

FMUC **FACULDADE DE MEDICINA**
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Área de Medicina Dentária

**Avaliação do Efeito da Acupuntura num Modelo Experimental de
Movimentos Mastigatórios Não Funcionais**

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Bruna Sofia dos Santos Rebelo Gomes

Co-orientador: Dr. Júlio André Ramalho da Fonseca

Orientador: Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Junho, 2012

Dissertação de Mestrado Integrado 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).

Avaliação do Efeito da Acupuntura num Modelo Experimental de Movimentos Mastigatórios Não Funcionais

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Bruna Sofia dos Santos Rebelo Gomes¹

Co-orientador:

Dr. Júlio André Ramalho da Fonseca²

Orientador:

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita³

1 - Aluna de Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC.

2 - Licenciado em Medicina Dentária e Pós-graduado em Reabilitação Oral Protética pela FMUC. Assistente Convidado das Disciplinas de Anatomia Dentária, Fisiologia do Aparelho Estomatognático e Reabilitação Oclusal do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC.

3 - Licenciado em Medicina e Doutorado em Patologia/ Anatomia Patológica pela FMUC. Diretor do serviço de Patologia Experimental da FMUC. Coordenador da Pós-graduação em Acupuntura para Médicos e para Médicos Dentistas. Regente da disciplina de Projeto de Investigação do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC.

Endereço - Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas 3000-075 Coimbra

RESUMO

Introdução: A acupuntura é uma prática terapêutica milenar que previne e trata inúmeras doenças, baseando-se na teoria da existência de padrões de energia que fluem através do corpo, repondo o equilíbrio deste.⁽¹⁻⁴⁾ Tem sido sugerida uma etiologia central para o bruxismo, levando a uma mudança conceitual de etiologia periférica para regulação central.⁽⁵⁻¹⁰⁾ Acredita-se que o consumo crónico de anfetaminas produz bruxismo reforçando assim a hipótese da etiologia central.⁽¹¹⁾

Materiais e métodos: Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos com 9 semanas de idade, divididos em 2 grupos. O grupo I foi submetido a um protocolo de indução de stresse e injeção de anfetamina e o grupo II foi submetido a um protocolo de indução de stress, injeção de anfetamina e tratamento com acupuntura. Foi avaliada a taxa de atrição incisal, as variações das concentrações séricas da creatina-quinase e do cortisol em 3 fases do estudo (dia 1, 7 e 14) e o comportamento mastigatório não funcional.

Resultados: A acupuntura potenciou um aumento significativo da atrição (grupo I 7.24 ± 0.41 mm e grupo II 7.84 ± 0.62 mm). Em ambos os grupos houve uma diminuição do peso entre o dia 0 e o dia 14, sendo esta significativa para o grupo I ($p=0,03$; teste de Kruskal Wallis) e ainda mais significativa para o grupo II ($p=0,001$; teste de Kruskal Wallis). Em relação ao peso dos órgãos não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Em relação ao comportamento, verificaram-se picos esporádicos, principalmente no grupo II, nos dias 6, 9 e 11. Relativamente à concentração sérica da creatina-quinase não houve diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos. Os valores do cortisol aumentaram de forma não significativa no grupo I ($p=0,078$; teste Anova de Friedman) e no grupo II um pico inesperado e estatisticamente significativo na G4_Análise 2 ($p=0.000$; Anova de Friedman), para diminuir depois para um valor muito semelhante ao inicial na terceira análise ($1.132 \mu\text{g/dL}$).

Conclusões: Ao contrário do que se esperava neste estudo, a acupuntura não diminuiu a atrição incisal, levou a uma perda de peso significativa, aumentou o nível de cortisol na análise intermédia para o diminuir na terceira análise (assim como os MMNF) e não trouxe alterações significativas relativamente à CK. Sugere-se que a manipulação por tratamento de acupuntura poderá, por si só, ser um agente stressante, poderá necessitar de tempo para atuar ou ainda que os animais, em função do tempo, se habituam a este fator, diminuindo a intensidade de resposta.

Palavras-chave: Acupuntura, anfetaminas, bruxismo, stresse, atrição, cortisol, creatina-quinase

INTRODUÇÃO

A acupuntura é uma prática terapêutica da Medicina Tradicional Chinesa com mais de 2500 anos que visa a prevenção ou o tratamento de inúmeras doenças.^(1, 2) Esta prática envolve a inserção de finas agulhas em várias partes do corpo com intenção curativa⁽¹²⁾, baseando-se na premissa de que existem padrões de energia ("Qi") que fluem através deste. As interrupções destes fluxos de energia e o conseqüente aparecimento de doenças, pode ser corrigido através da acupuntura.^(3, 4) 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.⁽¹³⁾ Os mecanismos que explicam a ação da acupuntura envolvem o SNC, os músculos e ainda alguns efeitos locais. Os diferentes mecanismos requerem variações nas técnicas de tratamento, sendo direcionadas de acordo com cada indivíduo.⁽¹³⁾ No momento da inserção da agulha, há um aumento no sangue e no cérebro dos níveis de β -endorfina, endomorfina, encefalina, serotonina e dopamina.⁽¹⁾ Para além disso, há também uma libertação de imuno-moduladores que realçam o processo lipolítico e têm um impacto sobre a libertação de adrenalina e de noradrenalina.⁽⁹⁾ Aquando da introdução da agulha, podem ocorrer efeitos locais, analgesia segmentária, analgesia extra-segmentária e efeitos reguladores centrais.⁽¹³⁾

Vários estudos realizados em humanos⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ e roedores^(19, 20) comprovam que a acupuntura tradicional é eficaz no tratamento do stresse, quando esta é realizada nos pontos de acupuntura certos e de forma correta.

O termo bruxismo deriva da palavra grega *Brychein*, que significa pressionamento, fricção ou atrito entre os dentes.⁽²¹⁾ O termo "la bruxomanie" foi introduzido pela primeira vez por Marie Pietkiewicz em 1907.^(22, 23) Este último foi adotado como "bruxismo" para descrever o apertar ou ranger de dentes que ocorre sem um propósito funcional.⁽²³⁾ O bruxismo pode ocorrer durante a vigília ou durante o sono.⁽²³⁾ Tanto o bruxismo diurno, como o noturno, é considerado um hábito parafuncional caracterizado por atividades como *clenching* (pressionamento inter-arcadas), *gnashing* ou *grinding* (raspar e ranger dentário). Pode ser de caráter rítmico ou espasmódico,^(23, 24) exercido de forma involuntária e inconsciente.⁽²³⁻³³⁾ Apesar da fisiopatologia do bruxismo ser uma questão complexa e controversa,^(5, 6) sabe-se que este é considerado como tendo etiologia multifatorial.^(5, 7, 23, 25, 26, 34-40) Têm sido sugeridos fatores etiológicos com origem local, sistémica, psicológica, ocupacional, hereditária, idiopática ou fatores relacionados com distúrbios do sono e parassónias.^(5, 6, 37, 38, 41-51) Contudo, as interferências oclusais e o stresse emocional têm sido classicamente implicados como principais fatores etiológicos.^(33, 46, 52-54) A maioria dos autores têm sugerido uma etiologia central para o bruxismo, sugerindo uma mudança

conceitual de periférica (isto é, oclusal) para regulação central (ou seja, stress, personalidade, emoção).⁽⁵⁻¹⁰⁾ Os estudos realizados durante a última década têm focado a sua investigação na análise de fatores relativos ao sistema nervoso central, demonstrando que os fatores centrais desempenham um importante papel no desenvolvimento do bruxismo.^(5, 24, 25, 34, 36) No entanto, não é de descartar a hipótese que este possa ser influenciado por fatores periféricos.^(34, 36)

O sistema nervoso dopaminérgico tem sido envolvido e proposto para explicar a etiopatogenia do bruxismo.^(46, 55-58) Esta relação foi confirmada por estudos com diversos fármacos (como a L-dopa, bromocriptina e o propanolol).^(24, 37) Foi demonstrado que a administração de apomorfina em ratos, agonista dos recetores dopaminérgicos, provoca uma estimulação repetida do sistema dopaminérgico que por sua vez induz o aumento da atividade 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.^(24, 37)

Em 1965, Aschcroft realçou a importância para os movimentos não funcionais repetidos, derivado da administração de anfetaminas (também designadas ATS).⁽⁵⁹⁻⁶³⁾ Com efeito, o uso destas substâncias aumenta a atividade locomotora, os movimentos estereotipados (incluindo bruxismo), podendo este efeito ser reforçado através da administração repetida desta droga que acontece em cenários de abuso e dependência.⁽⁶¹⁾

O presente estudo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar a gravidade dos movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF), provocados pelo protocolo de indução de stress e anfetaminas, e pelo tratamento com acupuntura, através da avaliação dos seguintes parâmetros: atrição incisal; concentração sérica da creatina-cinase e cortisol; peso corporal, das glândulas supra-renais, do timo e do baço e avaliação do comportamento MMNF.

MATERAIS E MÉTODOS

O presente trabalho experimental foi desenvolvido com base numa amostra constituída por 20 ratos Wistar machos, adultos, com 9 semanas de idade aquando o início do estudo, com pesos compreendidos entre 276g e 330g. A quarentena, seleção, manutenção, garantia de bem-estar e avaliação das condições gerais de saúde dos animais foram efetuadas por técnicos qualificados do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), respeitando o protocolo aprovado na instituição e de acordo com a legislação em vigor nomeadamente a autorização da Comissão Consultiva do Bem Estar Animal e de Proteção dos Animais utilizados para Fins Experimentais e/ou outros Científicos, da Direção Geral de Veterinária. Os animais foram aleatoriamente colocados dois a dois em gaiolas metálicas, adequadas à sua espécie, com espaço suficiente para se movimentarem, com ração seca e água *ad libitum*. 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).

Os 20 ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, cada um dos grupos constituído por 10 ratos:

Grupo I (GI) - Grupo com protocolo de indução de stress e injeção diária de anfetamina. Os animais foram submetidos a uma injeção diária de d-anfetamina durante 14 dias, por via intraperitoneal, segundo um protocolo de habituação com doses crescentes.

Grupo II (GII) – Grupo com indução e tratamento (Injeção de anfetamina + Acupuntura três vezes/ semana)

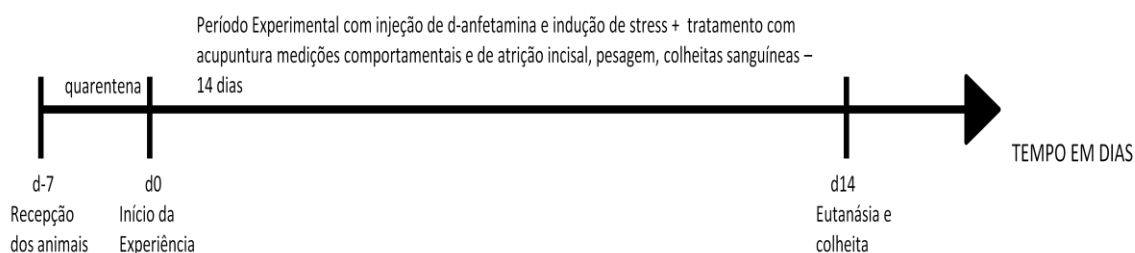


Diagrama 1- Esquema do desenho experimental.

Em ambos os grupos experimentais, a pesagem dos animais foi realizada diariamente com o auxílio de uma balança digital, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

Com o intuito de avaliar a atrição incisal efetuou-se uma marca dentária nos incisivos centrais inferiores de todos os ratos. Os ratos dos dois grupos experimentais foram anestesiados com uma combinação anestésica de cloridrato de cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e clorpromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória) por via intraperitoneal. 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 efetuadas 24 horas antes da exposição aos agentes stressores e/ou início da injeção de anfetaminas.⁽³³⁾

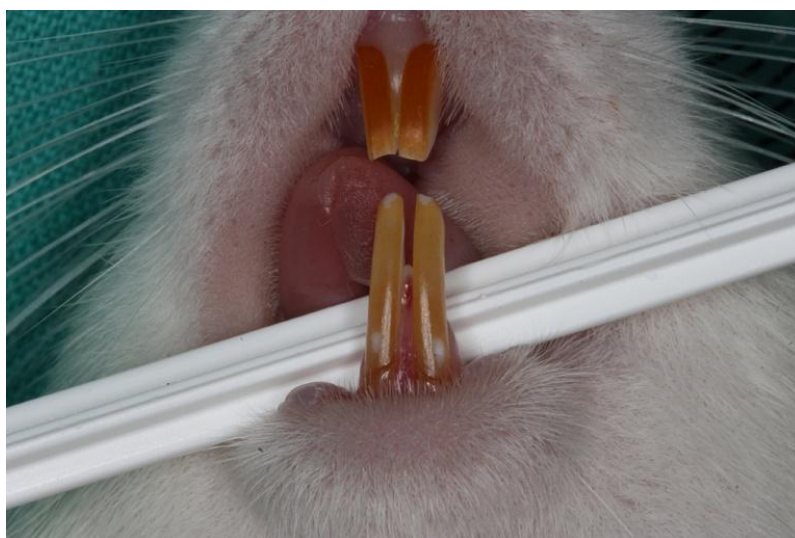


Imagem 1 - Marcas dentárias.

No dia em que as marcas foram efetuadas (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, efetuaram-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 até ao bordo incisal (X3). O grau de atrição incisal foi obtido através da soma das subtrações das medidas iniciais pelas medidas finais.

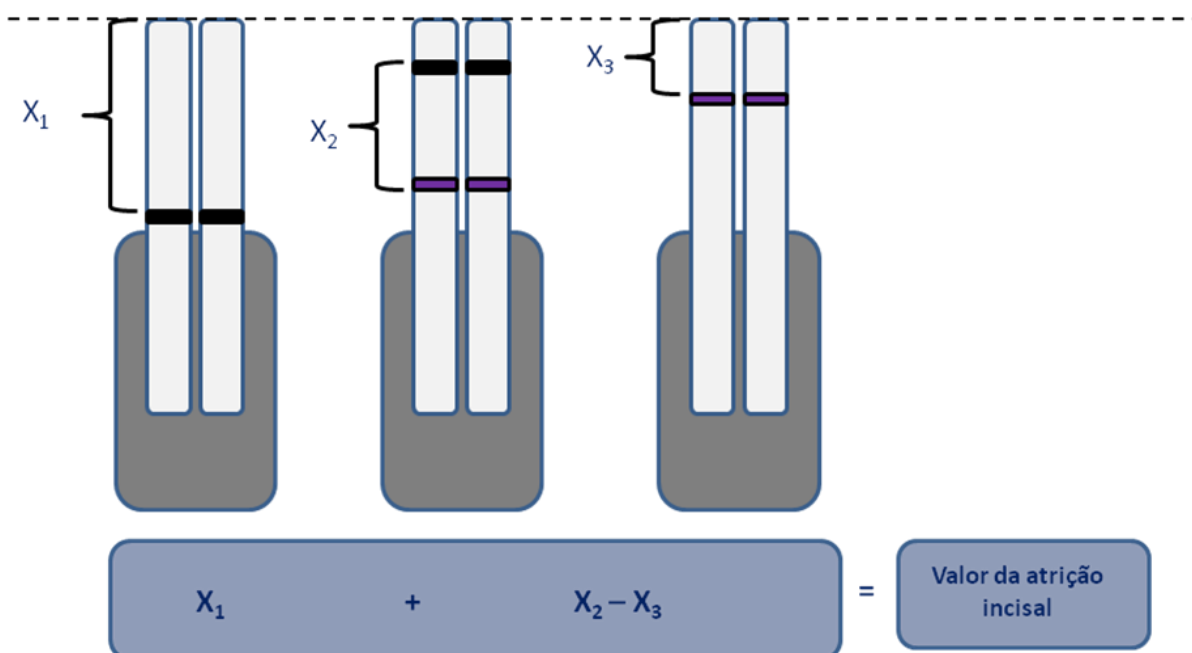


Imagem 2- Esquema da medição da atrição incisal.

As anfetaminas foram administradas por via intraperitoneal, diariamente, entre as 9 e as 11:30 horas.⁽³³⁾ Previamente a cada injeção, os ratos foram ambientados ao local onde a experiência decorreu, durante cerca de 15 minutos.⁽³³⁾ As injeções seguiram um protocolo de habituação com doses sucessivamente crescentes (desde 1,6mg/kg até 12mg/kg) durante 14 dias. A anfetamina foi administrada diariamente de acordo com o peso que foi reavaliado diariamente. Imediatamente após as injeções os ratos foram submetidos ao protocolo de stresse.

Agentes Stressores

Segundo alguns autores, a repetição da exposição dos animais ao mesmo tipo de agente stressante evoca a diminuição da resposta adrenal de sessão para sessão⁽⁶⁴⁻⁶⁹⁾ Assim, tendo em conta que os ratos apresentam uma capacidade de adaptação fisiológica ao stresse induzido repetidamente pelo mesmo agente,⁽⁶⁶⁾ foram expostos a um conjunto variável de agentes stressores.^(33, 64) Selecionaram-se 5 agentes stressores: 3 protocolos de ruídos (ruídos urbanos, ruídos de espécies predadoras e uma mistura de ambos), stresse por aglomeração e stresse por vibração corporal, os quais foram aplicados de forma intercalada, em função dos dias de experimentação (14 dias). Os diversos protocolos de stresse foram executados diariamente entre as 9 e 11:30 horas,^(33, 64) logo após as injeções intraperitoneais, com a duração de 10 minutos, com a exceção da aglomeração, que durou 12 horas.

Tratamento com Acupuntura

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

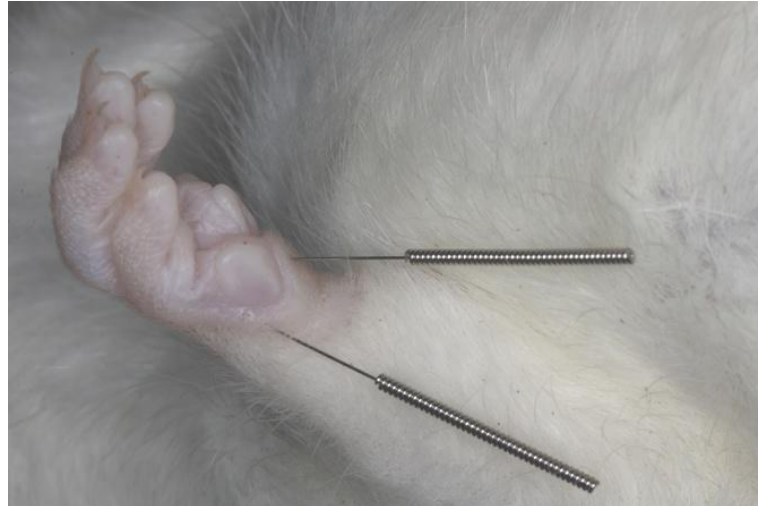


Imagem 3 - Pontos de acupuntura utilizados.

Colheitas Sanguíneas

Foram efetuadas 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 creatina-cinase (CK). As colheitas foram efetuadas por punção da veia da cauda do rato e colhidas, posteriormente, para um tubo tipo “ependorf” 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 procedimento experimental foi realizado por técnicos qualificados do Laboratório de Análises Clínicas AVELAB (Forca, Aveiro), sob a direção técnica do Dr. António Neves.



Imagem 4 - Amostras sanguíneas em tubos tipo "Ependorf".

Determinação da Gravidade da Atividade Mastigatória Não Funcional

Após a indução de stress, os ratos foram filmados de modo a efetuar a observação comportamental, para avaliar a gravidade dos MMNF. As filmagens decorreram dentro das gaiolas de alojamento, 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 anfetaminas e acupuntura. A intensidade dos movimentos mastigatórios não funcionais foi classificada/avaliada segundo uma escala de comportamentos orais adaptada dos estudos de Gomez⁽³³⁾ e Ernst⁽⁵⁶⁾. 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 e/ou também na caixa, foram medidos e classificados numa escala de severidade de cinco pontos (tabela I).^(33, 56, 70) Os registos do comportamento foram sempre efetuados pelo mesmo observador, o qual desconhecia o grupo experimental em causa. Obteve-se um resultado diário para o comportamento de cada animal baseado na soma dos resultados de cada período de observação (10 períodos de observação).^(33, 56)



Imagem 5 -Blocos de mordida de madeira mole.

Tabela 1 - Escala de Classificação dos MMNF

Valor base limiar para ausência de MMNF	Valor de 1
Gnawing/biting	Gnawing/biting 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, lamber, 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 stress 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 estereotipias relacionadas com a anfetamina movimentos moderados de gnawing/biting ou bruxismo experimental (períodos de 11 a 20 segundos)
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 30 segundos)

Eutanásia, Necrópsia dos Animais e Colheita do Material Biológico

Todos os animais, que chegaram ao fim da experiência, foram eutanasiados e necropsiados, segundo as normas em vigor. A eutanásia foi realizada por overdose com associação de cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e clorpromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória) seguida de deslocamento cervical e exsanguinação, por punção intracardíaca. Efetuou-se um registo pormenorizado da informação referente à observação macroscópica do hábito externo e do hábito interno. Foram colhidos, pesados e medidos os principais órgãos. 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 selecionados para congelação rápida em azoto líquido e posterior conservação a -70°C.

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

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).

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 de teste de hipótese de diferenças de médias (ANOVA) sendo este um teste paramétrico. 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 inicial e final 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 3 tempos medidos intra-grupo. Para avaliar amostras emparelhadas com mais do que duas repetições (neste caso 3 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.

O teste de Wilcoxon foi usado para avaliar a variação dos comportamentos MNF 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.

Os dados resultantes foram depois importados para ambiente EXCEL (Microsoft Office 2000®) e efetuados gráficos representativos dos parâmetros avaliados. Os resultados estão apresentados 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, exceto um animal do grupo II que morreu após uma injeção de anfetamina. Presumiu-se que este não sobreviveu por mau procedimento técnico decorrente da injeção de anfetamina. Esta infiltração terá sido realizada mais profundamente do que o devido, lesionando algum órgão interno e provocando a morte do animal.

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

3.2.2 - Variação do Peso Corporal

As variações de peso dos animais durante o período do estudo estão representadas no gráfico 1. Nos dois grupos experimentais, a pesagem dos animais foi realizada diariamente, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

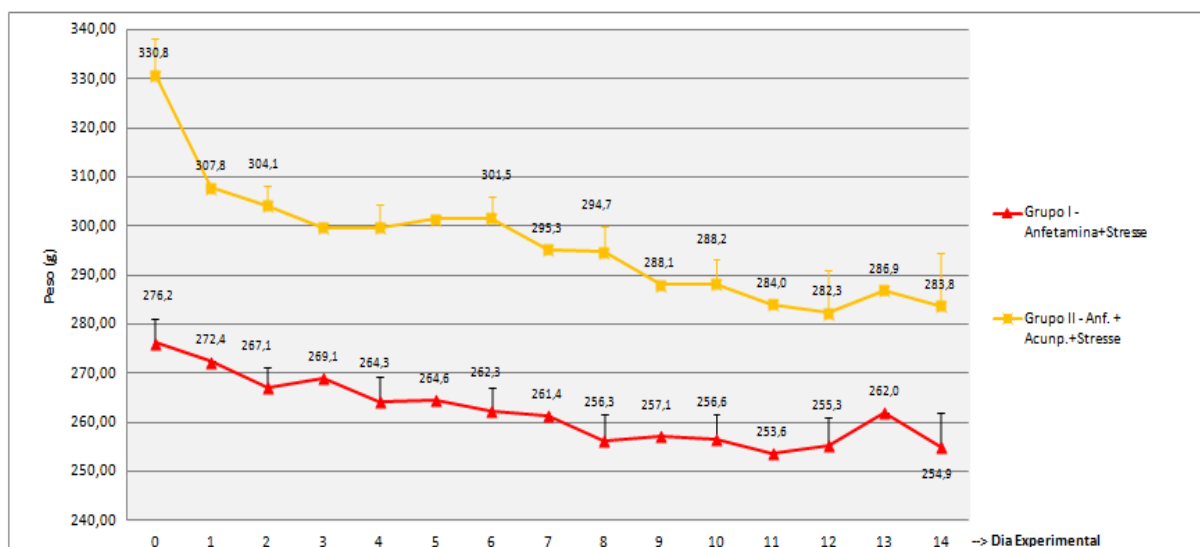


Gráfico 1 - Variação do peso dos animais ao longo do programa experimental.

Em ambos os grupos observou-se uma queda de peso após a manipulação experimental, sendo que o peso no dia 2 foi, em média, menor do que o peso inicial para quase todos os ratos do estudo. Os ratos do grupo I perdem em média $9,16g \pm 4,8g$, enquanto que o grupo II foi o que mais peso perdeu até ao dia 2: $28,87g \pm 7,73g$, observando-se uma diminuição geral do peso destes animais até ao último dia de experimentação. A variação de peso no sentido negativo (perda de peso), é significativa para o grupo I ($-21,28 \pm 16,43g$) 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 II $t(8)=4,96$; $p=0,001$ (teste de Kruskal Wallis).

3.2.4- Variação do Peso do Timo, Baço e Supra-renais

No gráfico 2 e 3, encontram-se demonstradas as variações do peso dos órgãos timo, baço e supra-renais.

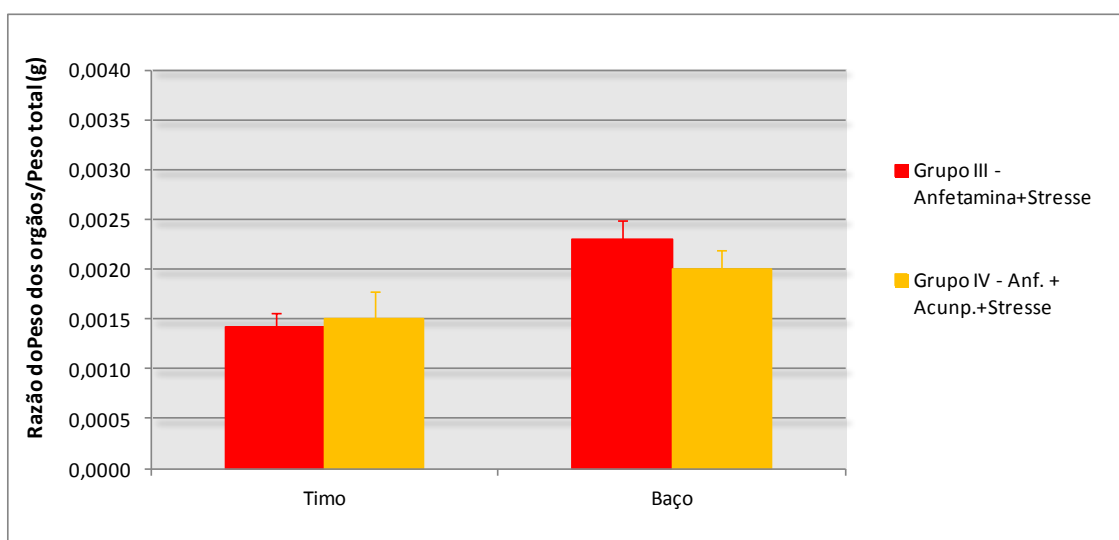


Gráfico 2 – Variação dos valores da Razão de peso do timo/ peso total e do baço/ peso total em função dos grupos.

No início da experiência (dia 0), existiam 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 3 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 um valor mais baixo ($0,00142 \pm 0,000133g$) relativamente ao grupo II ($0,00154 \pm 0,00019g$). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$, teste LSD).

Relativamente à razão Peso do Baço/Peso Total podemos verificar que o Grupo I apresenta o valor de $0,00231 \pm 0,00018g$ e o grupo II um valor ligeiramente mais baixo $0,00239 \pm 0,0001g$. Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$, teste LSD).

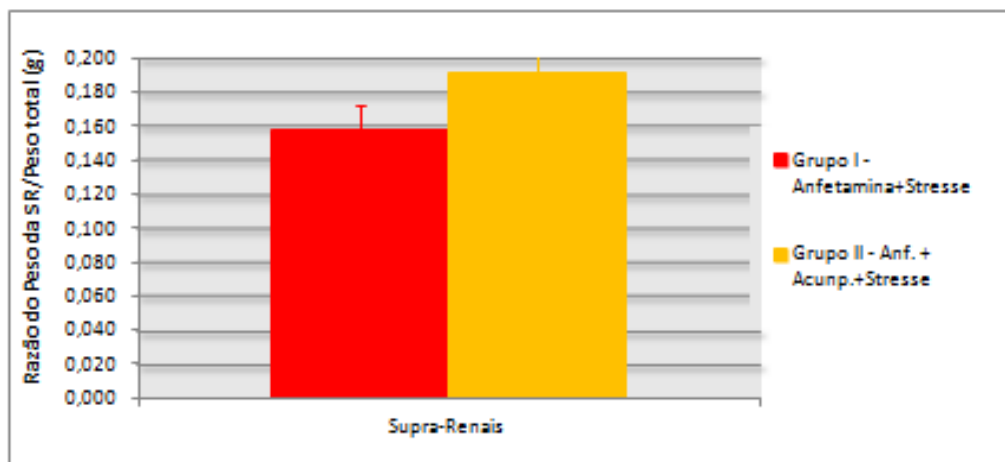


Gráfico 3 – Variação dos valores da Razão de peso das supra-renais/ peso total em função dos grupos.

Relativamente à razão Peso das Supra-renais/Peso Totalx1000 podemos verificar que, neste caso o Grupo I apresenta o valor um valor mais baixo ($0,157 \pm 0,014g$), relativamente ao Grupo II ($0,19152 \pm 0,02g$). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$, teste LSD)

3.2.3 - Variação da Concentração Sérica do Cortisol

Os resultados das colheitas sanguíneas e da análise do cortisol estão representados no gráfico 4. Estes estão expressos em micro gramas por decilitro de soro ($\mu g/dL$).

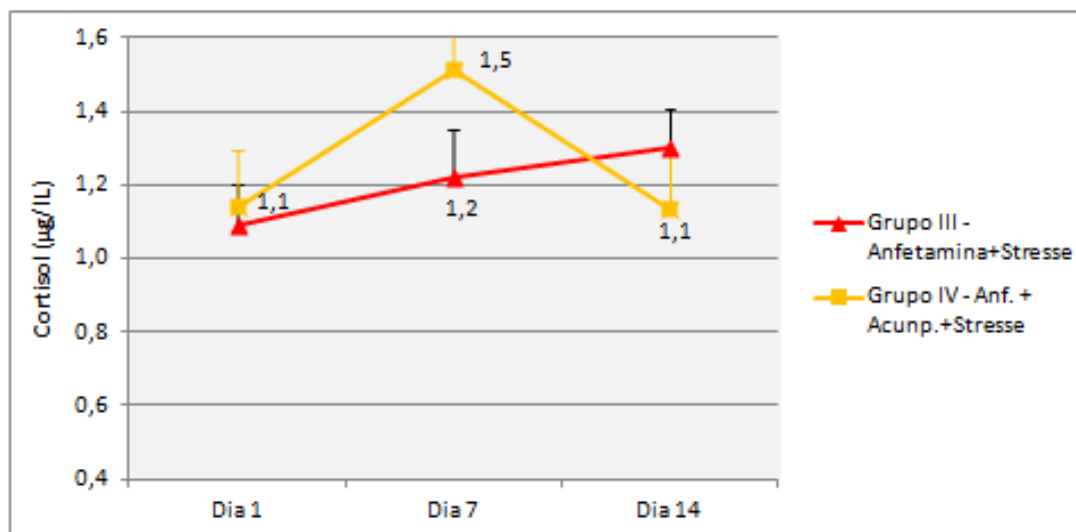


Gráfico 4 - Variação da concentração média do Cortisol, em função dos dias.

No dia 1, observa-se que os valores do cortisol são mais elevados para o grupo II (1.142 µg/dl) menores o grupo I (1.087 µg/dL). Estas diferenças não são estatisticamente significativas para G1_Dia 1 ↔ G2_Dia 1 ($p=0.886$; teste LSD).

Após a primeira semana de indução de stresse, obtivemos, como esperado, um aumento dos valores de cortisol no soro dos animais de ambos os grupos. Um pico inesperado e estatisticamente significativo surgiu entre G2_Dia 2 e G2_Dia 1 ($p=0.000$; Anova de Friedman), para diminuir depois para um valor muito semelhante ao inicial na terceira análise (1.132 µg/dL). Esta diminuição na terceira análise torna a variação G2_Dia 1 ↔ G2_Dia 3 não estatisticamente significativa ($p=0.278$; teste Anova de Friedman), à semelhança do que aconteceu no G1 ($p=0,078$; teste Anova de Friedman), em que a alteração que ocorreu ao longo das 3 medições do cortisol não foi estatisticamente significativa.

3.2.3- Variação da concentração sérica da creatina-cinase

Os resultados das colheitas sanguíneas e da análise da enzima creatinina-cinase estão demonstrados no gráfico 5. Os resultados estão expressos em unidades de enzima por litro de soro (U/L).

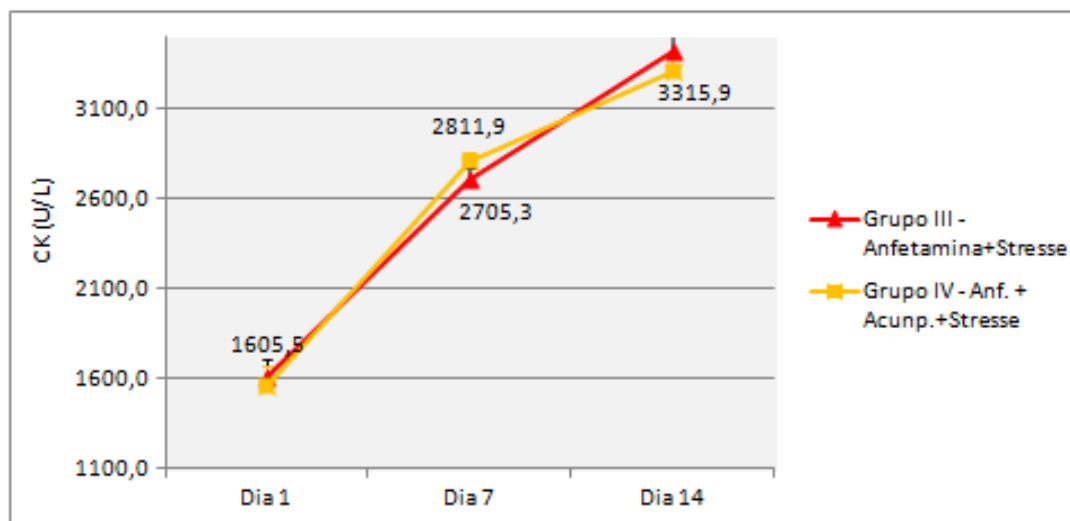


Gráfico 5 – Variação da concentração sérica dos valores da CK em função dos dias.

É notório a partir da primeira análise um aumento dos valores de CK, quer no grupo I, quer no grupo II. No entanto, apesar do aumento considerável, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos nos três períodos testados ($p > 0,05$, teste LSD).

Curiosamente, 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 II (2837,28 U/L) com um valor ligeiramente superior ao grupo I (2705,29 U/L), para depois se inverter novamente na Análise 3 em que o grupo I = 3416,90 U/L e o grupo II é ligeiramente inferior (3291,17 U/L).

3.2.5- Avaliação da atrição dentária

Os resultados da medição da atrição incisal estão demonstrados no gráfico 6. Os resultados estão expressos em milímetros (mm). A medição da atrição incisal foi efetuada com uma craveira digital nos dois incisivos inferiores dos ratos. Com os valores obtidos foi efetuada uma média de atrição por rato.

O valor de atrição é mais elevado no grupo II (7.84 ± 0.62 mm), submetido a anfetaminas e acupuntura, do que no grupo I (7.24 ± 0.41 mm). Estas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0.009$, teste de LSD). A diferença entre o grupo I e grupo II é de $0.6067 \text{ mm} \pm 0,16 \text{ mm}$.

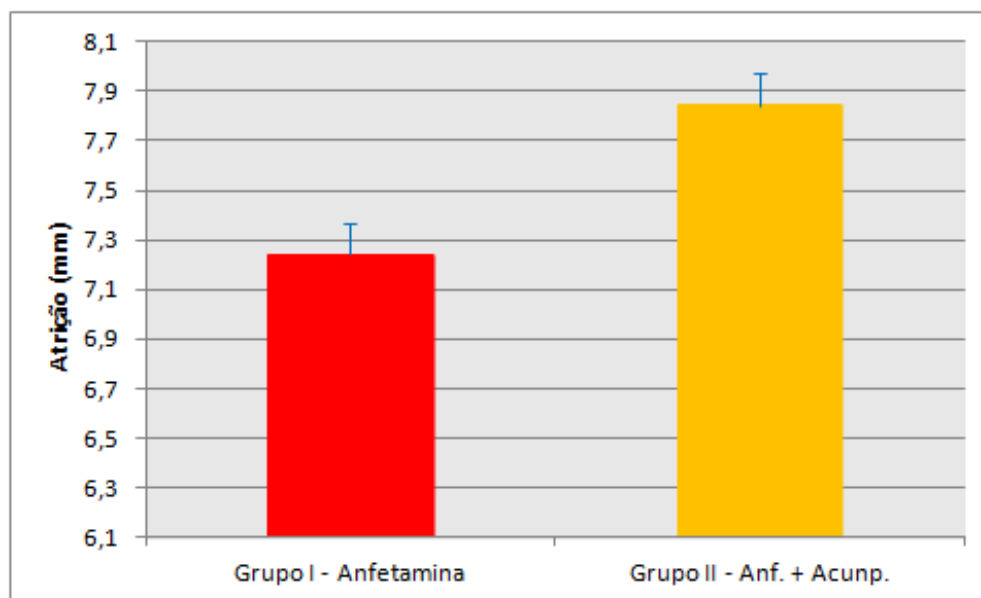


Gráfico 6 – Variação dos valores de atrição em função dos grupos.

3.2.6 - Avaliação do Comportamento MMNF

No gráfico 7 é possível avaliar as alterações dos MMNF dos animais dos dois grupos experimentais ao longo do tempo.

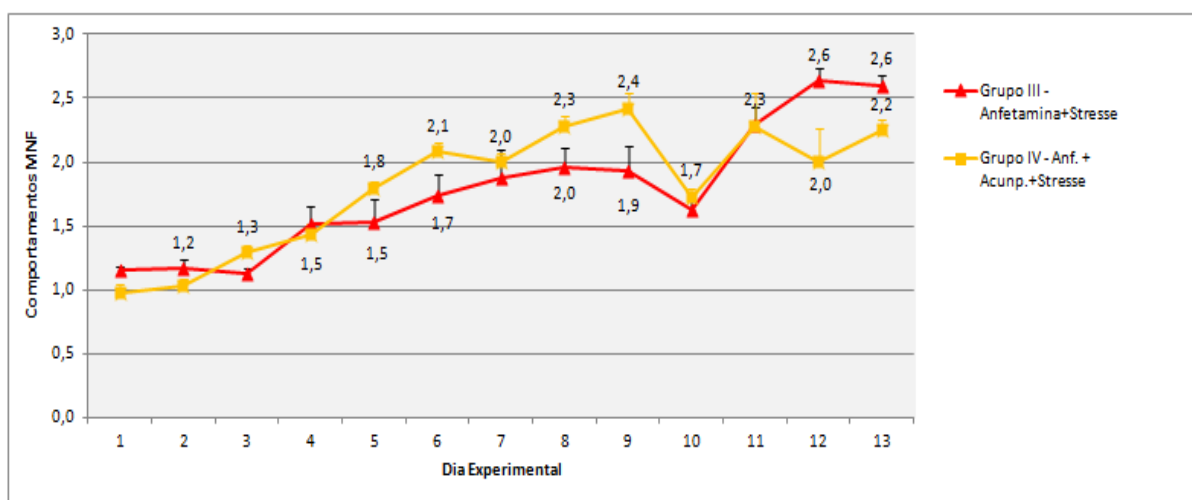


Gráfico 7 – Variação dos valores de MMNF segundo a escala utilizada em função dos grupos.

Em função da escala utilizada podemos observar que os comportamentos MMNF apresentam esporadicamente picos, principalmente no grupo II nos dias 6, 9 e 11.

Analisando os valores iniciais e finais (dia 1 e dia 13) para os grupos podemos verificar que 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 I e $p=0.04$ para o grupo II; teste de Wilcoxon).

Ao longo do período experimental podemos constatar que os grupos I e II são diferentes entre si nos dias 5, 6, 8, 9, 12 e 13 em que $p < 0.05$ (teste LSD).

Curiosamente o grupo II submetido a acupuntura, apresenta dos dias 5 a 10 uma maior taxa de MMNF, o que vai de encontro aos valores aumentados de cortisol como foi visto anteriormente e poderá justificar uma maior atrição final exibida pelos animais deste grupo.

DISCUSSÃO

O presente estudo experimental está integrado num trabalho mais amplo sobre movimentos mastigatórios não funcionais, a decorrer no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Assim, este estudo aproveitou o modelo com animais e parte da metodologia empregues neste.

Têm sido desenvolvidos numerosos estudos para compreender o stresse como fator causal de parafunções e DTM.⁽³⁸⁾ Tem-se procurado desenvolver protocolos experimentais com modelos animais que reproduzam situações semelhantes às que ocorrem em humanos em condições de stresse. Para isso têm sido utilizados modelos com roedores sob a influência de inúmeros agentes stressores.^(33, 71, 72) Rosales, tentou simular um ambiente stressante, utilizando uma caixa de comunicação, de modo a induzir parafunções nos músculos mastigadores. Concluiu que os animais desenvolveram parafunções, após a indução de stresse, tais como o bruxismo.⁽⁷³⁾ Já Gomez e Areso realizaram experiências com ratos em caixas de comunicação, em que concluíram que a duração de indução e o tipo de agentes stressores poderiam estar relacionados com a capacidade do stresse induzir bruxismo.⁽⁵⁾

A escolha dos três protocolos de ruídos (predadores, urbanos e mistos), neste trabalho, baseou-se na necessidade de induzir stresse físico e sociopsicológico (reproduzindo assim o ambiente presente em humanos) bem como na disponibilidade dos materiais e questões logísticas. Como comprovado em alguns estudos, houve necessidade de alternar os protocolos de stresse devido à capacidade de adaptação dos animais a um só tipo de agente stressante.^(33, 74)

Este estudo experimental teve como objetivo contribuir para um melhor conhecimento da relação entre os efeitos provocados pelo protocolo de injeção de anfetamina, pelo protocolo de acupuntura e os MMNF.

A necessidade de incluir apenas animais do sexo masculino pretende evitar influências hormonais no processo experimental.

Peso Corporal

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.^(31, 33, 72, 75, 76)

No dia 0, início da experiência, o GI ($276,22 \pm 15,17g$) apresentava peso inferior ao do GII ($333,17 \pm 23,20g$). Verificou-se uma diminuição de peso nos dois grupos, sendo mais notória no GII. Esta diminuição poder-se-á dever à mudança do meio em que os animais se encontravam, bem como à manipulação experimental realizada pela primeira vez (realização de marcas dentárias, stresse induzido,...).

Até ao final da experiência, em ambos os grupos, observou-se uma queda de peso após a manipulação experimental. A variação de peso no sentido negativo (perda de peso), é significativa para o GI ($-21,28 \pm 16,43g$) em que $t(9)=4,094$; $p=0,03$ (teste de Kruskal Wallis), mas ainda mais significativa ($-49,37 \pm 29,83g$) para o GII $t(8)=4,96$; $p=0,001$ (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.

Os ratos deveriam apresentar no dia 0, pesos iniciais não estatisticamente diferentes o que corresponde a um possível viés do nosso estudo. No entanto esta diferença de peso é-nos alheia na medida em que, os ratos foram distribuídos aleatoriamente pelos 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.

Segundo Connell, a toxicidade de anfetaminas pode manifestar-se em perda de peso, devido ao estado agudo de ansiedade que as mesmas provocam.⁽⁷⁷⁾ 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.⁽⁷⁸⁾ 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.⁽⁷⁹⁾

A perda de peso relacionada com o stresse, foi demonstrada em dois estudos com o mesmo modelo experimental, onde foram induzidos agentes stressores. Nestes estudos, verificou-se que após a indução de stresse, não ocorreu aumento de peso estatisticamente significativo, ao contrário do que aconteceu no grupo sem qualquer manipulação experimental. Ou seja, a indução de stresse não permitiu o aumento de peso corporal^(80, 81) Já nos resultados obtidos no presente estudo, e comparando com os resultados dos estudos citados anteriormente, verifica-se que quando há indução, não só de stresse, mas também injeção de anfetamina (o que ocorre no GI), há uma perda de peso estatisticamente significativa.

Timo, Baço e Supra-renais

Na avaliação *post-mortem* do peso dos órgãos timo, baço e glândulas supra-renais verificou-se que os valores referentes ao grupo I eram inferiores aos do grupo II, para o timo e para as supra-renais e superior no que refere aos valores do baço. Contudo, nenhuma destas diferenças era estatisticamente significativa. Como já foi referido anteriormente, a este fato não poderá ser alheio uma diferença de base no peso total dos animais, embora o peso do baço não se enquadre neste padrão.

Tanto a perda de peso total como a dos órgãos individuais podem estar relacionadas com a indução de stresse. Na literatura, os resultados obtidos em diversos estudos relativamente à relação entre o peso do baço, timo e supra-renais, peso corporal e o stresse induzido nem sempre estão de acordo. No entanto, é possível afirmar que o peso *post-mortem* das glândulas supra-renais representa um indicador útil para avaliar a severidade do stresse crónico.⁽⁷⁵⁾ Segundo o estudo de Sato, 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.⁽⁴⁶⁾ De facto, neste estudo, o peso do timo do GI é mais baixo, ou seja, há uma maior perceção de stresse, mas não é estatisticamente significativo. Contudo, quando comparado com outros estudos utilizando o mesmo modelo experimental, as diferenças nos diferentes pesos são estatisticamente significativas.^(80, 81) Ishikawa e Rosales, nos seus estudos, não observaram alterações no peso destes órgãos nem no peso corporal total.⁽⁶⁴⁾ A razão de não existirem diferenças significativas entre os restantes grupos pode dever-se ao facto do efeito do stresse emocional induzido não ter sido suficientemente forte para produzir uma diminuição de peso destes órgãos.^(31, 82)

Relativamente ao baço, e comparando com o estudo de Gonçalves D.⁽⁸⁰⁾, para um mesmo modelo experimental, mas sem qualquer manipulação, a acupuntura parece fazer efeito. Esse efeito poderá ser essencialmente atribuído à perda de peso geral que estes animais sofreram, mas também à sua maior perceção do stresse, como documenta o cortisol, os MMNF e até a própria atrição.

De facto, neste estudo, parece haver diferenças nos pesos, quando se combina o stresse com a anfetamina e a acupuntura, sendo que esta última não parece trazer alterações significativas na diminuição do stress, à exceção das supra-renais. Nestas últimas, o aumento poderá ser lógico, considerando o efeito ansiolítico da acupuntura, a diminuição do cortisol observada na análise 3 do grupo II bem como uma aparente diminuição dos comportamentos MMNF na fase final do estudo.

Cortisol

Através do aumento da concentração sérica do cortisol, é possível avaliar a presença de stresse e a sua relação com o bruxismo.^(33, 42, 83, 84) Também o consumo de ATS tem sido descrito como causador do aumento dos níveis de cortisol.⁽⁸⁵⁾

Para efetuar as medições do cortisol podem ser recolhidas amostras salivares ou serológicas.⁽⁸⁵⁾ Nos estudos em ratos, a colheita salivar em quantidades suficientes, para permitir uma análise bioquímica, é tecnicamente mais difícil do que a colheita sanguínea⁽⁸⁶⁾. Por isso optou-se por recolher amostras sanguíneas de modo a determinar as variações na concentração de cortisol plasmático, após a indução de stresse e infiltração de d-anfetamina.

As determinações dos níveis sanguíneos de cortisol apenas são válidas quando são relacionadas com o período do ritmo circadiano em que são efetuadas.⁽⁸⁷⁾ A recolha foi realizada após a indução do protocolo experimental, entre as 9:00 e as 11:30 horas, a fim de obter uma resposta padronizada das concentrações do cortisol.

No decorrer do tempo experimental, foram efetuadas três medições da concentração sérica do cortisol de todos os grupos experimentais.

Na análise 1, não há diferenças estatisticamente significativas entre o GI e o GII ($p=0.886$; teste LSD). Para o GI, 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 GII. No entanto os níveis diminuíram, sendo que a variação G2_Dia 1↔G2_Dia 14 não é estatisticamente significativa ($p=0.278$; teste Anova de Friedman).

Apesar das diferenças entre os valores iniciais e finais para ambos os grupos não serem estatisticamente significativas, estes valores são superiores quando comparados com o estudo de Gonçalves D., demonstrando o efeito da anfetamina no aumento do stresse.⁽⁸⁰⁾

Alguns estudos defendem que a anfetamina e o stresse, levam a um aumento significativo do cortisol.⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ 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. Ishikawa, concluiu que após a aplicação de estímulos stressores em ratos, estes apresentavam um aumento dos níveis do cortisol.⁽⁶⁴⁾ 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.⁽⁸⁹⁾

Um estudo de Huang, demonstrou que os níveis de cortisol salivar aumentam durante a manhã, em indivíduos tratados com acupuntura para o stresse crónico, admitindo

serem necessários mais estudos para sustentar tal fato.⁽⁹⁰⁾ Lee, estudou o efeito da acupuntura 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 acupuntura. Observou que os níveis de cortisol aumentaram significativamente, havendo um aumento de 28% aos 15 minutos e de 50% aos 45 minutos.⁽⁹¹⁾ Estes dois estudos poderão justificar o aumento significativo do cortisol que ocorreu até ao dia 7, no GII. A diminuição após o dia 7, pode levar a duas questões: ou a acupuntura necessita de tempo para atuar, ou, e segundo o estudo de Sato, pode-se especular que os ratos realizem estratégias de coping (na quais poderemos incluir os MMNF avaliados também neste estudo), de forma a exteriorizar o stress,⁽⁷³⁾ levando assim a uma diminuição dos níveis de cortisol. Para além disso, se considerarmos que os ratos se habituem e diminuem a magnitude de resposta face à repetição do mesmo agente stressor, poderemos estar perante uma habituação do protocolo de acupuntura.

Creatina-cinase

A creatina-cinase é um biomarcador composto pelas isoformas MM, MB e BB, frequentemente utilizado para avaliar o grau de destruição no tecido muscular.^(74, 92) Normalmente, lesões diretas no tecido muscular, levam ao aumento da CK no soro.^(74, 93, 94)

É possível detetar um aumento da atividade do músculo masseter em animais que apresentam bruxismo, tal como o indicado nos estudos de Landgren, Weiner e Sitthisomwong.⁽³¹⁾ Este aumento da atividade 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.

A atividade locomotora aumenta de forma significativa após administração de ATS por via intraperitoneal,⁽⁹⁵⁾ bem como a contração muscular.⁽⁶³⁾

Neste estudo experimental, observa-se um aumento significativo da análise 1 para a análise 3 nos dois grupos. É possível concluir que o stresse associado às anfetaminas causa diferenças significativas na CK ao longo das 3 análises ($p < 0.05$ teste LSD de Fisher). Alguns estudos, reforçam a ideia de que o uso de ATS leva à existência de espasmos musculares e rabiomiólise, levando a um aumento da concentração de CK.^(96, 97) Contudo, e após análise dos resultados, a acupuntura 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 acupuntura, aplicada na dor muscular provocada por exercício induzido. Assim, tendo em

conta que a anfetamina aumenta a rabdomiólise, a acupuntura poderá não ter um efeito tão potente que a possa contrariar, ainda mais quando isso não acontece aquando apenas do exercício físico, como descrito por este autor.⁽⁹⁸⁾

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.^(33, 82, 99, 100) Neste estudo, os grupos experimentais tiveram todos acesso ao mesmo tipo de alimentação e ração seca, de forma a excluir qualquer influência no desgaste incisal, uma vez que a consistência da dieta influencia o desgaste por atrição.^(82, 101)

As diferenças dos valores de atrição observadas são consideradas estatisticamente significativas ($p < 0.009$, teste de LSD) entre os dois grupos. No entanto, o contrário do que era esperado, a atrição revelou-se maior no GII ($7.84 \pm 0.62\text{mm}$), relativamente ao GI ($7.24 \pm 0.41\text{mm}$).

Estudos realizados em ratos, mostraram que o aumento da atividade mastigatória não funcional pode ser induzido pela estimulação repetida do sistema dopaminérgico com apomorfina, um agonista dos recetores dopaminérgicos. É possível relacionar estes movimentos mastigatórios com a taxa de atrição incisal.^(56, 63) A apomorfina, a dopamina e a d-anfetamina têm sido associadas à indução de comportamentos estereotipados em ratos (atos de cheirar, morder e lambar). O ato compulsivo de roer contribui para o desgaste dentário, podendo este efeito ser consequência destes estimulantes.^(60, 61, 63) Estes comportamentos têm sido considerados como formas de bruxismo experimental induzidas por drogas.⁽⁵⁵⁾

A acupuntura, no entanto, não diminuiu a atrição apresentada pelos ratos do GII. 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 o animais apresentaram no dia 7. Esta percepção inicial de stress pelos animais deste grupo poderá justificar o aumento da atrição neste grupo. Para além disso, se considerarmos o estudo de Sato, em que os ratos poderão utilizar os MMNF como forma de regular/diminuir o stress (e dessa forma o cortisol sérico), poderemos compreender os valores dos MMNF aumentados no GII 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 stressor.⁽⁷³⁾ Considerando a

diminuição do cortisol na análise 3 e na escala de comportamentos orais, poderia ser interessante avaliar um efeito mais longo da acupuntura na atrição, pois a manutenção desta tendência poderia levar a uma diminuição da atrição a longo prazo quando comparado com o grupo I.

Não existem contudo estudos na literatura que relacionem o efeito da acupuntura na atrição incisal. No entanto, pode-se supor que, se a indução de stresse e anfetamina provocam um aumento significativo da atrição, e o fato da manipulação dos ratos poder ser, por si só, um agente stressante, poderá aumentar ainda mais e de forma considerável os valores da atrição dentária.

Comportamento

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.^(33, 56) Neste estudo, foi utilizado, para além do método de avaliação comportamental, um método de avaliação dos MMNF baseado na medição da atrição dos incisivos inferiores.^(33, 56, 70)

Devido à capacidade das ATS induzirem alterações comportamentais em humanos, diversos estudos têm sido realizados em ratos de forma a avaliar estes comportamentos.⁽¹⁰²⁾ O comportamento estereotipado, alterações nos estímulos do comportamento controlado e aumento de comportamentos locomotores espontâneos, estão entre as alterações comportamentais provocadas por ATS.⁽¹⁰²⁾

A soma dos resultados decorrentes do período de observação, deu origem ao resultado diário do comportamento de cada animal.⁽³³⁾ Verificaram-se picos esporádicos, principalmente no GII, nos dias 6, 9 e 11. De forma consistente com a literatura, estes animais apresentaram picos de MMNF nos dias em que foram submetidos a *crowding* ou vibração corporal.^(31, 33) O intervalo entre os dias 5 e 10, em que o GII apresenta comportamentos superiores ao GI 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 GII diminuem, levando novamente à correlação com os níveis de cortisol que também diminuiram na análise 3. Estes dados poderão de certa forma justificar parcialmente os maiores níveis de atrição revelados pelo GII com descrito anteriormente. Parece existir uma tendência de diminuição dos MMNF para os animais do GII, relativamente ao GI, pelo que poderia ser útil avaliar o efeito da acupuntura num tempo experimental mais longo

CONCLUSÃO

A acupuntura é uma prática terapêutica com sucesso documentado no tratamento do stresse.⁽¹⁴⁻¹⁸⁾

Ao contrário do que se esperava, neste estudo, a acupuntura não diminuiu a atrição incisal e levou a uma perda de peso significativa. A acupuntura aumentou o nível de cortisol na análise intermédia, conforme suportado na literatura,^(90, 91) 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 acupuntura poderá, por si só, ser um agente stressante em animais, mas também que a acupuntura poderá necessitar de tempo para atuar ou que os animais, em função do tempo, se habituam a este fator, diminuindo a intensidade de resposta. No entanto, e devido à falta de estudos que relacionem acupuntura e atrição, são necessários mais dados para se chegar a um consenso de qual o seu verdadeiro efeito.

A acupuntura não trouxe alterações significativas relativamente à CK, assim como aos pesos do timo, baço e supra-renais.

Apesar dos resultados de experiências com animais não poderem ser diretamente aplicados a humanos, são úteis para extrapolar hipóteses para futura investigação no Homem.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor António Cabrita, meu Orientador, pelo apoio, dedicação e disponibilidade, no decurso da elaboração de todo este trabalho experimental.

Ao Dr Júlio Fonseca, meu Co-orientador, pelo empenho, dedicação, orientação e apoio neste trabalho, desde o primeiro dia até ao último minuto.

À Dra. Diana Gonçalves e à Dra. Liliana Santos pela disponibilidade e ajuda no decorrer de todo o trabalho experimental, foram um pilar muito importante.

Ao Departamento de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, nomeadamente aos seus funcionários (Gustavo Barradas, Dra. Rute Vasconcelos), pela ajuda na elaboração deste trabalho experimental.

À Dra. Daniela Abreu, pela disponibilização e preciosa ajuda no tratamento estatístico de todos os dados referentes a esta experiência.

À Faculdade de Medicina e à Área de Medicina Dentária, a todos os Professores e as todas as pessoas que fazem parte dele, por todos os ensinamentos, por serem os pilares da minha formação a cada dia que passou e que agora culmina.

BIBLIOGRAFIA

1. 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 Dec;3(4):260-6.
2. RMDT V, CM G, MLR S, F B. ELECTROMYOGRAPHY STUDY OF MASTICATORY MUSCLES IN PATIENTS WITH BRUXISM BEFORE AND AFTER ACUPUNCTURE TREATMENT. PILOT STUDY. *Braz J Oral Sci.* 2010;9(2):142-332.
3. Benoliel R, Zaidan S, Eliav E. Acupuncture modulates facial warm sensory thresholds. *J Orofac Pain.* 2011 Winter;25(1):32-8.
4. Shen YF, Goddard G. The short-term effects of acupuncture on myofascial pain patients after clenching. *Pain Pract.* 2007 Sep;7(3):256-64.
5. Manfredini D, Lobbezoo F. Role of psychosocial factors in the etiology of bruxism. *J Orofac Pain.* 2009 Spring;23(2):153-66.
6. Lobbezoo F, Naeije M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. *J Oral Rehabil.* 2001 Dec;28(12):1085-91.
7. Lavigne GJ, Kato T, Kolta A, Sessle BJ. Neurobiological mechanisms involved in sleep bruxism. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):30-46.
8. 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 Apr;33(4):293-300.
9. Jensen LB, Jensen SB. Effect of acupuncture on tension headache and urinary catecholamine excretion. *Scand J Dent Res.* 1982 Oct;90(5):397-403.
10. Skootsky SA, Jaeger B, Oye RK. Prevalence of myofascial pain in general internal medicine practice. *West J Med.* 1989 Aug;151(2):157-60.
11. Alonso-Navarro H, Martin-Prieto M, Ruiz-Ezquerro JJ, Jimenez-Jimenez FJ. Bruxism possibly induced by venlafaxine. *Clin Neuropharmacol.* 2009 Mar-Apr;32(2):111-2.
12. Rosted P. Introduction to acupuncture in dentistry. *Br Dent J.* 2000 Aug 12;189(3):136-40.
13. White A. Western medical acupuncture: a definition. *Acupunct Med.* 2009 Mar;27(1):33-5.
14. Errington-Evans N. Acupuncture for anxiety. *CNS Neurosci Ther.* 2012 Apr;18(4):277-84.
15. 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 Feb;17(1):16-21.
16. Middlekauff HR, Yu JL, Hui K. Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 May;280(5):R1462-8.
17. 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 Mar 31;118(1-2):93-101.
18. 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 Oct 22;484(1):47-50.
19. 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 Dec;30(12):1445-50.
20. 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 Aug 21;460(1):56-60.
21. WA D. Dorland's illustrated medical dictionary. 29th ed: Philadelphia: WB Saunders. 2000.
22. Bader G, Kampe T, Tagdae T. Body movement during sleep in subjects with long-standing bruxing behavior. *Int J Prosthodont.* 2000 Jul-Aug;13(4):327-33.
23. Shetty S, Pitti V, Satish Babu CL, Surendra Kumar GP, Deepthi BC. Bruxism: a literature review. *J Indian Prosthodont Soc.* 2010 Sep;10(3):141-8.

24. Koyano K, Tsukiyama Y, Ichiki R, Kuwata T. Assessment of bruxism in the clinic. *J Oral Rehabil.* 2008 Jul;35(7):495-508.
25. 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 Jan-Feb;22(1):43-8.
26. Manfredini D, Landi N, Fantoni F, Segu M, Bosco M. Anxiety symptoms in clinically diagnosed bruxers. *J Oral Rehabil.* 2005 Aug;32(8):584-8.
27. Winocur E, Gavish A, Voikovitch M, Emodi-Perlman A, Eli I. Drugs and bruxism: a critical review. *J Orofac Pain.* 2003 Spring;17(2):99-111.
28. DuPont JS, Jr., Brown C. Management of nocturnal bruxism with an anterior stop point appliance. *J Tenn Dent Assoc.* 2008 Fall;88(4):20-4; quiz 4-5.
29. Manconi M, Zucconi M, Carrot B, Ferri R, Oldani A, Ferini-Strambi L. Association between bruxism and nocturnal groaning. *Mov Disord.* 2008 Apr 15;23(5):737-9.
30. 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 Oct;26(4):287-93.
31. 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 Feb;24(1):107-17.
32. 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 Mar;16(2):e231-8.
33. 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 Jun;77(6):1454-64.
34. 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 Aug;35(8):585-93.
35. Klasser GD, Greene CS. Role of oral appliances in the management of sleep bruxism and temporomandibular disorders. *Alpha Omegan.* 2007;100(3):111-9.
36. Restrepo C, Gomez S, Manrique R. Treatment of bruxism in children: a systematic review. *Quintessence Int.* 2009 Nov-Dec;40(10):849-55.
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 Apr;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 Jul;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 Jan;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.* [Review]. 1995;9:33-7.
41. Pavone BW. Bruxism and its effect on the natural teeth. *J Prosthet Dent.* 1985 May;53(5):692-6.
42. Budtz-Jogensen E. Bruxism and trauma from occlusion. An experimental model in Macaca monkeys. *J Clin Periodontol.* 1980 Apr;7(2):149-62.
43. Kanehira H, Agariguchi A, Kato H, Yoshimine S, Inoue H. Association between stress and temporomandibular disorder. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi.* 2008 Jul;52(3):375-80.
44. Kato T, Rompre P, Montplaisir JY, Sessle BJ, Lavigne GJ. Sleep bruxism: an oromotor activity secondary to micro-arousal. *J Dent Res.* 2001 Oct;80(10):1940-4.
45. Kleinberg I. Bruxism: aetiology, clinical signs and symptoms. *Aust Prosthodont J.* 1994;8:9-17.
46. Lobbezoo F, Lavigne GJ. Do bruxism and temporomandibular disorders have a cause-and-effect relationship? *J Orofac Pain.* 1997 Winter;11(1):15-23.
47. 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 Aug;15(4):327-33.

48. Manfredini D, Peretta R, Guarda-Nardini L, Ferronato G. Predictive value of combined clinically diagnosed bruxism and occlusal features for TMJ pain. *Cranio*. 2010 Apr;28(2):105-13.
49. Okeson JP. Occlusion and functional disorders of the masticatory system. *Dent Clin North Am*. 1995 Apr;39(2):285-300.
50. Okeson JP. The effects of hard and soft occlusal splints on nocturnal bruxism. *J Am Dent Assoc*. 1987 Jun;114(6):788-91.
51. 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 Aug;12(4):E292-8.
52. Ramfjord SP. Bruxism, a clinical and electromyographic study. *J Am Dent Assoc*. 1961 Jan;62:21-44.
53. 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.
54. 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 Dec;10(4):261-8.
55. Pohto P. Experimental aggression and bruxism in rats. *Acta Odontol Scand*. 1979;37(2):117-26.
56. Ernst AM. Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia*. 1967;10(4):316-23.
57. Sunden-Kuronen B, Pohto P, Alanen E. Oral tardive dyskinesia in the rat. *Acta Odontol Scand*. 1983 Dec;41(6):343-8.
58. Micheli F, Fernandez Pardal M, Gatto M, Asconape J, Giannaula R, Parera IC. Bruxism secondary to chronic antidopaminergic drug exposure. *Clin Neuropharmacol*. 1993 Aug;16(4):315-23.
59. Greene SL, Kerr F, Braitberg G. Review article: amphetamines and related drugs of abuse. *Emerg Med Australas*. [Review]. 2008 Oct;20(5):391-402.
60. Goodchild JH, Donaldson M. Methamphetamine abuse and dentistry: a review of the literature and presentation of a clinical case. *Quintessence international*. [Case Reports Review]. 2007 Jul-Aug;38(7):583-90.
61. Donaldson M, Goodchild JH. Oral health of the methamphetamine abuser. *Am J Health Syst Pharm*. 2006 Nov 1;63(21):2078-82.
62. Baylen CA, Rosenberg H. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction*. 2006 Jul;101(7):933-47.
63. See SJ, Tan EK. Severe amphetamine-induced bruxism: treatment with botulinum toxin. *Acta Neurol Scand*. [Case Reports]. 2003 Feb;107(2):161-3.
64. 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 Jan;57(1):41-7.
65. Adamson ED. Isoenzyme transitions of creatine phosphokinase, aldolase and phosphoglycerate mutase in differentiating mouse cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1976 Apr;35(2):355-67.
66. Kant GJ, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985 Apr;22(4):631-4.
67. Kato H, Saito M, Suda M. Effect of starvation on the circadian adrenocortical rhythm in rats. *Endocrinology*. 1980 Mar;106(3):918-21.
68. Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci*. 1990 Feb;104(1):28-36.
69. 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.

70. 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.
71. 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 Oct;55(4):1208-15.
72. 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 Jun 27;649(1-2):27-35.
73. Sato C, Sato S, Takashina H, Ishii H, Onozuka M, Sasaguri K. Bruxism affects stress responses in stressed rats. *Clin Oral Investig*. 2010 Apr;14(2):153-60.
74. Gutenbrunner C. Circadian variations of the serum creatine kinase level--a masking effect? *Chronobiol Int*. 2000 Jul;17(4):583-90.
75. 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 Oct;6(10):2908-14.
76. Marsh JT, Rasmussen AF, Jr. Response of adrenals, thymus, spleen and leucocytes to shuttle box and confinement stress. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960 Jun;104:180-3.
77. Connell. Clinical Manifestations and Treatment of Amphetamine Type of Dependence. *J American Medical Association*. 1966;196(8):718-23.
78. Sund AM, Zeiner P. Does extended medication with amphetamine or methylphenidate reduce growth in hyperactive children? *Nord J Psychiatry*. 2002;56(1):53-7.
79. Jones JR, Caul WF. Effects of amphetamine on food intake and weight: timing of injections and food access. *Physiology & behavior*. 1992 Sep;52(3):515-20.
80. Gonçalves D. Dissertação de Mestrado Integrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra - Avaliação da Concentração do Cortisol num Modelo Experimental de Movimentos Mastigatórios Não Funcionais 2011.
81. Santos L. Dissertação de Mestrado Integrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra - Avaliação da Concentração Sérica da Creatina-quinase num Modelo Experimental de Movimentos Mastigatórios Não Funcionais 2011.
82. 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 May-Jun;46(3):527-31.
83. Gomez FM, Giralta 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 Dec;107(6):461-7.
84. Budtz-Jorgensen E. A 3-month study in monkeys of occlusal dysfunction and stress. *Scand J Dent Res*. 1980 Jun;88(3):171-80.
85. 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 Feb;62(2):89-96.
86. Duplessis C, Rascona D, Cullum M, Yeung E. Salivary and free serum cortisol evaluation. *Mil Med*. 2010 May;175(5):340-6.
87. Guyton AC. *TextBook of Medical Physiology*. 10 ed ed: GUANABARA KOOGAN.
88. Chen H, Wu J, Zhang J, Hashimoto K. Recent topics on pharmacotherapy for amphetamine-type stimulants abuse and dependence. *Curr Drug Abuse Rev*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2010 Dec 1;3(4):222-38.
89. 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.

90. 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 Mar;18(3):242-50.
91. 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.
92. Glew MDRRH. *Medical Biochemistry- Human Metabolism in Health and Disease*: Wiley; 2009.
93. Fitzpatrick LR. Masseter muscle rigidity, elevated creatine kinase, and rhabdomyolysis following succinylcholine administration: a case report. *AANA J*. 2008 Oct;76(5):349-54.
94. 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 Feb;74(2):642-8.
95. 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).
96. 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.
97. Richards JR, Johnson EB, Stark RW, Derlet RW. Methamphetamine abuse and rhabdomyolysis in the ED: a 5-year study. *Am J Emerg Med*. 1999 Nov;17(7):681-5.
98. 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.
99. Teaford MF, Tylenda CA. A new approach to the study of tooth wear. *J Dent Res*. 1991 Mar;70(3):204-7.
100. 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 Jan-Feb;48(1):120-30.
101. 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 May;8(2):71-9.
102. Grilly DM, Loveland A. What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology*. [Review]. 2001 Jan 1;153(2):155-69.