse, de modo a obter uma resposta padronizada das concentrações do cortisol.

A aplicação repetida de agentes indutores de stresse causa uma adaptação ou habituação por parte dos ratos, de tal modo que os valores de cortisol que surgem como resposta a estes agentes vão-se tornando cada vez menores. Por este motivo, neste estudo foram utilizados como agentes stressantes o ruído, a aglomeração e a vibração corporal, aplicados de forma intercalada, em função dos dias de experimentação.

No decorrer do tempo experimental, foram efectuadas três medições da concentração sérica do cortisol de todos os grupos experimentais. A primeira análise, dia 1, mostrou valores superiores para o Grupos II (0,91 µg/dL), Grupo III (1,087 µg/dL) e Grupo IV (1,142 µg/dL) comparativamente ao Grupo I (0,60 µg/dL). O Grupo I é estatisticamente diferente de todos os outros na Análise 1 (bem como nas restantes) sendo que $p < 0,02$, Teste LSD. Os restantes grupos, na Análise 1 e nas restantes, não são diferentes entre si: $p > 0,05$, Teste LSD.

Uma das possíveis justificações para o facto de as diferenças terem sido estatisticamente significativas entre o GI e os restantes grupos logo na primeira análise é o facto de a colheita ter sido realizada após a indução de stresse e indução de stresse e d-anfetamina i.p. respectivamente, tendo havido logo uma elevação significativa e imediata da concentração sérica do cortisol. Como a colheita no Grupo I não foi precedida de qualquer tipo de manipulação experimental, os valores do cortisol não se encontravam elevados.

Após a primeira semana de indução de stresse houve um aumento consistente de cortisol no Grupo II e Grupo III.

Os resultados obtidos ao longo das três medições, apenas foram significativos para o GII ($p = 0,002$; Teste ANOVA de Friedman), havendo concordância com outros estudos, como os de Ishikawa (1995) e de Yong-Jin Chen (2010), que mostraram que os valores de cortisol eram mais elevados em grupos sujeitos a stresse.^{231, 246} Tal facto também comprova a eficácia do protocolo de indução de stresse. O aumento do cortisol, na última colheita do Grupo II, não foi tão marcado quanto o da segunda colheita. Tal facto pode ser explicado pela capacidade de habituação dos animais ao stresse, apesar dos protocolos de stresse terem sido intercalados de modo a minimizar esta ocorrência. Ishikawa, concluiu que após a aplicação de estímulos stressantes em ratos, estes apresentavam um aumento dos níveis do cortisol.²⁴⁶ Um outro estudo de Yong-Jin Chen e colaboradores comprovou que após a indução de stresse psicológico em ratos Wistar, os valores do cortisol eram marcadamente mais elevados comparativamente com os dos ratos do grupo de controlo.²³¹

Para o Grupo GIII, verifica-se um aumento do cortisol ao longo das 3 análises, não sendo contudo esta variação estatisticamente significativa ($p = 0,078$; teste Anova de Friedman). Um pico inesperado e estatisticamente significativo surgiu na Análise 2 do Grupo IV. No entanto os níveis diminuíram, sendo que a variação GIV_Dia 1 ↔ GIV_Dia 14 não é estatisticamente significativa ($p = 0,278$; teste Anova de Friedman).

Vários estudos apoiam que o stresse³⁷² e a anfetamina promovem um aumento significativo do cortisol.^{361, 371, 373} O presente estudo apenas encontra resultados semelhantes

para o stresse uma vez que a anfetamina não alterou o perfil induzido pelo stresse em nenhum dos tempos estudados (Grupo III). O aumento dos movimentos MMNF induzidos pela anfetamina pode ser uma estratégia para lidar com o stresse, atenuando consequentemente a libertação de maiores quantidades de cortisol.

Seria interessante fazer a avaliação de um grupo apenas com indução de anfetamina, para perceber se o aumento de cortisol se deve, de alguma forma, à ATS ou apenas ao stresse.

Os resultados revelados pelo Grupo IV poderiam no entanto ser alvo de algumas reflexões. Um estudo de Huang, demonstrou que os níveis de cortisol salivar aumentam durante a manhã, em indivíduos tratados com acupunctura para o stresse crónico, admitindo serem necessários mais estudos para sustentar tal facto.³⁷⁴ Lee, estudou o efeito da acupunctura em humanos, sobre os níveis de cortisol no soro, em que as amostras sanguíneas foram retiradas antes do tratamento e 15 e 45 minutos depois da acupunctura. Observou que os níveis de cortisol aumentaram significativamente, havendo um aumento de 28% aos 15 minutos e de 50% aos 45 minutos.³⁷⁵ Estes dois estudos poderão justificar o aumento significativo do cortisol que ocorreu até ao dia 7, no Grupo II. A diminuição após o dia 7, pode levar a duas questões: ou a acupunctura necessita de tempo para actuar, ou, e segundo o estudo de Sato, pode especular-se que os ratos realizem estratégias de *coping* (na quais poderemos incluir os MMNF avaliados também neste estudo), de forma a exteriorizar o stresse,¹⁹³ levando assim a uma diminuição dos níveis de cortisol. Para além disso, se considerarmos que os ratos se habituam e diminuem a magnitude de resposta face à repetição do mesmo agente stressor, poderemos estar perante uma habituação do protocolo de acupunctura.

Outros estudos, onde os ratos foram submetidos a stresse por restrição física revelaram um aumento dos níveis de cortisol relativamente ao controlo. Os autores concluíram também que aos ratos aos quais era permitida a actividade de MMNF apresentavam menos alterações gástricas, menos alterações degenerativas de baço e timo, menos elevação do cortisol e dos neutrófilos (por activação do SNS) do que os ratos que embora submetidos a stresse não era permitido expressarem MMNF por restrição física. Os autores sugerem assim que o bruxismo induzido por stresse corresponde a uma forma de regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal e da resposta do SNA.¹⁹³ O aumento dos MMNF e a expressão de agressividade pode sugerir um mecanismo de *coping* que mantém a homeostase do organismo e desta forma reduz os efeitos adversos do stressante.¹⁹³

Estas conclusões são semelhantes às encontradas por Tsuda *et al.*²³³ em que ratos aos quais é permitida a expressão de stresse e agressividade (mordendo uma placa de madeira) apresentam uma menor expressão de noradrenalina em determinadas regiões cerebrais como o sistema límbico e o hipotálamo.

Uma variedade de agentes que produzem stresse, tais como ansiedade, medo, dor, fome, hemorragia, infecção e diminuição de glicose no sangue estimulam a libertação de cortisol pelas glândulas supra-renais.²⁴³ Assim sendo, o aumento dos níveis do cortisol observados nesta experiência poderia, também, ter sido devido aos factores referidos. Contudo, através da padronização, monitorização e controlo experimental a nível de cuidados sanitários, da garantia de fornecimento de nutrientes na ração e da inexistência de patologia verificada nas necrópsias, podem excluir-se estes factores como contributivos para o aumento dos valores do cortisol.

5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a expressão de MMNF atenua a activação do eixo Hipotálamo -Hipófise-Suprarrenal.

Em ratos, o stresse aumenta os MMNF, a atrição e a CK, sendo a anfetamina potenciadora destes factores.

Uma dose crescente de d-anfetamina potencia o bruxismo induzido por stresse mas não aumenta o cortisol circulante, ao contrário do stresse.

É possível concluir, através dos valores de atrição, cortisol e MMNF, que os protocolos de ruído, vibração e aglomeração utilizados neste estudo foram eficazes na indução de stresse.

A acupunctura é uma prática terapêutica com sucesso documentado no tratamento do stresse³³⁴⁻³³⁸ embora não existissem, até a data, estudos que relacionassem o seu efeito na atrição e nos MMNF. Ao contrário do que se esperava, neste estudo, o protocolo de acupunctura utilizado não diminuiu a atrição incisal e levou a uma perda de peso significativa. Não trouxe alterações significativas relativamente à CK, assim como aos pesos do timo, baço e supra-renais. A acupunctura aumentou o nível de cortisol na análise intermédia, conforme suportado na literatura,³⁷⁴⁻³⁷⁵ para o diminuir na terceira análise. Estas alterações são consistentes com as alterações observadas nos MMNF. Assim sugere-se que a manipulação por tratamento de acupunctura poderá, por si só, ser um agente stressante em animais, mas também que a acupunctura poderá necessitar de tempo para actuar ou que os animais, em função do tempo, se habituem a este factor, diminuindo a intensidade de resposta. No entanto, e devido à falta de estudos que relacionem acupunctura e atrição, são necessários mais dados para se chegar a um consenso de qual o seu verdadeiro efeito.

Caracterizar a etiologia do bruxismo é essencial para um cuidado integrador dos abusadores de ATS.

Apesar de não se poder extrapolar directamente os resultados obtidos em ratos para o Homem, a informação experimental em modelos com animais é essencial e necessária para servir de base ao desenho de estudos apropriados em humanos e para extrapolar hipóteses para futura investigação no Homem.

6-Perspectivas Futuras

Uma dissertação de mestrado, assim como qualquer trabalho científico apresenta características e limitações próprias. Deve procurar responder a algumas questões específicas mas permitir uma abertura suficiente para suscitar outras e orientar novas linhas de investigação.

Tendo por base os resultados apresentados, seria interessante analisar, segundo o mesmo protocolo, grupos experimentais submetidos isoladamente às variáveis de anfetamina e acupunctura. Poderia também ser interessante avaliar o efeito da acupunctura num tempo experimental mais longo, ou até mesmo diferentes protocolos de acupunctura.

Através de um procedimento de necrópsia meticuloso, este trabalho permitiu também recolher os músculos mastigatórios e os cérebros destes animais. Assim, temos já programado o início dos trabalhos no sentido de efectuar uma análise histomorfométrica dos músculos mastigadores e da marcha, bem como uma avaliação da expressão de marcadores cerebrais (corpo estriado) relacionados com bruxismo e drogas de abuso.

Numa perspectiva temporal mais alargada, seria interessante (embora limitados por questões orçamentais) efectuar Ressonâncias Magnéticas Funcionais a ratos submetidos a este protocolo, no sentido de identificar as regiões cerebrais envolvidas nestes processos.

Nota de Esclarecimento

Os autores deste trabalho não receberam qualquer apoio financeiro para a pesquisa dado por qualquer organização que possa ter ganho ou perda com a sua publicação. Os autores ou as suas famílias não receberam honorários de consultadoria ou foram pagos como avaliadores por organizações que possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho, não possuem acções ou investimentos em organizações também que possam ter ganho ou perda com esta publicação. Não receberam honorários de apresentações vindos de organizações que, com fins lucrativos, possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho, não estão empregados por qualquer entidade comercial e também não possuem patentes ou *royalties*, nem trabalham como testemunhas especializadas, ou realizam actividades para qualquer entidade com interesse financeiro nesta área.

Endereço para Correspondência

Júlio André Ramalho da Fonseca
Rua Dr. Paulo Quintela, nº 69, 7ºB
3030-393 Coimbra – Portugal

jfonsecas@hotmail.com

Parte C

Resumo

1- Resumo

Introdução: O conceito de etiologia central do bruxismo tem sido reforçado por vários estudos ao longo das últimas décadas. Foi sugerido que o consumo crónico de anfetamina produz bruxismo reforçando a hipótese da etiologia central. O efeito da acupunctura no bruxismo é ainda relativamente desconhecido.

Objectivos: Avaliação da atrição dentária, dos movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF), da concentração sérica da creatina cinase (CK) e cortisol, da evolução do peso corporal e dos efeitos da acupunctura num novo modelo experimental de MMNF com d-anfetamina.

Materiais e métodos: Foram utilizados 40 ratos Wistar machos com 9 semanas de idade, divididos em 4 grupos. O Grupo I (GI; de controlo) não sofreu qualquer manipulação experimental, o Grupo II (GII) foi submetido a um protocolo de indução de stresse e injeção de soro fisiológico, o Grupo III (GIII) submetido a stresse e injeção de anfetamina segundo um protocolo de doses crescentes durante 14 dias e o grupo IV (GIV) submetido ao mesmo protocolo de indução de stresse e de injeção de anfetamina e tratamento com acupunctura. Com o objectivo de avaliar a influência do stresse na atrição incisal realizaram-se marcas dentárias nos incisivos centrais inferiores dos ratos. Foram também realizadas três colheitas sanguíneas nos dias 1, 7 e 14 de modo a avaliar as variações das concentrações séricas da CK e do cortisol. O comportamento dos animais, incluindo os MMNF e o peso foram monitorizados ao longo do estudo.

Resultados: A d-anfetamina potenciou o efeito do stresse no aumento do comportamento MNF, e consequentemente, da atrição: Grupo I ($6,4 \pm 0,2$ mm), Grupo II ($6,8 \pm 0,3$ mm) e Grupo III ($7,2 \pm 0,4$ mm). O protocolo de acupunctura levou a um aumento significativo de MMNF numa fase inicial do estudo e consequentemente da atrição no Grupo IV ($7,84 \pm 0,62$ mm). Apesar de os animais do Grupo II não terem aumentado de peso, a anfetamina produziu uma diminuição do peso entre o dia 0 e o dia 14 no Grupo III ($-21,3 \pm 16,4$ g) e a acupunctura potenciou ainda mais esta perda de peso no Grupo IV ($-49,37 \pm 29,83$ g). Relativamente à concentração sérica da CK, observou-se que o stresse produziu um aumento dos teores séricos desta enzima relativamente ao Grupo I em função do tempo, atingindo o valor máximo ao 14º dia: Grupo I (1752,4 U/L), Grupo II (2573,2 U/L), Grupo III (3416,9 U/L) e Grupo IV (3315,9.U/L). Os presentes resultados demonstram ainda que a anfetamina potencia a acção do stresse no aumento da CK sérica nos dias 7 e 14 e a acupunctura parece não afectar estes valores. Os valores do cortisol para o Grupo II, Grupo III e Grupo IV são superiores ao Grupo I ($p < 0,0001$) nos 3 tempos medidos. No entanto, não há diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos II, III e IV.

Conclusões: Em ratos, o stresse aumenta os MMNF, a atrição e a CK, sendo a anfetamina potenciadora destes factores. Uma dose crescente de d-anfetamina potencia o bruxismo induzido por stresse mas não aumenta o cortisol circulante, ao contrário do stresse, sugerindo que a expressão de MMNF atenua a activação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal. Ao contrário do que se esperava, este protocolo de acupunctura não diminuiu a atrição incisal, apresentando estes animais uma perda de peso significativa. Não trouxe alterações significativas relativamente à CK, assim como aos pesos do timo, baço e supra-renais. A acupunctura aumentou o nível de cortisol na análise intermédia, para o diminuir na terceira análise. Sugere-se que a manipulação por tratamento de acupunctura poderá, por si só, ser um agente stressante, poderá necessitar de tempo para actuar ou ainda que os animais, em função do tempo, se habituem a este factor, diminuindo a intensidade de resposta.

Palavras-Chave: Anfetamina, Bruxismo, Stresse, Atrição Dentária, Cortisol, Creatina-Cinase, Acupunctura

2- Abstract

Introduction: The concept of the central etiology in bruxism has been reinforced by several studies in the last decades. It has been suggested that the chronic abuse of amphetamine produces bruxism, reinforcing its central etiology. The effects of acupuncture in bruxism are still moderately unknown.

Objective: To evaluate the impact of chronic use of amphetamine on the non-functional masticatory movements (NFMM), stress-induced behavior and dental attrition. Serum creatinine-kinase (CK) and cortisol levels were also assessed, as well as the weight evolution and the effects of acupuncture in a new experimental model of NFMM with d-amphetamine.

Materials and methods: 40 Wistar male rats (9 weeks of age) were divided as follows: Group I (control; GI) did not suffer any experimental manipulation; Group II was submitted to a stress induction protocol for 14 days including a single daily saline i.p. injection; Group III was submitted simultaneously to stress and to escalating single daily doses of amphetamine using a procedure of increasing doses and Group IV submitted to the same stress induced and amphetamine injection protocol and acupuncture treatment. Dental marks close to the gingival margin in the lower incisors were drawn to evaluate the influence of the induction protocols in the dental attrition. Blood samples were collected in days 1, 7 and 14 to evaluate the serum CK and cortisol levels. The animals' behaviour, including NFMM, was monitored throughout the study. The animals' behaviour, including the NFMM and their weight were monitored during the study.

Results: d-Amphetamine potentiated stress-induced increase in NFMM, stress-related behavior and consequently in dental attrition (Group I: $6,4 \pm 0,2$ mm, Group II: $6,8 \pm 0,3$ mm and Group III: $7,2 \pm 0,4$ mm. The acupuncture protocol led to a significant gain in NFMM, in an initial phase of the study and consequently in attrition in Group IV ($7,84 \pm 0,62$ mm). While the Group II animals didn't gain weight, amphetamine produced a decrease in body weight between day 0 and 14 in Group III ($-21,3 \pm 16,4$) and acupuncture potentiated this loss in Group IV ($-49,37 \pm 29,83$ g). The CK serum levels increased time-dependently in both GII and GIII groups (Day 14-Group I: 1752,4 U/L; Group II: 2573,2 U/L and Group III: 3416,9 U/L). The present results demonstrate that amphetamine enhances the action of stress as suggested by higher CK serum on 7 and 14 days when compared to Group II and acupuncture seems not to affect this values. The Group II and Group III cortisol levels were higher than the Group I cortisol levels

($p < 0,0001$) in all assessed periods. There are no statistically significant differences between Group II, Group III e Group IV.

Conclusions: In rats stress promotes behavioral changes in NFMM and an increase in attrition, in the raise of CK, being the ATS the enhancer of these factors. A sensitizing dose of d-amphetamine regimen potentiates stress-induced bruxism but does not raise cortisol levels, unlike stress, suggesting that NFMM attenuate Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis under this stimulant. Unlike what was expected, the acupuncture protocol did not decrease attrition and led to a significant weight decrease. It did not change CK levels, as well as thymic, spleen and adrenal glands weight. Acupuncture raised cortisol levels on the intermediate analysis, decreasing on the third analysis. We think that acupuncture manipulation may be a stressful agent, it may need longer time to produce effect or that the animals may get used to this factor, decreasing the intensity of the answer.

Keywords: Amphetamine, Bruxism, Stress, Dental Attrition, Cortisol, Creatine-Kinase, Acupuncture

Parte D

Bibliografia

1. Okeson JP. Fundamentals of occlusion and temporomandibular disorders. St. Louis: Mosby; 1985.
2. Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1993.
3. Rossetti LM, Rossetti PH, Conti PC, de Araujo Cdos R. Association between sleep bruxism and temporomandibular disorders: a polysomnographic pilot study. *Cranio* 2008;26(1):16-24.
4. Wadhwa S, Kapila S. TMJ disorders: future innovations in diagnostics and therapeutics. *J Dent Educ* 2008;72(8):930-47.
5. Makino M, Masaki C, Tomoeda K, Kharouf E, Nakamoto T, Hosokawa R. The relationship between sleep bruxism behavior and salivary stress biomarker level. *Int J Prosthodont* 2009;22(1):43-8.
6. Nagamatsu-Sakaguchi C, Minakuchi H, Clark GT, Kuboki T. Relationship between the frequency of sleep bruxism and the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in an adolescent population. *Int J Prosthodont* 2008;21(4):292-8.
7. Magnusson GECT. Management of Temporomandibular Disorders in the General Dental Practice: Quintessence Publishing Co; 1999.
8. Quartana PJ, Buenaver LF, Edwards RR, Klick B, Haythornthwaite JA, Smith MT. Pain catastrophizing and salivary cortisol responses to laboratory pain testing in temporomandibular disorder and healthy participants. *J Pain* 2010;11(2):186-94.
9. Manfredini D, Piccotti F, Ferronato G, Guarda-Nardini L. Age peaks of different RDC/TMD diagnoses in a patient population. *J Dent* 2010;38(5):392-9.
10. Lobbezoo F, Lavigne GJ. Do bruxism and temporomandibular disorders have a cause-and-effect relationship? *J Orofac Pain* 1997;11(1):15-23.
11. Manfredini D, Peretta R, Guarda-Nardini L, Ferronato G. Predictive value of combined clinically diagnosed bruxism and occlusal features for TMJ pain. *Cranio* 2010;28(2):105-13.
12. Okeson JP. Occlusion and functional disorders of the masticatory system. *Dent Clin North Am* 1995;39(2):285-300.
13. Kanehira H, Agariguchi A, Kato H, Yoshimine S, Inoue H. Association between stress and temporomandibular disorder. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi* 2008;52(3):375-80.
14. Okeson JP. The effects of hard and soft occlusal splints on nocturnal bruxism. *J Am Dent Assoc* 1987;114(6):788-91.
15. Manfredini D, Landi N, Fantoni F, Segu M, Bosco M. Anxiety symptoms in clinically diagnosed bruxers. *J Oral Rehabil* 2005;32(8):584-8.
16. Manfredini D, Lobbezoo F. Role of psychosocial factors in the etiology of bruxism. *J Orofac Pain* 2009;23(2):153-66.
17. Shetty S. Bruxism: a literature review. *J. Indian prosthodont Soc.* 2010;july-sept 2010 10(3):141-48.
18. Koyano K, Tsukiyama Y, Ichiki R, Kuwata T. Assessment of bruxism in the clinic. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):495-508.
19. Winocur E, Gavish A, Voikovitch M, Emodi-Perlman A, Eli I. Drugs and bruxism: a critical review. *J Orofac Pain* 2003;17(2):99-111.
20. DORLAND WA. *Dorland's illustrated medical dictionary*. . 29th ed ed: Philadelphia: W.B.Saunders; 2000.
21. WA D. *Dorland's illustrated medical dictionary*. 29th ed: Philadelphia: W.B. Saunders 2000.
22. Ramfjord SP. Bruxism, a clinical and electromyographic study. *J Am Dent Assoc* 1961;62:21-44.
23. Bader G, Kampe T, Tagdae T. Body movement during sleep in subjects with long-standing bruxing behavior. *Int J Prosthodont* 2000;13(4):327-33.
24. Shetty S, Pitti V, Satish Babu CL, Surendra Kumar GP, Deepthi BC. Bruxism: a literature review. *Journal of Indian Prosthodontic Society* 2010;10(3):141-8.
25. DuPont JS, Jr., Brown C. Management of nocturnal bruxism with an anterior stop point appliance. *J Tenn Dent Assoc* 2008;88(4):20-4; quiz 24-5.
26. Manconi M, Zucconi M, Carrot B, Ferri R, Oldani A, Ferini-Strambi L. Association between bruxism and nocturnal groaning. *Mov Disord* 2008;23(5):737-9.
27. Tokiwa O, Park BK, Takezawa Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Sato S. Relationship of tooth grinding pattern during sleep bruxism and dental status. *Cranio* 2008;26(4):287-93.

28. Rosales VP, Ikeda K, Hizaki K, Naruo T, Nozoe S, Ito G. Emotional stress and brux-like activity of the masseter muscle in rats. *Eur J Orthod* 2002;24(1):107-17.
29. de la Hoz-Aizpurua JL, Diaz-Alonso E, LaTouche-Arbizu R, Mesa-Jimenez J. Sleep bruxism. Conceptual review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(2):e231-8.
30. Gomez FM, Areso MP, Giralt MT, Sainz B, Garcia-Vallejo P. Effects of dopaminergic drugs, occlusal disharmonies, and chronic stress on non-functional masticatory activity in the rat, assessed by incisal attrition. *J Dent Res* 1998;77(6):1454-64.
31. Dorland WAN. *Dorland's illustrated medical dictionary*. 32nd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2012.
32. Lobbezoo F, Naeije M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. *J Oral Rehabil* 2001;28(12):1085-91.
33. Restrepo CC, Vasquez LM, Alvarez M, Valencia I. Personality traits and temporomandibular disorders in a group of children with bruxing behaviour. *J Oral Rehabil* 2008;35(8):585-93.
34. Klasser GD, Greene CS. Role of oral appliances in the management of sleep bruxism and temporomandibular disorders. *Alpha Omegan* 2007;100(3):111-9.
35. Restrepo C, Gomez S, Manrique R. Treatment of bruxism in children: a systematic review. *Quintessence Int* 2009;40(10):849-55.
36. Lavigne GJ, Kato T, Kolta A, Sessle BJ. Neurobiological mechanisms involved in sleep bruxism. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):30-46.
37. Lavigne GJ, Huynh N, Kato T, Okura K, Adachi K, Yao D, et al. Genesis of sleep bruxism: motor and autonomic-cardiac interactions. *Arch Oral Biol* 2007;52(4):381-4.
38. Lavigne GJ, Houry S, Abe S, Yamaguchi T, Raphael K. Bruxism physiology and pathology: an overview for clinicians. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):476-94.
39. Lavigne GJ, Rompre PH, Montplaisir JY. Sleep bruxism: validity of clinical research diagnostic criteria in a controlled polysomnographic study. *J Dent Res* 1996;75(1):546-52.
40. Nel JC, Bester SP, Snyman WD. Bruxism threshold: an explanation for successful treatment of the multifactorial aetiology of bruxism. *Australian prosthodontic journal / Australian Prosthodontic Society* 1995;9:33-7.
41. Lobbezoo F, Van Der Zaag J, Naeije M. Bruxism: its multiple causes and its effects on dental implants - an updated review. *J Oral Rehabil* 2006;33(4):293-300.
42. Dubner JRFR. *Dor Orofacial e Desordens Temporomandibulares*: Santos 2003.
43. Lang R, White PJ, Machalicek W, Rispoli M, Kang S, Aquilar J, et al. Treatment of bruxism in individuals with developmental disabilities: a systematic review. *Res Dev Disabil* 2009;30(5):809-18.
44. Tahara Y, Sakurai K, Ando T. Influence of chewing and clenching on salivary cortisol levels as an indicator of stress. *J Prosthodont* 2007;16(2):129-35.
45. Pavone BW. Bruxism and its effect on the natural teeth. *J Prosthet Dent* 1985;53(5):692-6.
46. Budtz-Jorgensen E. Bruxism and trauma from occlusion. An experimental model in Macaca monkeys. *J Clin Periodontol* 1980;7(2):149-62.
47. Kato T, Rompre P, Montplaisir JY, Sessle BJ, Lavigne GJ. Sleep bruxism: an oromotor activity secondary to micro-arousal. *J Dent Res* 2001;80(10):1940-4.
48. Kleinberg I. Bruxism: aetiology, clinical signs and symptoms. *Aust Prosthodont J* 1994;8:9-17.
49. Machado NA, Fonseca RB, Branco CA, Barbosa GA, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Dental wear caused by association between bruxism and gastroesophageal reflux disease: a rehabilitation report. *J Appl Oral Sci* 2007;15(4):327-33.
50. Poveda Roda R, Bagan JV, Diaz Fernandez JM, Hernandez Bazan S, Jimenez Soriano Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12(4):E292-8.
51. Olkinuora M. A psychosomatic study of bruxism with emphasis on mental strain and familiar predisposition factors. *Proc Finn Dent Soc* 1972;68(3):110-23.
52. Gameiro GH, da Silva Andrade A, Nouer DF, Ferraz de Arruda Veiga MC. How may stressful experiences contribute to the development of temporomandibular disorders? *Clin Oral Investig* 2006;10(4):261-8.
53. Jensen LB, Jensen SB. Effect of acupuncture on tension headache and urinary catecholamine excretion. *Scand J Dent Res* 1982;90(5):397-403.
54. Skoosky SA, Jaeger B, Oye RK. Prevalence of myofascial pain in general internal medicine practice. *West J Med* 1989;151(2):157-60.

55. Bader G, Lavigne G. Sleep bruxism; an overview of an oromandibular sleep movement disorder. REVIEW ARTICLE. *Sleep Med Rev* 2000;4(1):27-43.
56. Abe K, Shimakawa M. Genetic and developmental aspects of sleeptalking and teeth-grinding. *Acta Paedopsychiatr* 1966;33(11):339-44.
57. Lavigne GJ, Montplaisir JY. Restless legs syndrome and sleep bruxism: prevalence and association among Canadians. *Sleep* 1994;17(8):739-43.
58. Magnusson T, Carlsson GE, Egermark I. Changes in subjective symptoms of craniomandibular disorders in children and adolescents during a 10-year period. *J Orofac Pain* 1993;7(1):76-82.
59. Kato T, Montplaisir JY, Guitard F, Sessle BJ, Lund JP, Lavigne GJ. Evidence that experimentally induced sleep bruxism is a consequence of transient arousal. *J Dent Res* 2003;82(4):284-8.
60. Ohayon MM, Li KK, Guilleminault C. Risk factors for sleep bruxism in the general population. *Chest* 2001;119(1):53-61.
61. Melis M, Abou-Atme YS. Prevalence of bruxism awareness in a Sardinian population. *Cranio* 2003;21(2):144-51.
62. Maciel RN. Bruxismo. São Paulo, Brasil: Editora Artes Médicas, Lda.; 2010.
63. Rugh MZC. Fundamentos de Oclusão Quintessence Books; 1991.
64. Rompre PH, Daigle-Landry D, Guitard F, Montplaisir JY, Lavigne GJ. Identification of a sleep bruxism subgroup with a higher risk of pain. *J Dent Res* 2007;86(9):837-42.
65. Bader GG, Kampe T, Tagdae T, Karlsson S, Blomqvist M. Descriptive physiological data on a sleep bruxism population. *Sleep* 1997;20(11):982-90.
66. Lavigne GL, Lobbezoo F, Rompre PH, Nielsen TA, Montplaisir J. Cigarette smoking as a risk factor or an exacerbating factor for restless legs syndrome and sleep bruxism. *Sleep* 1997;20(4):290-3.
67. Lobbezoo F, Soucy JP, Montplaisir JY, Lavigne GJ. Striatal D2 receptor binding in sleep bruxism: a controlled study with iodine-123-iodobenzamide and single-photon-emission computed tomography. *J Dent Res* 1996;75(10):1804-10.
68. Rugh JD, Harlan J. Nocturnal bruxism and temporomandibular disorders. *Adv Neurol* 1988;49:329-41.
69. Boutros NN, Montgomery MT, Nishioka G, Hatch JP. The effects of severe bruxism on sleep architecture: a preliminary report. *Clin Electroencephalogr* 1993;24(2):59-62.
70. Jankelson B. Physiology of human dental occlusion. *J Am Dent Assoc* 1955;50(6):664-80.
71. Egermark-Eriksson I. Malocclusion and some functional recordings of the masticatory system in Swedish schoolchildren. *Swed Dent J* 1982;6(1):9-20.
72. Egermark-Eriksson I, Carlsson GE, Magnusson T. A long-term epidemiologic study of the relationship between occlusal factors and mandibular dysfunction in children and adolescents. *J Dent Res* 1987;66(1):67-71.
73. Egermark-Eriksson I, Carlsson GE, Magnusson T, Thilander B. A longitudinal study on malocclusion in relation to signs and symptoms of cranio-mandibular disorders in children and adolescents. *Eur J Orthod* 1990;12(4):399-407.
74. Vanderas AP, Manetas KJ. Relationship between malocclusion and bruxism in children and adolescents: a review. *Pediatr Dent* 1995;17(1):7-12.
75. Lobbezoo F, Rompre PH, Soucy JP, Iafrancesco C, Turkewicz J, Montplaisir JY, et al. Lack of associations between occlusal and cephalometric measures, side imbalance in striatal D2 receptor binding, and sleep-related oromotor activities. *J Orofac Pain* 2001;15(1):64-71.
76. Molina OF, dos Santos J, Jr. Hostility in TMD/bruxism patients and controls: a clinical comparison study and preliminary results. *Cranio* 2002;20(4):282-8.
77. Molina OF, dos Santos J, Mazzetto M, Nelson S, Nowlin T, Mainieri ET. Oral jaw behaviors in TMD and bruxism: a comparison study by severity of bruxism. *Cranio* 2001;19(2):114-22.
78. Rugh JD, Barghi N, Drago CJ. Experimental occlusal discrepancies and nocturnal bruxism. *J Prosthet Dent* 1984;51(4):548-53.
79. Greene CS, Marbach JJ. Epidemiologic studies of mandibular dysfunction: a critical review. *J Prosthet Dent* 1982;48(2):184-90.
80. Rugh JD, Graham GS, Smith JC, Ohrbach RK. Effects of canine versus molar occlusal splint guidance on nocturnal bruxism and craniomandibular symptomatology. *J Craniomandib Disord* 1989;3(4):203-10.
81. Clark GT, Adler RC. A critical evaluation of occlusal therapy: occlusal adjustment procedures. *J Am Dent Assoc* 1985;110(5):743-50.

82. Miller VJ, Yoeli Z, Barnea E, Zeltser C. The effect of parafunction on condylar asymmetry in patients with temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil* 1998;25(9):721-4.
83. Young DV, Rinchuse DJ, Pierce CJ, Zullo T. The craniofacial morphology of bruxers versus nonbruxers. *Angle Orthod* 1999;69(1):14-8.
84. Menapace SE, Rinchuse DJ, Zullo T, Pierce CJ, Shnorhokian H. The dentofacial morphology of bruxers versus non-bruxers. *Angle Orthod* 1994;64(1):43-52.
85. MONGINI F. O Sistema Estomatognático. São Paulo: Quintessence; 1988.
86. MOLINA OF. Fisiopatologia Craniomandibular. São Paulo: Pancast; 1989.
87. MACIEL RN. Oclusão e ATM. Procedimentos Clínicos. São Paulo: Santos; 1996.
88. OKESON JP. Dor Orofacial - Guia para Avaliação, Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Quintessence; 1998. .
89. Lobbezoo F, Lavigne GJ, Tanguay R, Montplaisir JY. The effect of catecholamine precursor L-dopa on sleep bruxism: a controlled clinical trial. *Mov Disord* 1997;12(1):73-8.
90. Pohto P. Experimental aggression and bruxism in rats. *Acta Odontol Scand* 1979;37(2):117-26.
91. Ernst AM. Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia* 1967;10(4):316-23.
92. Sunden-Kuronen B, Pohto P, Alanen E. Oral tardive dyskinesia in the rat. *Acta Odontol Scand* 1983;41(6):343-8.
93. Micheli F, Fernandez Pardal M, Gatto M, Asconape J, Giannaula R, Parera IC. Bruxism secondary to chronic antidopaminergic drug exposure. *Clin Neuropharmacol* 1993;16(4):315-23.
94. Amir I, Hermesh H, Gavish A. Bruxism secondary to antipsychotic drug exposure: a positive response to propranolol. *Clin Neuropharmacol* 1997;20(1):86-9.
95. FitzGerald PM, Jankovic J, Glaze DG, Schultz R, Percy AK. Extrapyramidal involvement in Rett's syndrome. *Neurology* 1990;40(2):293-5.
96. Stoessl AJ. Which dopamine receptor(s) do we need for motor function? Lessons from gene targeting and translational blockade. *Parkinsonism Relat Disord* 1996;2(4):167-75.
97. Bleuler E. [Dementia praecox or the group of schizophrenias]. *Vertex* 2010;21(93):394-400.
98. Greene SL, Kerr F, Braitberg G. Review article: amphetamines and related drugs of abuse. *Emergency medicine Australasia : EMA* 2008;20(5):391-402.
99. Goodchild JH, Donaldson M. Methamphetamine abuse and dentistry: a review of the literature and presentation of a clinical case. *Quintessence international* 2007;38(7):583-90.
100. Donaldson M, Goodchild JH. Oral health of the methamphetamine abuser. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2006;63(21):2078-82.
101. Baylen CA, Rosenberg H. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction* 2006;101(7):933-47.
102. See SJ, Tan EK. Severe amphetamine-induced bruxism: treatment with botulinum toxin. *Acta neurologica Scandinavica* 2003;107(2):161-3.
103. Areso MP, Giralt MT, Sainz B, Prieto M, Garcia-Vallejo P, Gomez FM. Occlusal disharmonies modulate central catecholaminergic activity in the rat. *J Dent Res* 1999;78(6):1204-13.
104. Sjolholm TT, Lehtinen I, Piha SJ. The effect of propranolol on sleep bruxism: hypothetical considerations based on a case study. *Clin Auton Res* 1996;6(1):37-40.
105. Huynh N, Lavigne GJ, Lanfranchi PA, Montplaisir JY, de Champlain J. The effect of 2 sympatholytic medications--propranolol and clonidine--on sleep bruxism: experimental randomized controlled studies. *Sleep* 2006;29(3):307-16.
106. Gerber PE, Lynd LD. Selective serotonin-reuptake inhibitor-induced movement disorders. *Ann Pharmacother* 1998;32(6):692-8.
107. Thorpy MJ. Classification of sleep disorders. *J Clin Neurophysiol* 1990;7(1):67-81.
108. Gomez FM, Giralt MT, Sainz B, Arrue A, Prieto M, Garcia-Vallejo P. A possible attenuation of stress-induced increases in striatal dopamine metabolism by the expression of non-functional masticatory activity in the rat. *Eur J Oral Sci* 1999;107(6):461-7.
109. Smith SB, Maixner DW, Greenspan JD, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, et al. Potential genetic risk factors for chronic TMD: genetic associations from the OPPERA case control study. *J Pain* 2011;12(11 Suppl):T92-101.
110. Arpels. the female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. *J Reprod Med.* 1996;41(9):633-9.

111. Miyawaki S, Tanimoto Y, Araki Y, Katayama A, Fujii A, Takano-Yamamoto T. Association between nocturnal bruxism and gastroesophageal reflux. *Sleep* 2003;26(7):888-92.
112. Hamamoto DT, Rhodus NL. Methamphetamine abuse and dentistry. *Oral Dis* 2009;15(1):27-37.
113. Rees TD. Oral effects of drug abuse. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3(3):163-84.
114. Heng CK, Badner VM, Schiop LA. Meth mouth. *N Y State Dent J* 2008;74(5):50-1.
115. Redfearn PJ, Agrawal N, Mair LH. An association between the regular use of 3,4 methylenedioxy-methamphetamine (ecstasy) and excessive wear of the teeth. *Addiction* 1998;93(5):745-8.
116. Brand HS, Dun SN, Nieuw Amerongen AV. Ecstasy (MDMA) and oral health. *Br Dent J* 2008;204(2):77-81.
117. Hartmann E. Alcohol and bruxism. *N Engl J Med* 1979;301(6):333-4.
118. Harness DM, Peltier B. Comparison of MMPI scores with self-report of sleep disturbance and bruxism in the facial pain population. *Cranio* 1992;10(1):70-4.
119. Schenck CH, Mahowald MW. REM sleep behavior disorder: clinical, developmental, and neuroscience perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP. *Sleep* 2002;25(2):120-38.
120. Bailey DR. Tension headache and bruxism in the sleep disordered patient. *Cranio* 1990;8(2):174-82.
121. Dworkin SF, Sherman J, Mancl L, Ohrbach R, LeResche L, Truelove E. Reliability, validity, and clinical utility of the research diagnostic criteria for Temporomandibular Disorders Axis II Scales: depression, non-specific physical symptoms, and graded chronic pain. *J Orofac Pain* 2002;16(3):207-20.
122. Fu K, Ma X, Zhang Z, Tian Y, Zhou Y, Zhao Y. Study on the use of temporomandibular joint dysfunction index in temporomandibular disorders. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;37(5):330-2.
123. Lund JP, Widmer CG. Evaluation of the use of surface electromyography in the diagnosis, documentation, and treatment of dental patients. *J Craniomandib Disord* 1989;3(3):125-37.
124. Laskin DM, Greene CS. Technological methods in the diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Int J Technol Assess Health Care* 1990;6(4):558-68.
125. Lund JP, Widmer CG, Feine JS. Validity of diagnostic and monitoring tests used for temporomandibular disorders. *J Dent Res* 1995;74(4):1133-43.
126. Manfredini D, Cocilovo F, Favero L, Ferronato G, Tonello S, Guarda-Nardini L. Surface electromyography of jaw muscles and kinesiographic recordings: diagnostic accuracy for myofascial pain. *J Oral Rehabil* 2011;38(11):791-9.
127. Manfredini D, Favero L, Federzoni E, Cocilovo F, Guarda-Nardini L. Kinesiographic recordings of jaw movements are not accurate to detect magnetic resonance-diagnosed temporomandibular joint (TMJ) effusion and disk displacement: findings from a validation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114(4):457-63.
128. Suvinen TI, Kempainen P. Review of clinical EMG studies related to muscle and occlusal factors in healthy and TMD subjects. *J Oral Rehabil* 2007;34(9):631-44.
129. Klasser GD, Okeson JP. The clinical usefulness of surface electromyography in the diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *J Am Dent Assoc* 2006;137(6):763-71.
130. Jadidi F, Castrillon E, Svensson P. Effect of conditioning electrical stimuli on temporalis electromyographic activity during sleep. *J Oral Rehabil* 2008;35(3):171-83.
131. Drum W. A new concept of periodontal diseases. *J Periodontol* 1975;46(8):504-10.
132. Grippo JO. Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent* 1991;3(1):14-9.
133. Grippo JO, Simring M. Dental 'erosion' revisited. *J Am Dent Assoc* 1995;126(5):619-20, 23-4, 27-30.
134. van 't Spijker A, Kreulen CM, Creugers NH. Attrition, occlusion, (dys)function, and intervention: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2007;18 Suppl 3:117-26.
135. Johansson A, Johansson AK, Omar R, Carlsson GE. Rehabilitation of the worn dentition. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):548-66.
136. Sato S, Hotta TH, Pedrazzi V. Removable occlusal overlay splint in the management of tooth wear: a clinical report. *J Prosthet Dent* 2000;83(4):392-5.
137. Ganddini MR, Al-Mardini M, Graser GN, Almog D. Maxillary and mandibular overlay removable partial dentures for the restoration of worn teeth. *J Prosthet Dent* 2004;91(3):210-4.

138. Wickens JL. Tooth surface loss. 6. Prevention and maintenance. *Br Dent J* 1999;186(8):371-6.
139. Fonseca J, Nicolau P, Daher T. Maxillary overlay removable partial dentures for the restoration of worn teeth. *Compend Contin Educ Dent* 2011;32(3):12, 14-20; quiz 21, 32.
140. Larson TD. Tooth wear: when to treat, why, and how. Part One. *Northwest Dent* 2009;88(5):31-8.
141. Larson TD. Tooth wear: when to treat, why, and how. Part two. *Northwest Dent* 2009;88(6):19-28.
142. Kaidonis JA. Tooth wear: the view of the anthropologist. *Clin Oral Investig* 2008;12 Suppl 1:S21-6.
143. Raigrodski AJ, Dogan S. Concepts and considerations of tooth wear: part I--the chemical component. *Pract Proced Aesthet Dent* 2007;19(8):511-2.
144. Pontefract HA. Erosive toothwear in the elderly population. *Gerodontology* 2002;19(1):5-16.
145. Chadwick RG, Mitchell HL. Presentation of quantitative tooth wear data to clinicians. *Quintessence Int* 1999;30(6):393-8.
146. Smith BG, Bartlett DW, Robb ND. The prevalence, etiology and management of tooth wear in the United Kingdom. *J Prosthet Dent* 1997;78(4):367-72.
147. Budtz-Jorgensen E, Thylstrup A. The effect of controlled oral hygiene in overdenture wearers. *Acta Odontol Scand* 1988;46(4):219-5.
148. Davies SJ, Gray RJ, Qualtrough AJ. Management of tooth surface loss. *Br Dent J* 2002;192(1):11-6, 19-23.
149. Harley K. Tooth wear in the child and the youth. *Br Dent J* 1999;186(10):492-6.
150. Isacsson G, Bodin L, Selden A, Barregard L. Variability in the quantification of abrasion on the Bruxcore device. *J Orofac Pain* 1996;10(4):362-8.
151. Seligman DA, Pullinger AG, Solberg WK. The prevalence of dental attrition and its association with factors of age, gender, occlusion, and TMJ symptomatology. *J Dent Res* 1988;67(10):1323-33.
152. Aloé. Bruxismo durante o sono. *Rev. Neurociências* 2003;11:4-17.
153. Pierce. A comparison of different treatments for nocturnal bruxism. *J Dent Res* 1988;67:597-601.
154. Forssell H, Kalso E. Application of principles of evidence-based medicine to occlusal treatment for temporomandibular disorders: are there lessons to be learned? *J Orofac Pain* 2004;18(1):9-22; discussion 23-32.
155. Koh H, Robinson PG. Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2003(1):CD003812.
156. Koh H, Robinson PG. Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders. *J Oral Rehabil* 2004;31(4):287-92.
157. Luther F. Orthodontics and the temporomandibular joint: where are we now? Part 2. Functional occlusion, malocclusion, and TMD. *Angle Orthod* 1998;68(4):305-18.
158. Jung A, Shin BC, Lee MS, Sim H, Ernst E. Acupuncture for treating temporomandibular joint disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized, sham-controlled trials. *J Dent* 2011;39(5):341-50.
159. Kinon BJ, Merson D, Kane JM. Effect of daily dose of chronic haloperidol and chronic apomorphine on behavioral hypersensitivity in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1984;84(3):347-51.
160. Klasser GD, Greene CS, Lavigne GJ. Oral appliances and the management of sleep bruxism in adults: a century of clinical applications and search for mechanisms. *Int J Prosthodont* 2010;23(5):453-62.
161. Landry ML, Rompre PH, Manzini C, Guitard F, de Grandmont P, Lavigne GJ. Reduction of sleep bruxism using a mandibular advancement device: an experimental controlled study. *Int J Prosthodont* 2006;19(6):549-56.
162. Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1989.
163. Okeson JP, Phillips BA, Berry DT, Cook YR, Cabelka JF. Nocturnal bruxing events in subjects with sleep-disordered breathing and control subjects. *J Craniomandib Disord* 1991;5(4):258-64.
164. Oksenberg A. Sleep bruxism related to obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure. *Sleep Med Rev* 2003;3:513-515.

165. Perry HT, Lammie GA, Main J, Teuscher GW. Occlusion in a stress situation. *J Am Dent Assoc* 1960;60:626-33.
166. Richardin P, Westphal A, Divry M, Didier G. Influence of stress and occlusal interference on the EMG activity of some masticatory muscles during a single mastication cycle. *J Oral Rehabil* 1995;22(10):775-80.
167. Rintakoski K, Ahlberg J, Hublin C, Broms U, Madden PA, Kononen M, et al. Bruxism is associated with nicotine dependence: a nationwide Finnish twin cohort study. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 2010;12(12):1254-60.
168. Rintakoski K, Ahlberg J, Hublin C, Lobbezoo F, Rose RJ, Murtomaa H, et al. Tobacco use and reported bruxism in young adults: a nationwide Finnish Twin Cohort Study. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 2010;12(6):679-83.
169. Shen YF, Goddard G. The short-term effects of acupuncture on myofascial pain patients after clenching. *Pain Pract* 2007;7(3):256-64.
170. Rugh JD, Johnson RW. Temporal analysis of nocturnal bruxism during EMG feedback. *J Periodontol* 1981;52(5):263-5.
171. Leo. Movement disorders associated with the serotonin selective reuptake inhibitors *J Clin Psychiatry* 1996;57:449-454.
172. Sjöholm T, Lehtinen II, Helenius H. Masseter muscle activity in diagnosed sleep bruxists compared with non-symptomatic controls. *J Sleep Res* 1995;4(1):48-55.
173. Lobbezoo F, van der Zaag J, van Selms MK, Hamburger HL, Naeije M. Principles for the management of bruxism. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):509-23.
174. American Academy of Orofacial Pain., Okeson JP. *Orofacial pain : guidelines for assessment, diagnosis, and management*. Chicago: Quintessence Pub. Co., Inc.; 1996.
175. Dao TT, Lavigne GJ. Oral splints: the crutches for temporomandibular disorders and bruxism? *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(3):345-61.
176. Hachmann A, Martins EA, Araujo FB, Nunes R. Efficacy of the nocturnal bite plate in the control of bruxism for 3 to 5 year old children. *J Clin Pediatr Dent* 1999;24(1):9-15.
177. van der Zaag J, Lobbezoo F, Wicks DJ, Visscher CM, Hamburger HL, Naeije M. Controlled assessment of the efficacy of occlusal stabilization splints on sleep bruxism. *J Orofac Pain* 2005;19(2):151-8.
178. Dube C, Rompre PH, Manzini C, Guitard F, de Grandmont P, Lavigne GJ. Quantitative polygraphic controlled study on efficacy and safety of oral splint devices in tooth-grinding subjects. *J Dent Res* 2004;83(5):398-403.
179. Hamada T, Kotani H, Kawazoe Y, Yamada S. Effect of occlusal splints on the EMG activity of masseter and temporal muscles in bruxism with clinical symptoms. *J Oral Rehabil* 1982;9(2):119-23.
180. Sheikholeslam A, Holmgren K, Riise C. A clinical and electromyographic study of the long-term effects of an occlusal splint on the temporal and masseter muscles in patients with functional disorders and nocturnal bruxism. *J Oral Rehabil* 1986;13(2):137-45.
181. Goodnick PJ, Henry JH, Buki VM. Treatment of depression in patients with diabetes mellitus. *J Clin Psychiatry* 1995;56(4):128-36.
182. Hawton. *terapia cognitivo-comportamental paraproblemas psiquiátricos : um guia prático*: São Paulo, Martins Fontes; 1997.
183. Holmes. *Psicologia dos transtornos mentais*: Porto Alegre - Artes Médicas; 1997.
184. Liebowitz M. Panic disorder as a chronic illness. *J Clin Psychiatry* 1997;13:5-8.
185. Mester R, Toren P, Mizrachi I, Wolmer L, Karni N, Weizman A. Caffeine withdrawal increases lithium blood levels. *Biol Psychiatry* 1995;37(5):348-50.
186. Penker K. The function of tensor veli palatini muscles in patients with oral symptoms and temporomandibular disorder - an EMG study. *J Oral Rehabil* 2000;2(4):344-8.
187. Pollack MH, Smoller JW. The longitudinal course and outcome of panic disorder. *Psychiatr Clin North Am* 1995;18(4):785-801.
188. Rasmussen SA. Lithium and tryptophan augmentation in clomipramine-resistant obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 1984;141(10):1283-5.
189. Selye H. *Stress in health and disease*: Sydney, Butterworth; 1976.
190. Lobbezoo F, Ahlberg J, Glaros AG, Kato T, Koyano K, Lavigne GJ, et al. Bruxism defined and graded: an international consensus. *J Oral Rehabil* 2013;40(1):2-4.

191. Giraki M, Schneider C, Schafer R, Singh P, Franz M, Raab WH, et al. Correlation between stress, stress-coping and current sleep bruxism. *Head Face Med* 2010;6:2.
192. Pierce CJ, Chrisman K, Bennett ME, Close JM. Stress, anticipatory stress, and psychologic measures related to sleep bruxism. *J Orofac Pain* 1995;9(1):51-6.
193. Sato C, Sato S, Takashina H, Ishii H, Onozuka M, Sasaguri K. Bruxism affects stress responses in stressed rats. *Clin Oral Investig* 2010;14(2):153-60.
194. Winocur E, Uziel N, Lisha T, Goldsmith C, Eli I. Self-reported bruxism - associations with perceived stress, motivation for control, dental anxiety and gagging. *Journal of oral rehabilitation* 2011;38(1):3-11.
195. Byrd KE. Characterization of brux-like movements in the laboratory rat by optoelectronic mandibular tracking and electromyographic techniques. *Arch Oral Biol* 1997;42(1):33-43.
196. Shoji YN, Bruce IC, Siu LY. Electromyographic assessment of non-functional masseter muscle in an awake animal model. *Cranio* 1994;12(2):110-3.
197. Byrd KE. Loci and characteristics of EMG silent periods during masticatory mandibular movements in rats. *J Dent Res* 1988;67(10):1284-8.
198. Rugh JD, Solberg WK. Electromyographic studies of bruxist behavior before and during treatment. *J Calif Dent Assoc* 1975;3(9):56-9.
199. Clark GT, Rugh JD, Handelman SL. Nocturnal masseter muscle activity and urinary catecholamine levels in bruxers. *J Dent Res* 1980;59(10):1571-6.
200. Rao SM, Glaros AG. Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals. *J Dent Res* 1979;58(9):1872-8.
201. Clark GT, Ram S. Four oral motor disorders: bruxism, dystonia, dyskinesia and drug-induced dystonic extrapyramidal reactions. *Dent Clin North Am* 2007;51(1):225-43, viii-ix.
202. Weiss JM, Pohorecky LA, Salman S, Gruenthal M. Attenuation of gastric lesions by psychological aspects of aggression in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1976;90(3):252-9.
203. Navia JM. Animal models in dental research The University of Alabama Press; 1977.
204. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch RL, Festing MF, et al. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11. *Altern Lab Anim* 1995;23(6):838-66.
205. Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim* 1995;23(3):298-304.
206. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim* 1994;28(3):193-211.
207. Goldstein SA. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:183-92.
208. Siegel MI, Mooney MP. Appropriate animal models for craniofacial biology. *Cleft Palate J* 1990;27(1):18-25.
209. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;1(1):60-8.
210. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995;16(4 Suppl):277S-84S.
211. Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 1993;14(3):369-77.
212. Herring SW. TMJ anatomy and animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003;3(4):391-4; discussion 406-7.
213. Bourdiol PM, Aigouy L, Pajot J, Woda A. Masseteric facilitation induced by electrical stimulation of rat orofacial tissues. *Arch Oral Biol* 1992;37(4):315-21.
214. Capra NF, Ro JY. Human and animal experimental models of acute and chronic muscle pain: intramuscular algescic injection. *Pain* 2004;110(1-2):3-7.
215. Schutz TCB, Andersen ML, Tufik S. The influence of orofacial pain on sleep pattern: A review of theory, animal models and future directions. *Sleep Medicine* 2009;10(8):822-28.
216. Svensson P. What can human experimental pain models teach us about clinical TMD? *Arch Oral Biol* 2007;52(4):391-4.
217. Kehl LJ, Trempe TM, Hargreaves KM. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. *Pain* 2000;85(3):333-43.
218. Tamminga CA, Dale JM, Goodman L, Kaneda H, Kaneda N. Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: a study in three rat strains. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;102(4):474-8.

219. Ramfjord SP, Berry HM, Jr., Charbeneau GT, Lee RE, Pavone BW, Phillips RW. Report of the Committee on Scientific Investigation of the American Academy of Restorative Dentistry. *J Prosthet Dent* 1974;32(2):198-221.
220. Bani D, Bani T, Bergamini M. Morphologic and biochemical changes of the masseter muscles induced by occlusal wear: studies in a rat model. *J Dent Res* 1999;78(11):1735-44.
221. Anisman H, Irwin J, Zacharko RM, Tombaugh TN. Effects of dopamine receptor blockade on avoidance performance: assessment of effects on cue-shock and response-outcome associations. *Behav Neural Biol* 1982;36(3):280-90.
222. Anisman H, Kokkinidis L, Merali Z. Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res* 1996;731(1-2):1-11.
223. Anisman H, Suissa A, Sklar LS. Escape deficits induced by uncontrollable stress: antagonism by dopamine and norepinephrine agonists. *Behav Neural Biol* 1980;28(1):34-47.
224. Passatore M, Roatta S. Modulation operated by the sympathetic nervous system on jaw reflexes and masticatory movement. *Arch Oral Biol* 2007;52(4):343-6.
225. Jones DA, Rollman GB, Brooke RI. The cortisol response to psychological stress in temporomandibular dysfunction. *Pain* 1997;72(1-2):171-82.
226. Young EA, Abelson J, Lightman SL. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* 2004;25(2):69-76.
227. Zeredo JL, Kumei Y, Shibazaki T, Yoshida N, Toda K. Measuring biting behavior induced by acute stress in the rat. *Behav Res Methods* 2009;41(3):761-4.
228. Budtz-Jorgensen E. A 3-month study in monkeys of occlusal dysfunction and stress. *Scand J Dent Res* 1980;88(3):171-80.
229. Vanderas AP, Menenakou M, Kouimtzi T, Papagiannoulis L. Urinary catecholamine levels and bruxism in children. *J Oral Rehabil* 1999;26(2):103-10.
230. Ogawa N, Hara C, Takaki S. Anxiolytic activity of SC-48274 compared with those of buspirone and diazepam in experimental anxiety models. *Jpn J Pharmacol* 1993;61(2):115-21.
231. Chen YJ, Huang F, Zhang M, Shang HY. Psychological stress alters ultrastructure and energy metabolism of masticatory muscle in rats. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:302693.
232. Havemann U, Magnus B, Moller HG, Kuschinsky K. Individual and morphological differences in the behavioural response to apomorphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1986;90(1):40-8.
233. Tsuda A, Tanaka M, Ida Y, Shirao I, Gondoh Y, Oguchi M, et al. Expression of aggression attenuates stress-induced increases in rat brain noradrenaline turnover. *Brain Res* 1988;474(1):174-80.
234. Tanaka T, Yoshida M, Yokoo H, Tomita M, Tanaka M. Expression of aggression attenuates both stress-induced gastric ulcer formation and increases in noradrenaline release in the rat amygdala assessed by intracerebral microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59(1):27-31.
235. Ro JY, Svensson P, Capra N. Effects of experimental muscle pain on electromyographic activity of masticatory muscles in the rat. *Muscle Nerve* 2002;25(4):576-84.
236. Deriu F, Ortu E, Capobianco S, Giaconi E, Melis F, Aiello E, et al. Origin of sound-evoked EMG responses in human masseter muscles. *J Physiol* 2007;580(Pt 1):195-209.
237. Gallo LM, Gross SS, Palla S. Nocturnal masseter EMG activity of healthy subjects in a natural environment. *J Dent Res* 1999;78(8):1436-44.
238. Seligman DA, Pullinger AG. The role of functional occlusal relationships in temporomandibular disorders: a review. *J Craniomandib Disord* 1991;5(4):265-79.
239. Teaford MF, Tylenda CA. A new approach to the study of tooth wear. *J Dent Res* 1991;70(3):204-7.
240. Weinreb MM, Assif D, Michaeli Y. Role of attrition in the physiology of the rat incisor. I. The relative value of different components of attrition and their effect on eruption. *J Dent Res* 1967;46(3):527-31.
241. Weinreb MM, Michaeli Y, Silberman G. Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor. IV. Prevention of attrition in the articulating incisor. *J Dent Res* 1969;48(1):120-30.
242. Kiliaridis S. The relationship between masticatory function and craniofacial morphology. III. The eruption pattern of the incisors in the growing rat fed a soft diet. *Eur J Orthod* 1986;8(2):71-9.
243. Lehninger DLNC. *Lehninger's Principles of Biochemistry* 4th ed: W.H. Freeman; 2004.
244. Guyton AC. *Arthur C. Guyton*. 9 ed: GUANABARA KOOGAN.

245. Korszun A, Young EA, Singer K, Carlson NE, Brown MB, Crofford L. Basal circadian cortisol secretion in women with temporomandibular disorders. *J Dent Res* 2002;81(4):279-83.
246. Ishikawa M, Ohdo S, Watanabe H, Hara C, Ogawa N. Alteration in circadian rhythm of plasma corticosterone in rats following sociopsychological stress induced by communication box. *Physiol Behav* 1995;57(1):41-7.
247. Gutenbrunner C. Circadian variations of the serum creatine kinase level--a masking effect? *Chronobiol Int* 2000;17(4):583-90.
248. Stryer JMBJLTL. *Biochemistry* 5th ed: W.H. Freeman and company.
249. Tavadia HB, Fleming KA, Hume PD, Simpson HW. Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation. *Clin Exp Immunol* 1975;22(1):190-3.
250. Duplessis C, Rascona D, Cullum M, Yeung E. Salivary and free serum cortisol evaluation. *Mil Med* 2010;175(5):340-6.
251. Taylor SE, Burklund LJ, Eisenberger NI, Lehman BJ, Hilmert CJ, Lieberman MD. Neural bases of moderation of cortisol stress responses by psychosocial resources. *J Pers Soc Psychol* 2008;95(1):197-211.
252. Vedhara K, Miles J, Bennett P, Plummer S, Tallon D, Brooks E, et al. An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. *Biol Psychol* 2003;62(2):89-96.
253. Taylor SE, Lerner JS, Sherman DK, Sage RM, McDowell NK. Are self-enhancing cognitions associated with healthy or unhealthy biological profiles? *J Pers Soc Psychol* 2003;85(4):605-15.
254. Creswell JD, Welch WT, Taylor SE, Sherman DK, Gruenewald TL, Mann T. Affirmation of personal values buffers neuroendocrine and psychological stress responses. *Psychol Sci* 2005;16(11):846-51.
255. Melamed S, Ugarten U, Shirom A, Kahana L, Lerman Y, Froom P. Chronic burnout, somatic arousal and elevated salivary cortisol levels. *J Psychosom Res* 1999;46(6):591-8.
256. Semple CG, Gray CE, Borland W, Espie CA, Beastall GH. Endocrine effects of examination stress. *Clin Sci (Lond)* 1988;74(3):255-9.
257. Kirschbaum C, Klauer T, Filipp SH, Hellhammer DH. Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom Med* 1995;57(1):23-31.
258. Marshall GD, Jr., Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun* 1998;12(4):297-307.
259. Derbyshire SW, Jones AK, Devani P, Friston KJ, Feinmann C, Harris M, et al. Cerebral responses to pain in patients with atypical facial pain measured by positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(10):1166-72.
260. Butler JH, Stallard RE. Physiologic stress and tooth contact. *J Periodontal Res* 1969;4(2):152-8.
261. Gasper MC, Gilchrist JM. Creatine kinase: a review of its use in the diagnosis of muscle disease. *Med Health R I* 2005;88(11):398, 400-4.
262. Glew MDRRH. *Medical Biochemistry- Human Metabolism in Health and Disease*: Wiley; 2009.
263. Caret KDJTR. *General, Organic and Biochemistry* sixth ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
264. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, et al. Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 1995;270(34):19921-9.
265. Hallberg JW, Topel DG, Christian LL. Creatine phosphokinase isoenzymes in stress-susceptible and stress-resistant pigs. *J Anim Sci* 1979;49(6):1464-9.
266. Cox PJ, Rothwell PS. Serum creatine kinase studies in mandibular pain dysfunction. *J Oral Rehabil* 1984;11(1):45-52.
267. Adamson ED. Isoenzyme transitions of creatine phosphokinase, aldolase and phosphoglycerate mutase in differentiating mouse cells. *J Embryol Exp Morphol* 1976;35(2):355-67.
268. Witteveen SA, Sobel BE, DeLuca M. Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(4):1384-7.
269. Streijger F, Pluk H, Oerlemans F, Beckers G, Bianco AC, Ribeiro MO, et al. Mice lacking brain-type creatine kinase activity show defective thermoregulation. *Physiol Behav* 2009;97(1):76-86.
270. Boehm E, Veksler V, Mateo P, Lenoble C, Wieringa B, Ventura-Clapier R. Maintained coupling of oxidative phosphorylation to creatine kinase activity in sarcomeric mitochondrial creatine kinase-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(5):901-12.

271. Streijger F, Scheenen WJ, van Luijtelaaar G, Oerlemans F, Wieringa B, Van der Zee CE. Complete brain-type creatine kinase deficiency in mice blocks seizure activity and affects intracellular calcium kinetics. *Epilepsia* 2010;51(1):79-88.
272. Fitzpatrick LR. Masseter muscle rigidity, elevated creatine kinase, and rhabdomyolysis following succinylcholine administration: a case report. *AANA J* 2008;76(5):349-54.
273. Epstein Y. Clinical significance of serum creatine phosphokinase activity levels following exercise. *Isr J Med Sci* 1995;31(11):698-9.
274. Sinert R, Kohl L, Rainone T, Scalea T. Exercise-induced rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med* 1994;23(6):1301-6.
275. Matte AC. Effect of isolation induced aggression in mice on serum creatine kinase. *Psychopharmacologia* 1975;42(2):209-10.
276. Friden J, Lieber RL. Serum creatine kinase level is a poor predictor of muscle function after injury. *Scand J Med Sci Sports* 2001;11(2):126-7.
277. MAGAL M. Relationship between serum creatine kinase activity following exercise-induced muscle damage and muscle fibre composition. *Journal of Sports Sciences*, February 1st 2010; 28(3): 257–266 2010.
278. Heled Y, Bloom MS, Wu TJ, Stephens Q, Deuster PA. CK-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise. *J Appl Physiol* 2007;103(2):504-10.
279. Lee J, Clarkson PM. Plasma creatine kinase activity and glutathione after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35(6):930-6.
280. Yamin C, Amir O, Sagiv M, Attias E, Meckel Y, Eynon N, et al. ACE ID genotype affects blood creatine kinase response to eccentric exercise. *J Appl Physiol* 2007;103(6):2057-61.
281. Magal M, Dumke CL, Urbiztondo ZG, Cavill MJ, Triplett NT, Quindry JC, et al. Relationship between serum creatine kinase activity following exercise-induced muscle damage and muscle fibre composition. *J Sports Sci* 2010;28(3):257-66.
282. Brown S, Day S, Donnelly A. Indirect evidence of human skeletal muscle damage and collagen breakdown after eccentric muscle actions. *J Sports Sci* 1999;17(5):397-402.
283. Deschenes MR, Brewer RE, Bush JA, McCoy RW, Volek JS, Kraemer WJ. Neuromuscular disturbance outlasts other symptoms of exercise-induced muscle damage. *J Neurol Sci* 2000;174(2):92-9.
284. Eston RG, Finney S, Baker S, Baltzopoulos V. Muscle tenderness and peak torque changes after downhill running following a prior bout of isokinetic eccentric exercise. *J Sports Sci* 1996;14(4):291-9.
285. Serrao FV, Foerster B, Spada S, Morales MM, Monteiro-Pedro V, Tannus A, et al. Functional changes of human quadriceps muscle injured by eccentric exercise. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(6):781-6.
286. Hutchins MO, Skjonsby HS, Brazeau GA, Parikh UK, Jenkins RM. Weakness in mouse masticatory muscles by repetitive contractions with forced lengthening. *J Dent Res* 1995;74(2):642-8.
287. Seifert ACMaR. Activity of Creatine Kinase in Mice Under Various "Stress" Conditions. *AfICRISSIVF. BEHAVIOR* 1978;4:19-29.
288. Berman S, O'Neill J, Fears S, Bartzokis G, London ED. Abuse of amphetamines and structural abnormalities in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1141:195-220.
289. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:639-77.
290. Grilly DM, Loveland A. What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology* 2001;153(2):155-69.
291. Connell PH. Clinical Manifestations and Treatment of Amphetamine Type of Dependence. *Proc R Soc Med* 1968;61(2):178-81.
292. Crime UNOoDa. Vienna: UNODC; 2009.
293. UNODC, editor. Crime UNOoDa. Vienna; 2009.
294. Steinkellner T, Freissmuth M, Sitte HH, Montgomery T. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and D-amphetamine. *Biological chemistry* 2011;392(1-2):103-15.
295. Schifano F, Corkery JM, Cuffolo G. Smokable ("ice", "crystal meth") and non smokable amphetamine-type stimulants: clinical pharmacological and epidemiological issues, with special reference to the UK. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(1):110-5.

296. Crime UNOoDa. Vienna: UNODC; 2009.
297. Chen H, Wu J, Zhang J, Hashimoto K. Recent topics on pharmacotherapy for amphetamine-type stimulants abuse and dependence. *Current drug abuse reviews* 2010;3(4):222-38.
298. Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Mol Psychiatry* 2009;14(2):123-42.
299. Fan X, Hess EJ. D2-like dopamine receptors mediate the response to amphetamine in a mouse model of ADHD. *Neurobiol Dis* 2007;26(1):201-11.
300. Yamamoto BK, Moszczynska A, Gudelsky GA. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1187:101-21.
301. Jones JR, Caul WF, Hill JO. The effects of amphetamine on body weight and energy expenditure. *Physiology & behavior* 1992;51(3):607-11.
302. Noiman M, Garty A, Maimon Y, Miller U, Lev-Ari S. Acupuncture for treating temporomandibular disorder: retrospective study on safety and efficacy. *J Acupunct Meridian Stud* 2010;3(4):260-6.
303. RMDT V, CM G, MLR S, F B. ELECTROMYOGRAPHY STUDY OF MASTICATORY MUSCLES IN PATIENTS WITH BRUXIS BEFORE AND AFTER ACUPUNCTURE TREATMENT. PILOT STUDY. *Braz J Oral Sci.* 2010;9(2):142-332.
304. White A. Western medical acupuncture: a definition. *Acupunct Med* 2009;27(1):33-5.
305. Ernst E, White AR. Acupuncture as a treatment for temporomandibular joint dysfunction: a systematic review of randomized trials. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125(3):269-72.
306. Rosted P. Introduction to acupuncture in dentistry. *Br Dent J* 2000;189(3):136-40.
307. List T, Helkimo M. Tenderness and acupuncture points in the masseter muscle: a correlation study. *J Craniomandib Disord* 1988;2(3):133-6.
308. Yang CH, Lee BB, Jung HS, Shim I, Roh PU, Golden GT. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72(4):847-55.
309. Simma I, Gleditsch JM, Simma L, Piehslinger E. Immediate effects of microsystem acupuncture in patients with orofacial pain and craniomandibular disorders (CMD): a double-blind, placebo-controlled trial. *Br Dent J* 2009;207(12):E26.
310. Eshkevari L, Egan R, Phillips D, Tilan J, Carney E, Azzam N, et al. Acupuncture at ST36 prevents chronic stress-induced increases in neuropeptide Y in rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012;237(1):18-23.
311. Magro KO, Hirschfeld GCR, Campolongo GD, Barros TEPd. Acupuntura: Tratamento Alternativo nas Dores Orofaciais
312. Shen YF, Younger J, Goddard G, Mackey S. Randomized clinical trial of acupuncture for myofascial pain of the jaw muscles. *J Orofac Pain* 2009;23(4):353-9.
313. Benoliel R, Zaidan S, Eliav E. Acupuncture modulates facial warm sensory thresholds. *J Orofac Pain* 2011;25(1):32-8.
314. Han J TL. Neurochemical basis of acupuncture analgesia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1982;22:193-220.
315. Goddard G, Karibe H, McNeill C, Villafuerte E. Acupuncture and sham acupuncture reduce muscle pain in myofascial pain patients. *J Orofac Pain* 2002;16(1):71-6.
316. Lao L, Bergman S, Hamilton GR, Langenberg P, Berman B. Evaluation of acupuncture for pain control after oral surgery: a placebo-controlled trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125(5):567-72.
317. Yoshida T, Tanaka C, Umeda M, Higuchi T, Fukunaga M, Naruse S. Non-invasive measurement of brain activity using functional MRI: toward the study of brain response to acupuncture stimulation. *Am J Chin Med* 1995;23(3-4):319-25.
318. Johansson A, Wagersten C, Wenneberg B, Haraldson T, Carlsson GE. [Acupuncture treatment for chronic pain in the face and head]. *Tandlakartidningen* 1987;79(4):140-4.
319. Johansson A, Wenneberg B, Wagersten C, Haraldson T. Acupuncture in treatment of facial muscular pain. *Acta Odontol Scand* 1991;49(3):153-8.
320. Sandberg M, Lundeberg T, Lindberg LG, Gerdle B. Effects of acupuncture on skin and muscle blood flow in healthy subjects. *Eur J Appl Physiol* 2003;90(1-2):114-9.
321. Birch S, Hesselink JK, Jonkman FA, Hekker TA, Bos A. Clinical research on acupuncture. Part 1. What have reviews of the efficacy and safety of acupuncture told us so far? *J Altern Complement Med* 2004;10(3):468-80.

322. Ernst E. Homeopathic prophylaxis of headaches and migraine? A systematic review. *J Pain Symptom Manage* 1999;18(5):353-7.
323. Cho SH, Whang WW. Acupuncture for temporomandibular disorders: a systematic review. *J Orofac Pain* 2010;24(2):152-62.
324. La Touche R, Angulo-Diaz-Parreno S, de-la-Hoz JL, Fernandez-Carnero J, Ge HY, Linares MT, et al. Effectiveness of acupuncture in the treatment of temporomandibular disorders of muscular origin: a systematic review of the last decade. *J Altern Complement Med* 2010;16(1):107-12.
325. La Touche R, Goddard G, De-la-Hoz JL, Wang K, Paris-Aleman A, Angulo-Diaz-Parreno S, et al. Acupuncture in the treatment of pain in temporomandibular disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin J Pain* 2010;26(6):541-50.
326. Huguenin L. Myofascial trigger points: the current evidence. 2004.
327. Fernandez-Carnero J, La Touche R, Ortega-Santiago R, Galan-del-Rio F, Pesquera J, Ge HY, et al. Short-term effects of dry needling of active myofascial trigger points in the masseter muscle in patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain* 2010;24(1):106-12.
328. Baldry P. Superficial versus deep dry needling. *Acupunct Med* 2002;20(2-3):78-81.
329. Cotchett MP, Landorf KB, Munteanu SE, Rasovic A. Effectiveness of trigger point dry needling for plantar heel pain: study protocol for a randomised controlled trial. *J Foot Ankle Res* 2011;4:5.
330. Dommerholt J. Trigger Point Dry Needling. *The Journal of manual and manipulative therapy* 2006;14 no 4.
331. Hong CZ. Lidocaine injection versus dry needling to myofascial trigger point. The importance of the local twitch response. *Am J Phys Med Rehabil* 1994;73(4):256-63.
332. Hsieh YL, Kao MJ, Kuan TS, Chen SM, Chen JT, Hong CZ. Dry needling to a key myofascial trigger point may reduce the irritability of satellite MTrPs. *Am J Phys Med Rehabil* 2007;86(5):397-403.
333. Tough EA, White AR, Cummings TM, Richards SH, Campbell JL. Acupuncture and dry needling in the management of myofascial trigger point pain: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Pain* 2009;13(1):3-10.
334. Errington-Evans N. Acupuncture for anxiety. *CNS Neurosci Ther* 2012;18(4):277-84.
335. Huang W, Howie J, Taylor A, Robinson N. An investigation into the effectiveness of traditional Chinese acupuncture (TCA) for chronic stress in adults: a randomised controlled pilot study. *Complement Ther Clin Pract* 2011;17(1):16-21.
336. Middlekauff HR, Yu JL, Hui K. Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280(5):R1462-8.
337. Ogata A, Sugeno Y, Nishimura N, Matsumoto T. Low and high frequency acupuncture stimulation inhibits mental stress-induced sweating in humans via different mechanisms. *Auton Neurosci* 2005;118(1-2):93-101.
338. Pavao TS, Vianna P, Pillat MM, Machado AB, Bauer ME. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. *Neurosci Lett* 2010;484(1):47-50.
339. Guimaraes CM, Pinge MC, Yamamura Y, Mello LE. Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 1997;30(12):1445-50.
340. Kim H, Park HJ, Han SM, Hahm DH, Lee HJ, Kim KS, et al. The effects of acupuncture stimulation at PC6 (Neiguan) on chronic mild stress-induced biochemical and behavioral responses. *Neurosci Lett* 2009;460(1):56-60.
341. Kant GJ, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav* 1985;22(4):631-4.
342. Kato H, Saito M, Suda M. Effect of starvation on the circadian adrenocortical rhythm in rats. *Endocrinology* 1980;106(3):918-21.
343. Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci* 1990;104(1):28-36.
344. Tache Y, Du Ruisseau P, Ducharme JR, Collu R. Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* 1978;26(4):208-19.
345. Murua VS, Molina VA. Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. *Behav Neural Biol* 1992;57(1):87-9.

346. Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, et al. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci* 1986;6(10):2908-14.
347. Marsh JT, Rasmussen AF, Jr. Response of adrenals, thymus, spleen and leucocytes to shuttle box and confinement stress. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;104:180-3.
348. Tejani-Butt SM, Pare WP, Yang J. Effect of repeated novel stressors on depressive behavior and brain norepinephrine receptor system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Brain Res* 1994;649(1-2):27-35.
349. Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Scatton B. Differential effects of forced locomotion, tail-pinch, immobilization, and methyl-beta-carboline carboxylate on extracellular 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels in the rat striatum, nucleus accumbens, and prefrontal cortex: an in vivo voltammetric study. *J Neurochem* 1990;55(4):1208-15.
350. Hughes RN, Desmond CS, Fisher LC. Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light-dark preferences in rats. *Behav Processes* 2004;67(2):173-81.
351. Vansickel AR, Stoops WW, Rush CR. Human sex differences in d-amphetamine self-administration. *Addiction* 2010;105(4):727-31.
352. Thomas DJ, Fisher HL, Hall LL, Mushak P. Effects of age and sex on retention of mercury by methyl mercury-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;62(3):445-54.
353. Areso MP, Frazer A. Effect of repeated administration of novel stressors on central beta adrenoceptors. *J Neural Transm Gen Sect* 1991;86(3):229-35.
354. Gomez FM, Ortega JE, Horrillo I, Meana JJ. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. *J Oral Rehabil* 2010.
355. Waddington JL. Spontaneous orofacial movements induced in rodents by very long-term neuroleptic drug administration: phenomenology, pathophysiology and putative relationship to tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;101(4):431-47.
356. Jones JR, Caul WF. Effects of amphetamine on food intake and weight: timing of injections and food access. *Physiology & behavior* 1992;52(3):515-20.
357. Ioannides-Demos LL, Proietto J, McNeil JJ. Pharmacotherapy for obesity. *Drugs* 2005;65(10):1391-418.
358. Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Molecular psychiatry* 2009;14(2):123-42.
359. Connell. Clinical Manifestations and Treatment of Amphetamine Type of Dependence. *J American Medical Association* 1966;196(8):718-23.
360. Kalant H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ* 2001;165(7):917-28.
361. Duarte JA, Carvalho F, Natsis K, Remiao F, Bastos ML, Soares JCM, et al. Structural Alterations of Skeletal Muscle Induced by Chronic Administrations of D-Amphetamine and Food Restriction. *Basic Appl. Myol.* 1999;9(2):65-69.
362. Sund AM, Zeiner P. Does extended medication with amphetamine or methylphenidate reduce growth in hyperactive children? *Nordic journal of psychiatry* 2002;56(1):53-7.
363. Landgren S, Olsson KA. The effect of electrical stimulation in the hypothalamus on the monosynaptic jaw closing and the disynaptic jaw opening reflexes in the cat. *Exp Brain Res* 1980;39(4):389-400.
364. Weiner S, Shaikh MB, Siegel A. Electromyographic activity in the masseter muscle resulting from stimulation of hypothalamic behavioral sites in the cat. *J Orofac Pain* 1993;7(4):370-7.
365. Sitthisomwong P, Weiner S, Levin L, Reisman S, Siegel A. The effect of a cholecystokinin agonist on masseter muscle activity in the cat. *J Dent Res* 2000;79(10):1823-8.
366. Shin R, Cao J, Webb SM, Ikemoto S. Amphetamine Administration into the Ventral Striatum Facilitates Behavioral Interaction with Unconditioned Visual Signals in Rats. *PLoS ONE* 2010;5(1).
367. Chan P, Chen JH, Lee MH, Deng JF. Fatal and nonfatal methamphetamine intoxication in the intensive care unit. *J Toxicol Clin Toxicol* 1994;32(2):147-55.
368. Richards JR, Johnson EB, Stark RW, Derlet RW. Methamphetamine abuse and rhabdomyolysis in the ED: a 5-year study. *Am J Emerg Med* 1999;17(7):681-5.
369. Hutchins MO, Skjonsby HS. Microtrauma to rat superficial masseter muscles following lengthening contractions. *J Dent Res* 1990;69(9):1580-5.

370. Lin JG, Yang SH. Effects of acupuncture on exercise-induced muscle soreness and serum creatine kinase activity. *Am J Chin Med* 1999;27(3-4):299-305.
371. de Wit H, Enggasser JL, Richards JB. Acute administration of d-amphetamine decreases impulsivity in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2002;27(5):813-25.
372. Hamidovic A, Childs E, Conrad M, King A, de Wit H. Stress-induced changes in mood and cortisol release predict mood effects of amphetamine. *Drug and alcohol dependence* 2010;109(1-3):175-80.
373. Hamidovic A, Childs E, Conrad M, King A, de Wit H. Stress-induced changes in mood and cortisol release predict mood effects of amphetamine. *Drug Alcohol Depend* 2010;109(1-3):175-80.
374. Huang W, Taylor A, Howie J, Robinson N. Is the diurnal profile of salivary cortisol concentration a useful marker for measuring reported stress in acupuncture research? A randomized controlled pilot study. *J Altern Complement Med* 2012;18(3):242-50.
375. Lee SC, Yin SJ, Lee ML, Tsai WJ, Sim CB. Effects of acupuncture on serum cortisol level and dopamine beta-hydroxylase activity in normal Chinese. *Am J Chin Med* 1982;10(1-4):62-9.

Parte E

Anexos

Anexo 1

Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas

DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal

Ex^{mo} Senhor
Dr. Júlio André Ramalho da Fonseca
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Instituto de Patologia Experimental
Rua Larga
3004 – 504 COIMBRA

2011-01-06 000229

Sua referência

Sua comunicação de

Nossa referência
0420/000/000
/2011

Assunto: **PROTECÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS - PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efectuado por V. Ex^a, no sentido de poder ser autorizada a realização do projecto experimental designado “**Avaliação Morfofuncional num Modelo Experimental de Movimentos Mastigatórios Parafuncionais**” e dos esclarecimentos que nos foram prestados relativamente às dúvidas que a sua análise inicial nos suscitou - quer a esta Direcção Geral, quer a alguns membros da Comissão Consultiva prevista na alínea b) do n.º 49, da Portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro -, cabe-me informar que o projecto em apreço poderá ser levado a efeito.

Com os melhores cumprimentos,

O Director de Serviços

As) António Pina Fonseca

APM/

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE DEUS APTES, 2 - 1240-105 LISBOA TLF 21 373 95 00 FAX 21 373 95 65

Índice de Figuras

<i>Figura 1-</i> Esquema elucidativo dos mecanismos de regulação da secreção do cortisol.....	49
<i>Figura 2-</i> Fórmula química do cortisol	51
<i>Figura 3-</i> Reacção química catalisada pela CK.....	63
<i>Figura 4-</i> Imagem de uma gaiola de alojamento	82
<i>Figura 5-</i> Esquema do desenho experimental.....	83
<i>Figura 6-</i> Administração de solução anestésica por via intra-peritoneal.....	84
<i>Figura 7-</i> Esquema da medição da atrição incisal.....	86
<i>Figura 8-</i> Realização das marcas dentárias com um disco montado em peça de mão	86
<i>Figura 9-</i> Observação das marcas dentárias.....	87
<i>Figura 10-</i> Medição da distância das marcas ao bordo incisal, com craveira digital	87
<i>Figura 11-</i> Protocolo de doses crescentes de anfetamina utilizado	89
<i>Figura 12-</i> Animais durante o protocolo de aglomeração	90
<i>Figura 13 -</i> Pontos de acupunctura utilizados	91
<i>Figura 14-</i> Amostras sanguíneas em tubos tipo <i>Eppendorf</i>	92
<i>Figura 15:</i> Blocos de madeira mole visivelmente desgastados	93
<i>Figura 16 –</i> Valores de classificação dos MMNF observados	94
<i>Figura 17 –</i> Gráfico representativo da Variação do Peso dos Animais em função dos dias de experiência.....	99
<i>Figura 18 –</i> Gráfico representativo da variação dos valores da Razão peso do timo/ peso total e do baço/ peso total em função dos grupos.....	101
<i>Figura 19–</i> Gráfico representativo da variação dos valores da Razão (peso das supra-renais/ peso total)x1000 em função dos grupos	101
<i>Figura 20 –</i> Gráfico representativo da variação da concentração média do Cortisol, em função da Análise 1 (dia 1), Análise 2 (dia 7) e Análise 3 (dia 14).....	103
<i>Figura 21 –</i> Gráfico representativo da variação da concentração sérica dos valores da CK em função da Análise 1 (dia 1), Análise 2 (dia 7) e Análise 3 (dia 14).....	105

<i>Figura 22</i> – Gráfico representativo dos valores de atricção em função dos grupos.....	106
<i>Figura 23</i> – Gráfico representativo da variação dos valores de MMNF segundo a escala utilizada em função dos grupos	109

Índice de Abreviaturas

AASD- American Academy of Sleep Disorders

AASM– American Academy of Sleep Medicine

ADP – Adenosina difosfacto

AAOP – American Academy of Orofacial Pain

ACTH – Hormona Corticodenotrópica

AMMR - Atividades Mastigatórias Musculares Rítmicas

ANOVA – Teste estatístico de Análise de Variâncias

ATM – Articulação Temporo-Mandibular

ATP – Adenosina Trifosfacto

ATS – Anfetaminas

BS – Bruxismo do Sono

Cortisol_A1 – Valor do Cortisol na Análise 1

Cortisol_A2- Valor do Cortisol na Análise 2

Cortisol_A3- Valor do Cortisol na Análise 3

Cortisol_GI_0 - Valores médios do Cortisol do Grupo I no dia 0 de Experiência

Cortisol_GI_14 - Valores médios do Cortisol do Grupo I no dia 14 de Experiência

Cortisol_GII_0 - Valores médios do Cortisol do Grupo II no dia 0 de Experiência

Cortisol_GII_14 - Valores médios do Cortisol do Grupo II no dia 14 de Experiência

Cortisol_GIII_0 - Valores médios do Cortisol do Grupo III no dia 0 de Experiência

Cortisol_GIII_14 - Valores médios do Cortisol do Grupo III no dia 14 de Experiência

Cortisol_GIV_0 - Valores médios do Cortisol do Grupo IV no dia 0 de Experiência

Cortisol_GIV_14 - Valores médios do Cortisol do Grupo IV no dia 14 de Experiência

CRH – Hormona Libertadora de Corticotropina

CK/CPK – Creatina-cinase/Creatina-Fosfoquinase

CK-MM – Isoforma MM da Creatina-cinase

CK-MB – Isoforma MB da Creatina-cinase

CK-BB – Isoforma BB da Creatina-cinase

CK_A1 – Valor da Creatina-cinase na Análise 1

CK_A2- Valor da Creatina-cinase na Análise 2

CK_A3- Valor da Creatina-cinase na Análise 3

CK_GI_0 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo I no dia 0 de Experiência

CK_GI_14 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo I no dia 14 de Experiência

CK_GII_0 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo II no dia 0 de Experiência

CK_GII_14 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo II no dia 14 de Experiência

CK_GIII_0 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo III no dia 0 de Experiência

CK_GIII_14 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo III no dia 14 de Experiência

CK_GIV_0 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo IV no dia 0 de Experiência

CK_GIV_14 - Valores Médios da Creatina-cinase do Grupo IV no dia 14 de Experiência

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTM – Disfunções Temporo-Mandibulares

EMG – Electromiografia

E.P.M- Erro padrão na média

g – Grama

GI – Grupo Experimental I (grupo de controlo)

GII – Grupo Experimental II (grupo de manipulação experimental)

GIII – Grupo Experimental III (grupo de injeção de anfetaminas)

G IV - Grupo Experimental IV (grupo de injeção de anfetaminas e acupunctura)

i.p. – intra-peritoneal

Km – Constante de Michaelis

K-S – Teste Estatístico de Kolmogorov-Smirnov

M – Valor Médio

mm – Milímetros

mg/ml – Miligramas por mililitro

mm/dia – Milímetros por dia

MMNF – Movimentos Mastigatórios não Funcionais

MNF – Mastigatórios Não Funcionais

N – Número total de Animais

ng/ml – Nanogramas por Mililitro

p – Valor de Significância Estatística

Peso_GI_0 – Peso do Grupo I no dia Experimental 0

Peso_GI_14 - Peso do Grupo I no dia Experimental 14

Peso_GII_0 - Peso do Grupo II no dia Experimental 0

Peso_GII_14 - Peso do Grupo II no dia Experimental 14

Peso_GIII_0 – Peso do Grupo III no dia Experimental 0

Peso_GIII_14 - Peso do Grupo III no dia Experimental 14

Peso_GIV_0 – Peso do Grupo IV no dia Experimental 0

Peso_GIV_14 - Peso do Grupo IV no dia Experimental 14

RMMA – Actividade Muscular Mastigatória Rítmica

SDC – Sistema Dopaminérgico Central

SEM/ Std. Error mean – Erro Padrão

S.N.C. – Sistema Nervoso Central

S. N. P. – Sistema Nervoso Periférico

Sig. – Significância Estatística

Std. Deviation – Desvio Padrão

U/l– Unidades de Enzima por Litro

Vs- versus

X1 – Primeira Marca Incisal Efectuada

X2- Marca Incisal (posição intermédia)

X3 – Nova Marca Incisal Efectuada (medição 3)

X4– Marca Incisal (última posição)

µg/l– Microgramas por Litro

°C – Graus Centígrados

ÍNDICE GERAL

<u>Agradecimentos</u>	7
<u>Sumário</u>	11
<u>Parte A – Introdução</u>	12
1 – As Disfunções Temporo-Mandibulares	13
2 – Bruxismo	15
2.1 – Definição do Bruxismo	15
2.2 – Prevalência do Bruxismo	17
2.3 – Classificação do Bruxismo	18
2.4 – Etiologia do Bruxismo.....	20
2.5 – Factores de risco para o Bruxismo.....	26
2.6 – Sinais e sintomas do Bruxismo	27
2.7 – Diagnóstico do Bruxismo	29
2.8 – Consequências do Bruxismo.....	31
2.9 – Tratamento do Bruxismo.....	34
3 – Influência do Stresse nos Movimentos Mastigatórios Não Funcionais	37
4 – Modelos Experimentais	40
4.1 – A Escolha de um Modelo Experimental.....	41
4.2 – Modelos animais em Disfunções Temporo-Mandibulares	42
4.3 – Modelos Experimentais de Indução de Stresse	43
4.4 – Métodos de Avaliação do Stresse Induzido Experimentalmente	46
4.4.1 – O desgaste dentário em modelos animais	47
5 – A Hormona Cortisol	48
5.1 – Mecanismo de Regulação da Secreção do Cortisol	48
5.2 – Ritmo Circadiano do Cortisol.....	49
5.3 – Síntese, Degradação e Mecanismo da Actuação do Cortisol	50
5.4 – Funções do Cortisol no Organismo.....	51
5.5 – Medição dos Valores do Cortisol.....	53
5.6 – Influência do Stresse nos Valores do Cortisol.....	54
5.7 – Disfunções Temporo-Mandibulares e Cortisol	55
5.8 – Modelos Experimentais do Cortisol.....	57
5.8.1 – Estudos Experimentais em Humanos	57

5.8.2 – Estudos Experimentais em Animais.....	59
6 – A Enzima Creatina-cinase	63
6.1 – Funções	63
6.2 – Isoformas da creatina-cinase e suas propriedades.....	63
6.3 – Distribuição da creatina-cinase nas células e nos tecidos	64
6.4 – O uso da creatina-cinase como marcador de patologia muscular	65
6.5 – Modelos Experimentais da Creatina-cinase	66
6.5.1 – Estudos Experimentais em Humanos	66
6.5.2 – Estudos Experimentais em Animais.....	67
7 – Anfetaminas.....	70
7.1 – Introdução.....	70
7.2– Características farmacodinâmicas e farmacocinéticas da anfetamina e seus análogos.....	70
7.3 – Efeitos Clínicos	71
7.4 – ATS, Modelos animais e bruxismo.....	72
8 – Acupunctura.....	74
8.1 – Mecanismos de acção da acupunctura	75
8.2– Efeitos secundários	76
8.3 – Acupunctura no tratamento das Disfunções Temporomandibulares	76
8.4 – Acupunctura e Pontos de Gatilho Miofasciais.....	77
8.5 – Acupunctura e Stresse.....	78
<u>Parte B – Estudo Experimental em Modelo com Animais</u>.....	79
1 – Objectivos	80
2 – Estudo <i>in vivo</i>.....	80
2.1 – Amostra	80
2.2 – Manutenção, Manipulação e Bem-Estar Animal	81
2.3 – Protocolo Experimental.....	82

2.3.1 – Grupos Experimentais	82
2.3.2 – Pesagem dos Animais.....	83
2.3.3 – Medidas Pré-Anestésicas	84
2.3.4 – Anestesia.....	84
2.3.5 – Marcas Dentárias/Atrição Incisal.....	85
2.3.6 – Recuperação da Anestesia	88
2.3.7 – Injecção de Solução salina e de anfetaminas	88
2.3.8 – Agentes Stressantes	89
2.3.9 – Tratamento com Acupunctura	91
2.3.10 – Colheitas Sanguíneas.....	91
2.3.11 – Determinação da actividade mastigatória não funcional	92
2.4 – Eutanásia, Necrópsia dos Animais e Colheita do Material.....	95
2.4.1 – Eutanásia	95
2.4.2 – Necrópsia dos Animais e Colheita do Material.....	95
3 – Resultados.....	97
3.1 – Tratamento Estatístico	97
3.2 – Análise de Resultados.....	98
3.2.1 – Observação Geral dos Animais.....	98
3.2.2 – Variação do Peso Corporal	98
3.2.3 – Variação do Peso Timo, Baço e Supra-Renais.....	101
3.2.4 – Variação da Concentração Sérica do Cortisol	103
3.2.5 – Variação da Concentração Sérica da creatina-cinase	104
3.2.6 – Avaliação da Atrição Dentária	106
3.2.7 – Avaliação dos MMNF.....	107
4– Discussão	110
4.1 – Amostra	111
4.2 – Agentes stressantes	111
4.3 – Métodos observacionais e MMNF	113
4.4 – Atrição	115
4.5 –Peso Corporal	117

4.6 – Peso do Timo, Baço e Supra-renais.....	119
4.7 – A creatina-cinase e o Cortisol	120
4.7.1 – Creatina-cinase.....	121
4.7.2 – Cortisol	123
5 – Conclusões	128
6 – Perspectivas Futuras	129
7 – Nota de Esclarecimento.....	130
<u>Parte C - Resumo</u>.....	131
1 – Resumo	132
2 – Abstract.....	134
<u>Parte D - Bibliografia</u>	136
<u>Parte E - Anexos</u>	153
<u>Índice de Figuras</u>	155
<u>Índice de Abreviaturas</u>	157
<u>Índice Geral</u>.....	161

