

FMUC **FACULDADE DE MEDICINA**
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



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

Joana Maria Martins Coutinho

Co-Orientador - Dr. Júlio André Ramalho da Fonseca

Orientador - Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira

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 Anfetamina num Modelo Experimental de
Movimentos Mastigatórios Não Funcionais**

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Joana Maria Martins Coutinho¹

Co-orientador - Dr. Júlio André Ramalho da Fonseca²

Orientador - Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira³

1. Aluno de Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMUC
2. Assistente Convidado das Disciplinas de Anatomia Dentária, Fisiologia do Aparelho Estomatognático e Reabilitação Oclusal do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Área da Medicina Dentária da FMUC
3. Professor Auxiliar da FMUC, Docente de Farmacologia I e II, Mestrado Integrado em Medicina; Regente de Farmacologia e Toxicologia, Mestrado Integrado em Medicina Dentária

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

Telef. 239484183/ Fax 239402910 E-mail: dmd@fmed.uc.pt

RESUMO

Introdução: Apesar de recentemente ter sido sugerida uma etiologia central para o bruxismo esta ainda não é consensual na comunidade científica. Foi sugerido que o consumo crónico de anfetamina produz bruxismo reforçando a hipótese da etiologia central.

Objetivos: Avaliação da atrição dentária, dos movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF), da concentração sérica da creatina cinase (CK, marcador de lesão muscular) e cortisol (hormona do stresse) e da evolução do peso corporal num novo modelo experimental de MMNF com anfetamina.

Materiais e métodos: Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 9 semanas de idade, divididos em 3 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 e o Grupo III (GIII) submetido a stresse e injeção de anfetamina segundo um protocolo de doses crescentes durante 14 dias. Com o objetivo 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 (Análises 1, 2 e 3, respetivamente) de modo a avaliar as variações das concentrações séricas da CK e do cortisol. O comportamento dos animais, incluindo o MMNF, foi monitorizado ao longo do estudo.

Resultados: A d-anfetamina potenciou o efeito do stresse no aumento do comportamento MMNF, e consequentemente, da atrição: GI ($6.4 \pm 0.2 \text{ mm}$), GII ($6.8 \pm 0.3 \text{ mm}$) e GIII ($7.2 \pm 0.4 \text{ mm}$). Enquanto que os animais do GII não aumentaram de peso, a anfetamina produziu uma diminuição do peso entre o dia 0 e o dia 14 no GIII ($-21.3 \pm 16.4 \text{ g}$). Relativamente a concentração sérica da CK, observou-se que o stresse produziu um aumento dos teores séricos desta enzima relativamente ao grupo controlo em função do tempo, atingindo o valor máximo ao 14º dia (análise 3): GI (1752.4 U/L), GII (2573.2 U/L) e GIII (3416.9 U/L). Os presentes resultados demonstram ainda que a anfetamina potencia a ação do stresse no aumento da CK sérica nos dias 7 e 14. Os valores do cortisol para os grupos GII e GIII são superiores ao GI ($p < 0.0001$) nos 3 tempos medidos. No entanto, não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GII e GIII.

Conclusões: A anfetamina potencia o efeito do stresse no comportamento MMNF, na atrição e no aumento da CK mas sem expressão significativa no aumento do cortisol circulante sugerindo que a expressão de MMNF atenua a ativação do eixo hipófise-hipotálamo-suprarrenal.

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

Abstract

Introduction: Central dopaminergic activity has been related with the etiopathogenesis of stress-induced bruxism, however there's no consensus around this issue within the scientific community. It was suggested that chronic use of amphetamine produces bruxism supporting the hypothesis of central origin.

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.

Materials and methods: 30 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 (GII); Group III was submitted simultaneously to stress and to escalating single daily doses of amphetamine using a procedure of increasing doses (GIII). 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 behavior of animals, including NFMM, was monitored throughout the study.

Results: Amphetamine potentiated stress-induced increase in NFMM, stress-related behavior and consequently in dental attrition (GI: 6.4 ± 0.2 mm, GII: 6.8 ± 0.3 mm and GIII: 7.2 ± 0.4 mm. While the GII animals didn't gain weight, amphetamine produced a decrease in body weight between day 0 and 14 in GIII (-21.3 ± 16.4). The CK serum levels increased time-dependently in both GII and GIII groups (Day 14-GI: 1752.4 U/L; GII: 2573.2 U/L and GIII: 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 GII. The GII and GIII cortisol levels were higher than the GI cortisol levels ($p < 0.0001$) in all assessed periods. However, there are no statistically significant differences between the groups GII and GIII.

Conclusions: A sensitizing dose d-amphetamine regimen potentiates stress-induced bruxism as seen by an increase in NFMM behavior, attrition and in CK serum levels. However, cortisol levels were not further increased by amphetamine, suggesting that the over stimulation of NFMM attenuates the function of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis under this stimulant.

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

INTRODUÇÃO

A anfetamina (1-metil-2-fenetilamina; sintetizada pela primeira vez na Alemanha em 1887)¹⁻⁴ foi introduzida na prática clínica em 1920 como tratamento para a asma,¹ tendo sido comercializado em 1932 um descongestionante nasal que continha este composto.^{1,5} A *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu estes inaladores, em 1959, devido ao seu consumo excessivo e potencial de abuso.¹

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

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.^{1,2,6,7} Nos anos subsequentes, verificou-se um aumento do fabrico e do consumo ilícito e clandestino destas substâncias.^{1,6,7}

Características farmacodinâmicas e farmacocinéticas da anfetamina e seus análogos

Os ATS, sendo 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 (metilamfetamina ou desoxiefedrina), o ecstasy (MDMA ou 3,4-metilenodioximetanfetamina), o metilfenidato, a metcatinona e a fenetilina.^{8,9}

A anfetamina e seus análogos são bases fracas lipofílicas, apresentando uma boa biodisponibilidade e grandes volumes de distribuição.¹ No homem a semi-vida da anfetamina varia entre 7-32h em função do pH da urina. Por outro lado, em ratos, a sua semi-vida varia entre 20 a 50 minutos, havendo acumulação no organismo após administração repetitiva.^{10,11}

Efeitos Clínicos

A anfetamina e os seus análogos produzem uma vasta gama de efeitos periféricos e centrais mediados pelo aumento maciço das aminas biogénicas dopamina, norepinefrina e serotonina na fenda sináptica.^{2,10,12} Na sequência da sua utilização por curtos períodos de tempo pode observar-se efeitos subjetivamente positivos como aumento da energia,¹⁰ atenção, vigília e diminuição da fadiga,¹³ mas também emoções e efeitos negativos como paranóia, ansiedade ou alucinações auditivas e visuais,¹⁰ euforia, hipertermia e suores generalizados (eg. mãos suadas e dormentes), aumento da frequência cardíaca e respiratória, diminuição do apetite,¹² midríase, hiperreflexia e tremor.^{1,6,7} Por outro lado, estas substâncias podem provocar dependência, vício, psicoses, défices na função neurocognitiva¹² e perda de peso quando usadas durante longos períodos.⁵ Foram ainda descritas tonturas, dor de cabeça, irritabilidade,^{6,7} agitação, desinibição, hemorragia intracerebral, convulsões e coma.^{1,14}

ATS e bruxismo

Ao longo dos anos, o bruxismo tem sido reconhecido como um problema clínico, tendo sido associado a fatores como a idade, ocupação, tipo de oclusão, dieta e consumo de drogas.¹⁵ O desgaste dentário exagerado é considerado um dos sinais mais comuns de bruxismo. Existe uma ampla discussão em volta da sua fisiopatologia,¹⁶ sendo consensual que a sua etiologia é multifactorial.^{13,17} Alguns autores têm sugerido uma mudança no conceito da etiologia do bruxismo, sugerindo uma alteração da etiologia periférica (ou seja, oclusal)^{18-22,32,34} para regulação central (stresse, personalidade e emoção).^{16,23-29}

Definido como uma ameaça real ou interpretada à integridade fisiológica ou psicológica, o stresse gera respostas fisiológicas e/ou comportamentais,²³ estando na origem de várias condições físicas que se encontram incompletamente compreendidas.³⁰

Diversos estudos apoiam ainda o envolvimento dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico centrais na etiopatogénese deste movimento parafuncional.^{15,25,31,32}

Por outro lado, Aschcroft³³ chamou a atenção para os movimentos não funcionais repetidos, incluindo o ranger de dentes (bruxismo) em consumidores de ATS em 1965.^{1,6,7,14,33,34}

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.⁷

O objectivo deste estudo experimental foi a avaliação do efeito de uma administração crónica de anfetamina em movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF) e a avaliação do comportamento e da atrição dentária após a indução de stresse. A concentração sérica de cortisol (marcador bioquímico de stresse) e de creatina-cinase (CK; marcador bioquímico de lesão muscular) foram igualmente avaliados.

Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho experimental foram utilizados 30 ratos Wistar machos, adultos, com 9 semanas de idade no início do estudo e com pesos compreendidos entre 255 e 333g. Foram previamente submetidos a um período de quarentena de 8 dias no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), com avaliações das condições de saúde, seleção, manutenção e garantia de bem-estar asseguradas por técnicos qualificados. Foi respeitado 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 mantidos em condições padronizadas de climatização do biotério (temperatura de 22°C, 60-65% de humidade e renovação de ar) e luminosidade (12horas de luz e 12horas de escuro), tendo sido colocados dois a dois em gaiolas metálicas adequadas à sua espécie, com espaço suficiente para se movimentarem, ração seca e água *ad libitum*.

Os 30 ratos Wistar foram separados aleatoriamente por três grupos experimentais (n=10):

Grupo I (GI) – Grupo de controlo negativo – Grupo de controlo mantido sem qualquer manipulação experimental

Grupo II (GII) – Grupo de manipulação experimental com protocolo de indução de stresse e injeção diária de Soro Fisiológico (NaCl 0,9 %), durante 14 dias. Este grupo serviu de controlo com o objetivo de verificar o padrão de alterações produzidas pela manipulação animal, incluindo a produção de MMNF.

Grupo III (GIII) – Grupo com protocolo de indução de stresse 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.

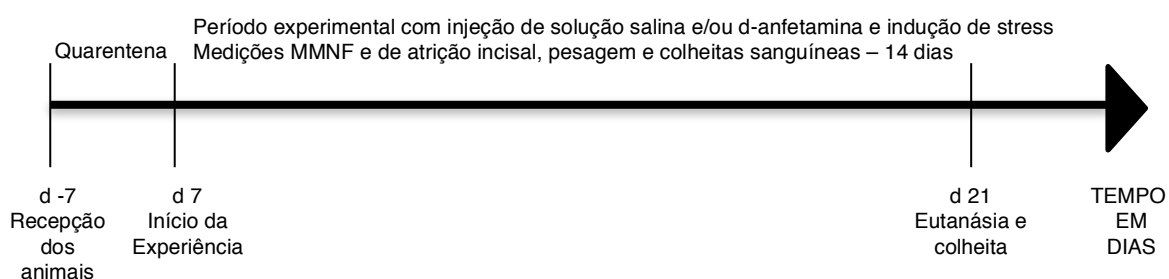


Figura 1 – Esquema do desenho experimental

Em todos os grupos experimentais, foi realizada uma pesagem diária com o auxílio de uma balança digital, sendo a última pesagem coincidente com a hora do sacrifício. Um dia antes do início das injeções de soro ou anfetamina e da exposição aos agentes stressores, efetuaram-se marcas dentárias nos incisivos centrais inferiores, com o objetivo de avaliar a atrição incisal (Imagens 1 e 2). Os animais foram anestesiados, previamente à realização das marcas dentárias, com uma

combinação anestésica de cloridrato cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e cloropromazina 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 rotação e com irrigação adequada.³¹ Consecutivamente mediram-se as distâncias entre as marcas e o bordo incisal dos incisivos centrais (X1), com o auxílio de uma craveira digital. No sétimo dia experimental, como as marcas estavam muito próximas do bordo incisal, efetuaram-se novas marcas junto à zona cervical e realizou-se nova medição da distância entre a 1ª e a 2ª marcas (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 entre a medida da marca inicial (X1) e entre a subtração da distância entre a segunda marca até ao bordo incisal (X3) pela distância entre a 1ª e a 2ª marcas (X2).

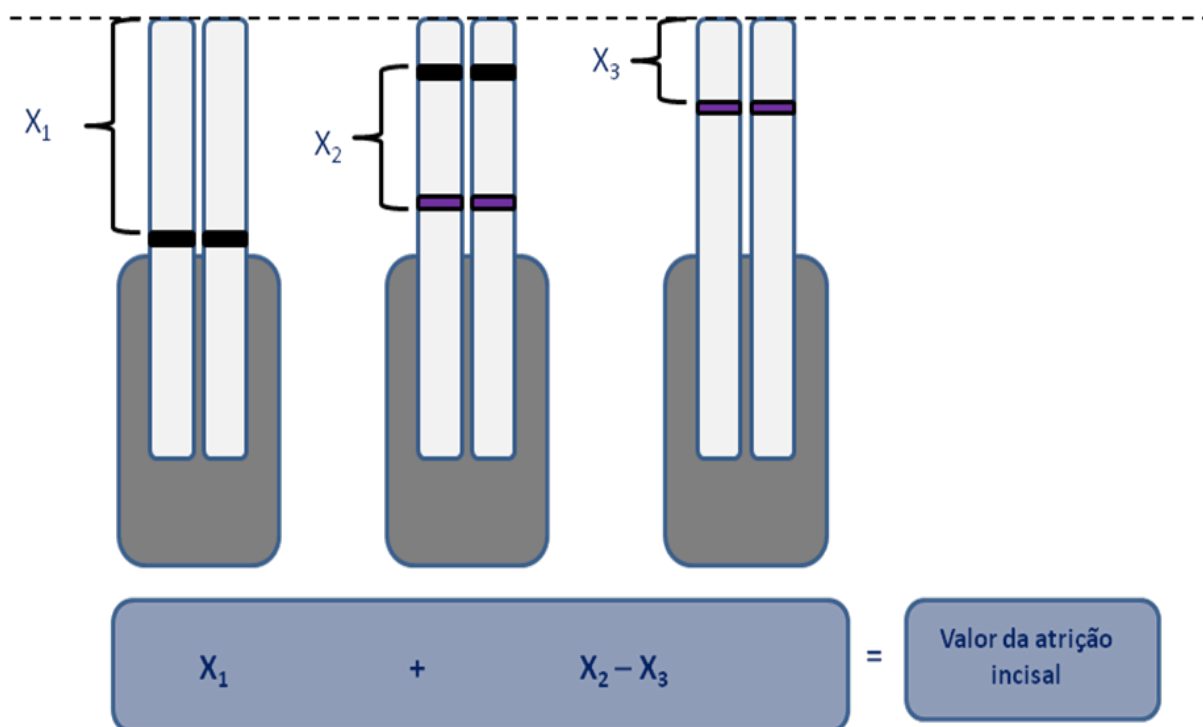


Imagem 1 – Esquema da medição da atrição incisal

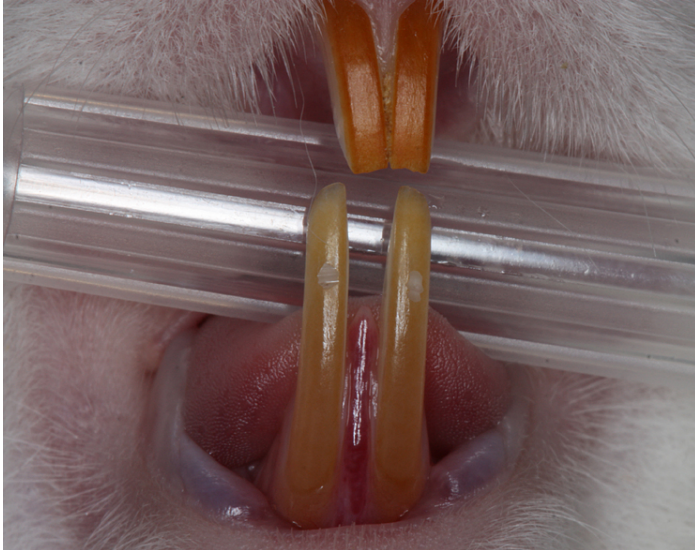


Imagem 2 – Marcas dentárias nos incisivos inferiores para avaliação da atrição

A d-anfetamina foi administrada por via intraperitoneal (i.p; Imagem 3), diariamente, entre as 9:00 e as 11:30 horas.³¹ Os animais foram transportados para o local onde foram manipulados 15 minutos antes de cada injeção (período de adaptação).³¹ As injeções seguiram um protocolo de habituação com doses sucessivamente crescentes (de 1,6mg/kg até 12,0mg/kg) durante 14 dias. A d-anfetamina foi injetada de acordo com o peso individual dos animais reavaliado diariamente. Os animais do GII foram administrados com soro diariamente e no mesmo período. Imediatamente após as injeções os ratos foram submetidos ao protocolo de stresse. Os animais do GI não foram injetados nem submetidos a indução de stresse.



Imagem 3 – Administração intraperitoneal de anfetamina

Agentes Stressores

Segundo alguns autores, a exposição repetida ao mesmo tipo de agentes stressores provoca nos animais a diminuição da resposta adrenal.³⁵⁻⁴⁰ De entre os vários agentes disponíveis, foram selecionados 5 protocolos de stresse: ruídos (urbanos, de espécies predadoras e uma mistura de ambos), stresse por aglomeração (crowding) e vibração corporal. Estes foram aplicados de forma intercalada durante os 14 dias da experiência, tendo em consideração que os animais apresentam a capacidade de adaptação fisiológica ao stresse induzido repetidamente pelo mesmo agente. Após as injeções intraperitoneais, os protocolos de stresse foram executados diariamente entre as 9:00 e as 11:30 horas,^{31,35} com a duração de 10 minutos, exceptuando a aglomeração que se prolongou por 12 horas.

Colheitas Sanguíneas

Nos dias 1, 7 e 14 do procedimento experimental, efetuaram-se 3 colheitas sanguíneas, entre as 9:00 e as 11:30 horas, com o intuito de avaliar as variações das concentrações séricas do cortisol e da creatinina-cinase (CK). Através da punção da veia da cauda do rato, colheram-se as amostras de sangue para um tubo tipo “ependdorf” não heparinizado. Foram colhidos cerca de 0,4ml de sangue, o qual foi mantido à temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos, permitindo a sua coagulação. Para obtenção do soro procedeu-se à centrifugação do sangue. O procedimento experimental foi realizado por técnicos qualificados do Laboratório de Análises Clínicas AVELAB (Forca, Aveiro), sob direção técnica do Dr. António Neves.

Determinação Da Gravidade Da Atividade Mastigatória Não Funcional

Para avaliar a gravidade dos MMNF, os ratos foram filmados durante 60 segundos a cada 5 minutos durante um período de 50 minutos após a injeção de solução salina ou d-anfetamina, de forma à observação e avaliação comportamental. As filmagens decorreram dentro das gaiolas de alojamento, transparentes, num local ao qual os ratos se encontravam previamente habituados/ambientados. Os registos do grupo de controlo foram realizados de igual forma. A intensidade dos MMNF foi classificada e avaliada segundo uma escala de comportamentos orais adaptada a partir daquela proposta por Gomez e colaboradores (1998) e descrita abaixo.³¹ Os movimentos orais não funcionais, como morder “gnawing ou biting”, bater “chattering”, ranger “gnashing” e raspar “scraping” os dentes nos blocos de mordida foram medidos e classificados numa escala de severidade de cinco pontos.³¹

Os registos de comportamento dos animais foram todos efetuados pelo mesmo observador, o qual desconhecia o grupo experimental a observar. O resultado diário do comportamento de cada animal foi conseguido pela soma dos resultados de cada período de observação (10 períodos de observação/dia).³¹



Imagem 4 – Blocos de madeira mole

Tabela I – 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 mole (Imagem 4) ou gaiola de forma persistente durante pelo menos 5 segundos
Pontos de Gravidade	
0 Ausência	Os ratos em repouso, não mostram movimentos de mordedura; ausência de gnawing/biting ou bruxismo experimental
1 Passear, lambar, grades	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	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 10 segundos)
3 11 a 20 segundos	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 30 segundos	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

No final da experiência, todos os animais sobreviventes, foram eutanasiados e necropsiados, segundo as normas em vigor. A eutanásia foi efetuada por overdose com associação de cetamina 50mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e cloropromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória) seguida de deslocamento cervical e exsanguinação por punção intra-cardíaca. Registou-se pormenorizadamente a informação relativa à observação macroscópica do hábito externo e do hábito interno. Foram colhidos, pesados e medidos os principais órgãos, sendo que neste estudo apenas foram utilizados os valores do baço, timo e glândulas supra-renais. Alguns fragmentos dos órgãos 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.

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

Análise Estatística

Procedeu-se à análise de dados, 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. Em 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. Relativamente às variáveis que cumpriam os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, aplicou-se o teste de hipótese de diferenças 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.

O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para calcular quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os pesos corporais totais inicial e final. Utilizou-se, o teste ANOVA de Friedman para comparar os valores médios de cortisol e da creatina-cinase ao longo dos 3 tempos medidos intra-grupos. Para avaliar amostras emparelhadas com mais de 2 repetições (neste caso 3 repetições), o teste ANOVA de Friedman ($p < 0.05$) é um dos testes frequentemente mais utilizado. Na mesma análise, o teste LSD de Fisher post-hoc foi usado nas comparações entre grupos.

A fim de avaliar diferenças entre os valores de peso do timo, baço, supra-renais e dos valores da atrição entre grupos recorreu-se também ao teste LSD.

A avaliação da variação dos comportamentos MMNF ao longo dos 14 dias de experiência para o mesmo grupo, foi efetuada com o teste de Wilcoxon (não paramétrico); entre grupos para os mesmos dias da experiência foram avaliados pelo teste LSD.

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

RESULTADOS

Os animais utilizados no presente estudo recuperaram normalmente dos procedimentos cirúrgicos após a realização das marcas dentárias e sobreviveram de forma saudável durante todo o período experimental, com exceção de um animal do grupo de controlo, que não sobreviveu ao procedimento de realização das marcas dentárias. Supõe-se que o animal não sobreviveu por reação ou mau procedimento técnico decorrentes da anestesia intraperitoneal. Nos animais sobreviventes, não se verificaram quaisquer complicações pós-operatórias.

Varição Do Peso Corporal

No gráfico 1 podem verificar-se as variações de peso dos animais durante o período experimental.

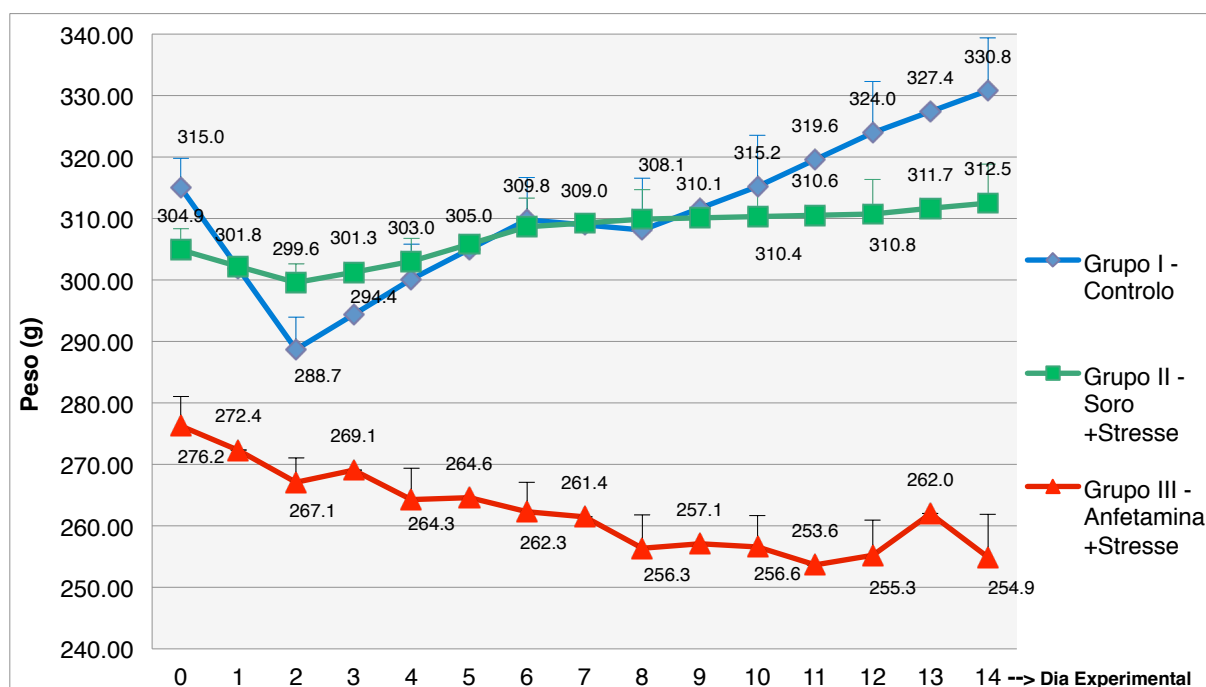


Gráfico 1 – Variação do peso dos animais ao longo do programa experimental

Verificou-se, em todos os grupos, uma diminuição de peso após o procedimento cirúrgico, nomeadamente a injeção de anestesia e realização das marcas dentárias, sendo que a inflexão desta tendência se iniciou ao 3º dia. Curiosamente, a queda de peso no grupo controlo avaliada ao 2º dia foi maior do que nos restantes grupos (sujeitos a stresse e a administrações i.p): GI (26.3+/-5.2g); GII (5.3+/-3.4g) e GIII (9.2+/-4.8g). Enquanto que os grupos GI e GII recuperaram de forma gradual o peso perdido, o GIII foi o único onde se observou uma diminuição de peso ao longo do período experimental. Adicionalmente, os animais do grupo controlo (GI) aumentaram significativamente de peso ao longo do período experimental, ao contrário do que aconteceu aos animais submetidos a stresse e injetados com soro (GII). De facto, a diferença do valor do peso do grupo GI-dia 0 ($M=315,00 \pm 14,4$; $SEM= 4,8$) em relação ao peso do dia 14 ($M=330,8 \pm 25,7$; $SEM=8,6$) corresponde a uma diferença estatisticamente significativa $t(8)=-3,241$; $p=0,012$ (teste de Kruskal Wallis). Já para o grupo GII a variação de peso não é estatisticamente significativa $t(9)=-1,606$; $p=0,143$ (teste de

Kruskal Wallis) considerando o Peso_GII_0 (M= 304.9±10.8; SEM=3.4) relativamente ao Peso_GII_14 (M= 312.5 ± 20.1; SEM= 6.4). Pelo contrário, no GIII observou-se uma diminuição gradual do peso ao longo do período de experimentação, variação essa estatisticamente significativa, apresentado uma diferença negativa (perda de peso), grupo III (-21.3±16.4g) em que $t(9)=4.094$; $p=0.03$ (teste de Kruskal Wallis).

Variações De Peso Do Timo, Baço E Supra-Renais

No gráfico 2 estão representadas as variações dos valores da razão (peso do timo/peso total) e (peso do baço/peso total).

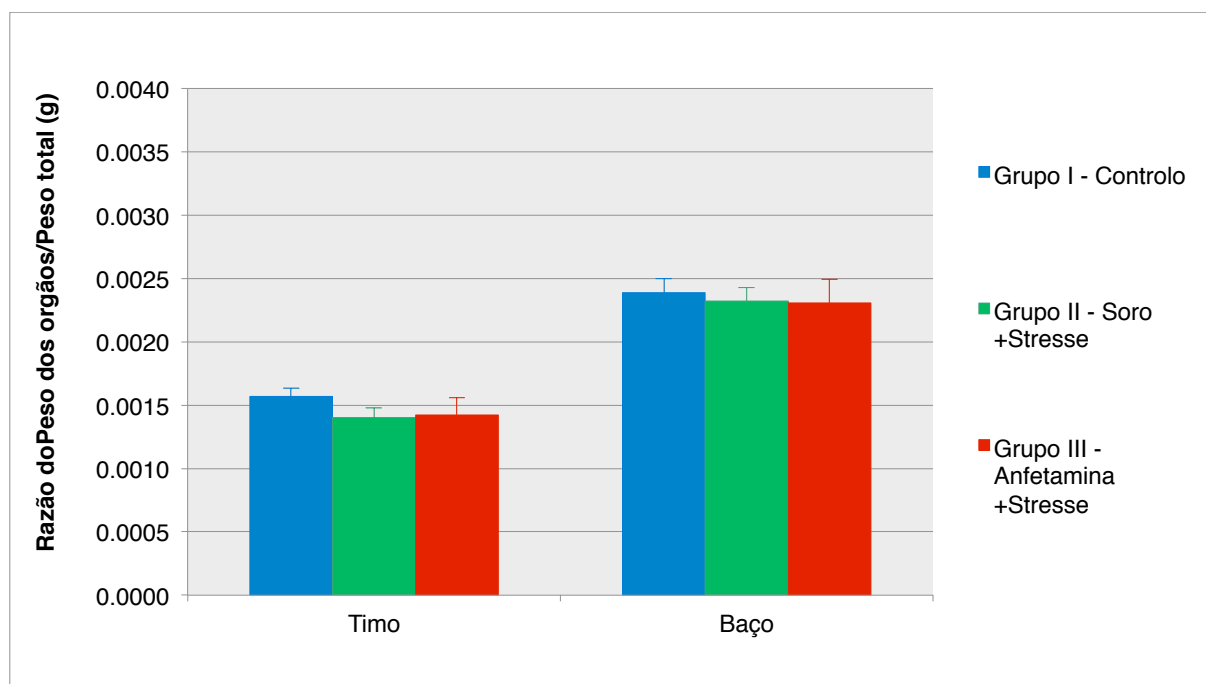


Gráfico 2 – Variação dos valores da razão (peso do timo/peso total) e (peso do baço/peso total) em função dos grupos.

Pode observar-se que em relação à razão do peso timo/peso total que o GI apresenta o valor mais elevado de todos os grupos GI (0.0016±0.007g), GII (0.0014±0.007g) e GIII (0.0014±0.0001g).

Relativamente à razão Peso Baço/Peso Total pode mais uma vez verificar-se que o GI apresenta o valor mais elevado de todos os grupos GI (0.0020±0.0001g), GII (0.0023±0.0001) e GIII (0.0023±0.0001g). No entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GII e GIII relativamente ao GI para o timo e baço ($p>0.05$; Teste LSD).

No gráfico 3 encontra-se demonstrado a variação dos valores da razão (peso das supra-renais/peso total)x1000.

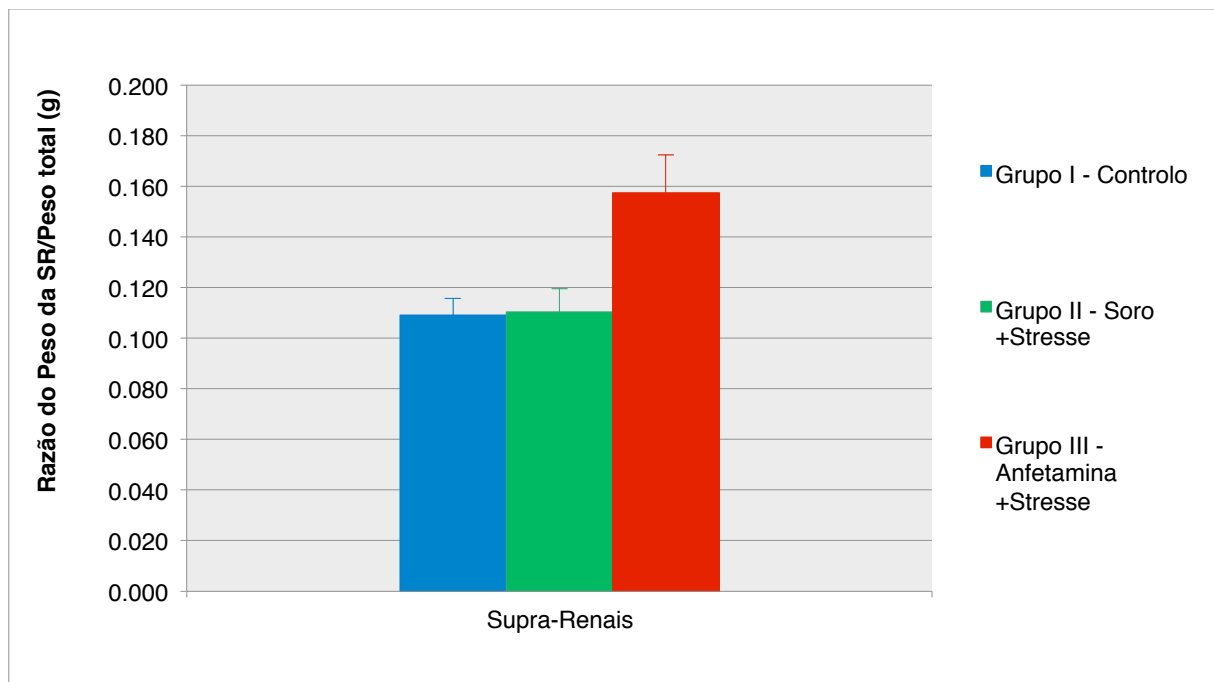


Gráfico 3 – Variação dos valores da razão (peso supra-renais/peso total)x1000 em função dos grupos

Em relação à razão peso das (supra-renais/peso total)x1000 pode verificar-se que o GI apresenta o valor mais baixo de todos os grupos ($0.109 \pm 0.007g$), enquanto que GII ($0.110 \pm 0.009g$) e GIII ($0.157 \pm 0.014g$).

O GIII é estatisticamente diferente dos grupos GI e GII ($p < 0.008$; Teste LSD). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GI e GII ($p > 0.05$; Teste LSD).

Avaliação Do Comportamento MMNF

No gráfico 4 é possível avaliar as alterações no comportamento MMNF dos animais dos três grupos experimentais ao longo do tempo.

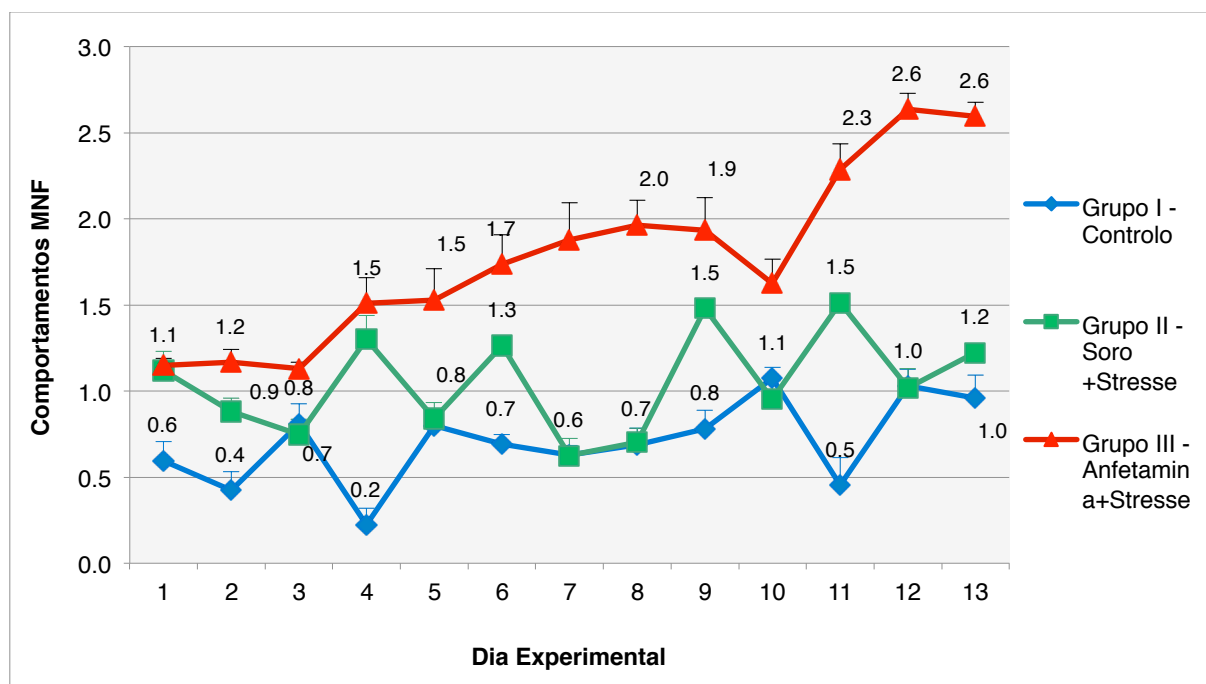


Gráfico 4 – Variação dos valores comportamentais em função dos grupos

Comparando os valores iniciais e finais (dia 1 e 13) para os três grupos, verificamos que as variações no GI e GII não são estatisticamente significativas ($p > 0.05$, Teste de Wilcoxon). No entanto, pode afirmar-se que há aumentos estatisticamente significativos no GII em comparação com o GI, nos dias 4, 6, 9 e 11 ($p < 0.05$, Teste de LSD de Fischer). É interessante constatar que os animais foram submetidos a crowding ou vibração corporal nestes dias. Os valores resultantes desta experiência estão de acordo com outros estudos, nos quais é mostrado que estes protocolos são os que promovem maior stresse.^{31,41}

Por outro lado, a variação decorrida entre os dias 1 e 13, é estatisticamente significativa nos animais submetidos à combinação anfetamina+stresse (GIII) ($p = 0.02$, Teste de Wilcoxon). Adicionalmente, este grupo apresenta em média um comportamento MMNF globalmente maior do que o apresentado pelos grupos GI e GII ($p < 0.05$; Teste de LSD de Fischer).

Avaliação da Atrição Dentária

No gráfico 5 estão representados os resultados da medição da atrição incisal com os valores expressos em milímetros (mm).

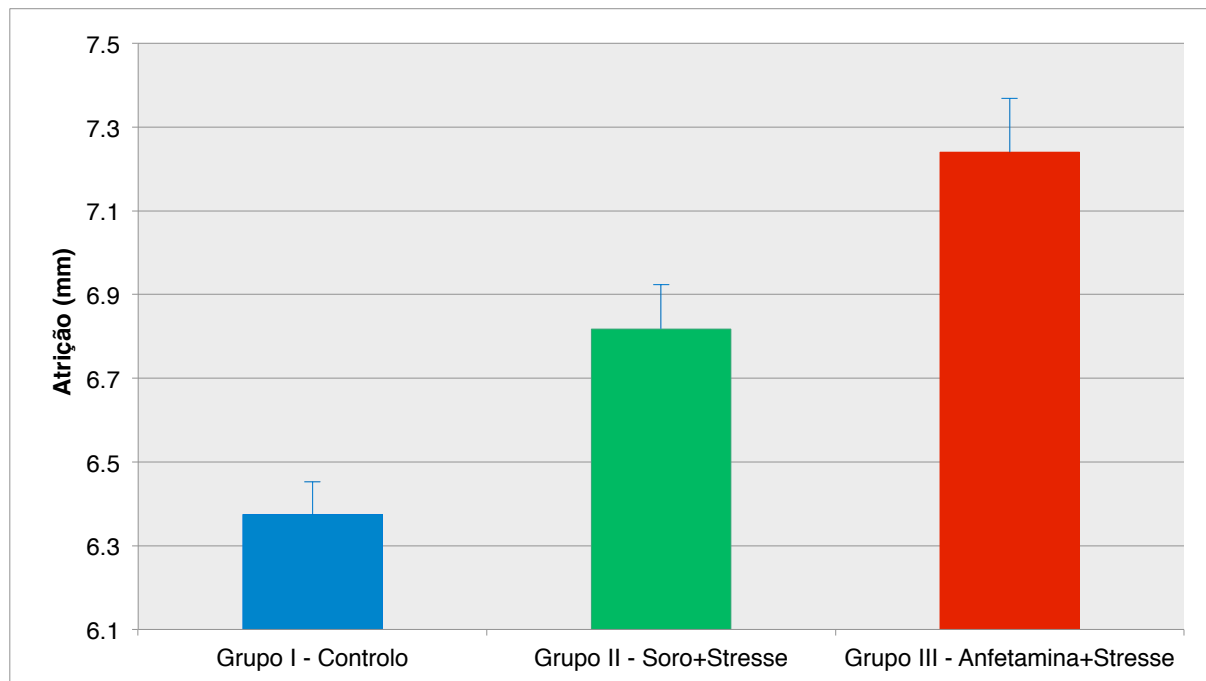


Gráfico 5 – Variação dos valores de atrição em função dos grupos

O stresse produziu um aumento estatisticamente significativo na atrição dentária nos animais do GII em comparação com o GI: Grupos GII ($6.8 \pm 0.3 \text{mm}$) vs. GI ($6.4 \pm 0.2 \text{mm}$); $p < 0.009$; teste de LSD, Adicionalmente, a atrição produzida pela anfetamina + stresse é significativamente superior à verificada nos animais só submetidos a stresse: GIII ($7.2 \pm 0.4 \text{mm}$); $p < 0.009$; teste de LSD; sugerindo que este psicoestimulante potenciou o efeito do stresse neste parâmetro.

Curiosamente a diferença média entre os grupos GI e o GII (0.4436mm) é maior que a diferença entre os grupos GII e GIII (0.4225mm) sugerindo que o stresse poderá ter um efeito isolado na atrição superior ao da anfetamina.

Variação da Concentração Sérica do Cortisol

O gráfico 6 representa a variação da concentração sérica de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) ao longo do período experimental para os 3 grupos em estudo.

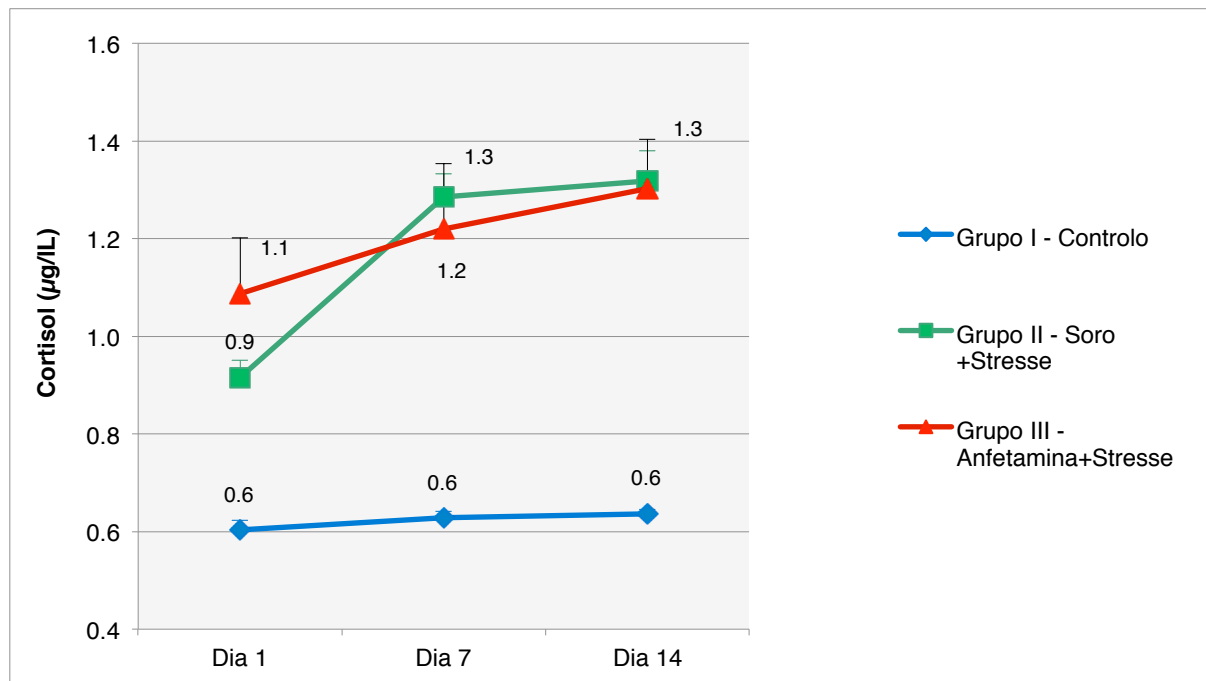


Gráfico 6 – Concentração sérica do cortisol nos dias 1 (análise 1), 7 (análise 2) e 14 (análise 3)

No primeiro dia de análise (dia 1), os valores de cortisol para o GIII são significativamente superiores aos valores do GI ($p=0.000$; Teste LSD), mas não relativamente ao GII ($p=0.518$; Teste LSD). 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 GI, estes aumentaram no dia 7 no GII, mantendo-se estáveis até ao fim da experiência. Por outro lado, os valores de cortisol para o GIII 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 os grupos GI ($p=0.244$; Teste Anova de Friedman) e GIII ($p=0.078$; Teste Anova de Friedman). Já para o GII a diferença obtida entre as Análises 1 e 3 revelou-se significativa ($p=0.002$; Teste Anova de Friedman).

Variação da Concentração Sérica da Creatina-Cinase

O gráfico 7 representa a variação da concentração sérica creatina-cinase (U/L) ao longo do período experimental para os 3 grupos em estudo.

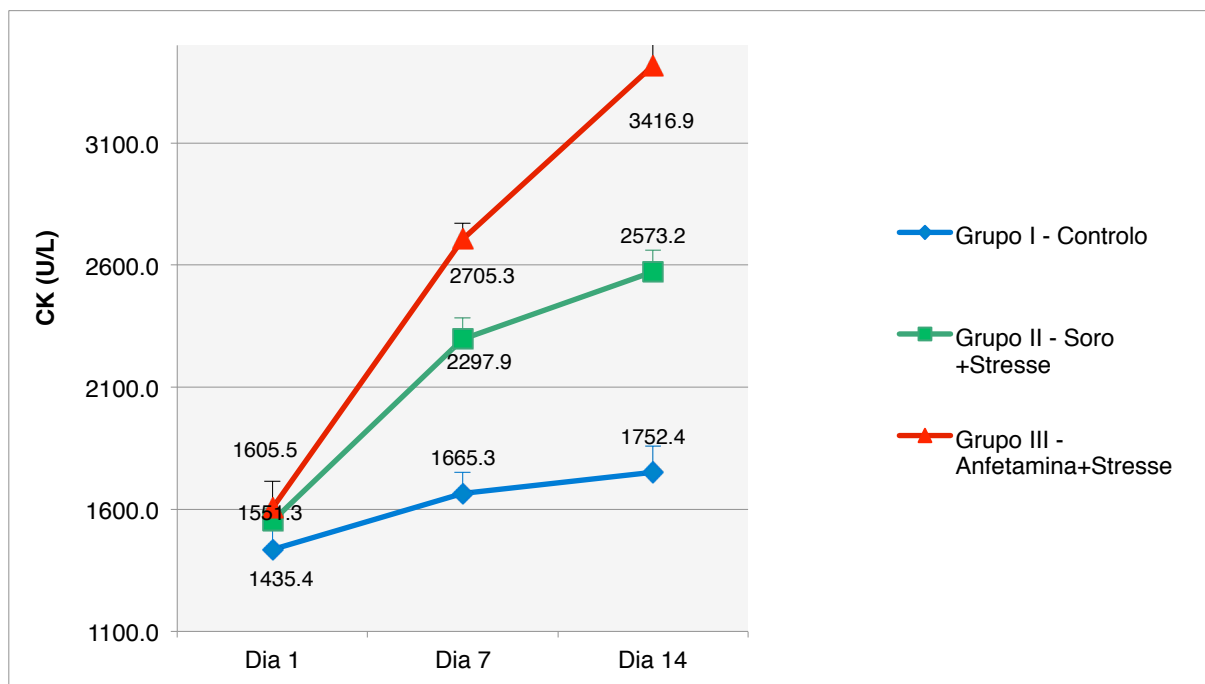


Gráfico 7 – Concentração sérica da CK nos dias 1 (análise 1), 7 (análise 2) e 14 (análise 3)

No primeiro tempo em análise não há diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$ teste LSD de Fisher),

Os valores da CK nos grupos GII e GIII são significativamente superiores aos valores do GI nas análises subsequentes, aumentando ao longo do tempo, sendo sempre estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$; Teste LSD). Adicionalmente, a anfetamina potencia a ação do stresse nos tempos 7 e 14.

Enquanto que os valores do dia 14 são significativamente maiores relativamente aos valores do dia 1 nos grupos GII e GIII ($p = 0,000$, teste Anova de Friedman), tal não acontece no GI ($p = 0,057$, teste Anova de Friedman).

DISCUSSÃO

O presente estudo experimental faz parte integrante de um amplo trabalho sobre movimentos mastigatórios não funcionais (MMNF), a decorrer no Instituto de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

O bruxismo é amplamente aceite como sendo um hábito oral parafuncional, caracterizado pelo apertamento e ranger dos dentes,^{19,41} resultando em desgaste excessivo dos mesmos. A sua relação com as disfunções da articulação temporomandibular (DTM) é ainda um facto controverso na literatura.⁴² Na sua etiologia parecem estar envolvidas interferências oclusais²³ e stresse emocional e/ou psicológico,^{41,43,44} como a ansiedade e a tensão.²⁴ Com efeito, tal como acontece com as DTM e outras parafunções, também o bruxismo parece estar relacionado com sintomas de stresse.⁴⁴ Apesar da relação stresse-bruxismo permanecer muito discutida na comunidade científica o bruxismo é cada vez mais considerado, na literatura, como sendo uma resposta física ao stresse.⁴⁵

Por outro lado, o consumo de anfetamina e seus análogos tem sido associado a bruxismo, reforçando a hipótese da etiologia central.

De forma a entender o envolvimento do stresse nos MMNF e bruxismo, têm sido desenvolvidas experiências em modelos animais, procurando simular situações semelhantes às que ocorrem no Homem.^{31,46} Por exemplo, diversos estudos referem formas laboratoriais de induzir stresse psicossocial, tais como imobilização, ambiente frio, inalação de vapores de éter, ruídos,^{31,35} caixa de comunicação,^{13,17,47} apertar a cauda, privação de água, entre outros.^{15,31,48} Para o presente procedimento experimental, submetem-se ratos Wistar a vibração corporal, três protocolos de ruídos (predadores, urbanos e mistos) e a aglomeração. Esta seleção foi feita com o intuito de induzir stresse sociopsicológico e físico de modo a reproduzir algumas condições que reproduzem o bruxismo no Homem. Adicionalmente, para além destes agentes stressores, os animais foram submetidos a doses crescentes de anfetamina durante 14 dias para reproduzir um protocolo de sensibilização a ATS.

Comportamento MMNF

Entre os comportamentos mais comuns provocados por ATS em roedores podem destacar-se o aumento de comportamentos locomotores espontâneos e comportamentos estereotipados.^{3,4} Paralelamente, os MMNF são respostas típicas de roedores a condições de stresse.

No presente estudo, globalmente, o GIII apresenta em média um comportamento de MMNF superior ao apresentado pelos restantes grupos. Isto é consistente com a elevada contribuição do aumento da atividade locomotora bem como dos movimentos estereotipados provocados pela administração crónica de anfetamina para este comportamento. De acordo com a literatura, os animais do GII apresentaram picos de MMNF nos dias em que foram submetidos a *crowding* ou vibração corporal.^{31,41}

O valor mais elevado de MMNF dos grupos GII e GIII relativamente ao GI é consistente com a maior atrição dentária observada nestes grupos.

A electromiografia (EMG),⁴⁹⁻⁵² é outro método para avaliar movimentos mastigatórios não funcionais em modelos animais, contudo visto ser um método dispendioso, um potencial indutor de stresse e de complicações infecciosas, não foi utilizado.⁵²

Peso Corporal, Timo, Baço E Supra-Renais

O peso total dos animais, bem como a avaliação individualizada do peso dos órgãos (timo, baço e supra-renais), são indicadores úteis na avaliação do stresse crónico.^{35,49,56,57}

No início da experiência, dia 0, o GI (315.0±14.4g) apresentava valores de pesagens superiores aos do GII (304.9±10,9g) e GIII (276.2±15.2g), sendo a diferença estatisticamente significativa entre GI e GIII ($p=0.00$; 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 GI. Esta diminuição poder-se-á dever à mudança do meio em que os animais estavam inseridos, bem como à manipulação experimental efetuada pela primeira vez (colheita de sangue, administração de agentes anestésicos e realização das marcas incisais). Segundo Connell (1966), esta perda de peso poderá ser explicada por um estado agudo de ansiedade.⁵

Após o segundo dia e até ao último dia experimental, os animais dos grupos GI e GII recuperaram gradual e individualmente de peso, relativamente à fase inicial do estudo (diferença entre dias 0 e 14). No entanto, os animais do GI aumentaram de peso, enquanto que tal não se verificou nos do GII. 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. Pelo contrário, no GIII observou-se uma diminuição do peso geral e gradual ao longo do período de experimentação, estatisticamente significativa, apresentando uma diferença negativa (perda de peso), GIII (-21.3±16.4g). A perda de peso no GIII parece ser potenciada pela administração de d-anfetamina, tendo um estudo de Jones (1992) mostrado resultados semelhantes.⁵⁸ Segundo este mesmo autor e 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.⁵⁹⁻⁶¹ Em consequência da restrição alimentar e do aumento de tensão, pode observar-se rabdomiólise, que leva à contração muscular (bruxismo, apertamento dos maxilares e constante inquietude de movimentos) e até mesmo à necrose muscular.^{62,63} Ocorre ainda uma substituição de tecido muscular funcional por tecido conjuntivo, refletindo-se na perda de peso corporal.⁶³

Em relação à avaliação *post-mortem* do peso dos órgãos timo e baço, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos ($p > 0.05$; Teste LSD). No entanto, nem todos os estudos realizados por outros autores obtiveram resultados concordantes, Marsh (1960) observou uma diminuição significativa no peso destes órgãos.^{49, 57} Já Ishikawa (1995) e Rosales (2002) não observaram alterações estatisticamente significativas no peso corporal nem no peso individual dos órgãos.^{35,41} Ao contrário do peso total, a razão de não existirem diferenças significativas no peso dos órgãos individuais pode dever-se ao facto do efeito do stresse emocional induzido não ter sido suficientemente forte para produzir uma diminuição de peso destes órgãos.^{42,54} O mesmo acontece relativamente às supra-renais dos grupos GI e GII, visto não apresentarem diferenças ($p > 0.05$; Teste LSD). No entanto, a anfetamina demonstra o seu efeito na ansiedade, uma vez que o GIII mostrou-se diferente de GI e GII ($p < 0.008$; Teste LSD). Tal como referido no estudo de Ishikawa (1995), o stresse induz hipertrofia adrenal.³⁵

Cortisol

O aumento dos níveis de cortisol tem sido descrito, em vários estudos, como resposta à presença de stresse⁴⁵ e ao consumo de ATS.^{63,64}

Para a realização de medições do cortisol podem ser recolhidas amostras salivares^{65,66} ou serológicas.⁶⁶ Uma vez que em animais existe dificuldade acrescida na recolha de quantidade suficiente de saliva,⁶⁸ optou-se por recolher amostras sanguíneas de modo a determinar as variações na concentração de cortisol plasmático, após a indução de stresse por métodos físicos e/ou administração 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.⁶⁷ Após a indução do presente protocolo experimental, procedeu-se à recolha entre as 9:00 e as 11:00 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. A primeira análise, dia 1, mostrou valores superiores para os grupos GII (0.91 $\mu\text{g/dL}$) e GIII (1.087 $\mu\text{g/dL}$) comparativamente ao GI (0.60 $\mu\text{g/dL}$), sendo estas diferenças estatisticamente significantes apenas entre GI vs GII ($p = 0.02$; Teste LSD) e GI vs GIII ($p = 0.000$; Teste LSD) mas não entre GII vs GIII ($p = 0.518$; Teste LSD).

Uma das possíveis justificações para o facto de os valores terem sido estatisticamente significativos entre o GI e os grupos GII e GIII logo na primeira análise é o facto de a colheita, nos grupos GII e GIII, ter sido realizada após a indução de stresse e indução de stresse + d-anfetamina i.p. respetivamente, tendo havido logo uma elevação significativa e imediata da concentração sérica do cortisol. Como a colheita no GI não foi precedida de qualquer tipo de manipulação experimental, os valores do cortisol não se encontravam elevados, ao contrário do que aconteceu no GII.

Após a primeira semana de indução de stresse houve um aumento consistente de cortisol nos grupos GII e GIII, relativamente ao GI. Aquando da realização da análise 2, dia 7, verificou-se um aumento considerável nos valores de GII e GIII, com exceção para o GI que manteve valores relativamente constantes durante toda a experiência. Após realização da análise 3, dia 14, foram obtidas alterações de valor muito semelhantes às da análise anterior.

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.^{35,68}

Vários estudos apoiam que o stresse⁶⁵ e a anfetamina promovem um aumento significativo do cortisol.^{63,64,65} 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 (GIII). O aumento dos movimentos MMNF induzidos pela anfetamina pode ser uma estratégia para lidar com o stresse, atenuando conseqüentemente a libertação de maiores quantidades de cortisol. A avaliação de um grupo experimental apenas com administração de anfetamina seria útil para confirmar o impacto da anfetamina neste parâmetro.

Todos os procedimentos foram sujeitos a monitorização, padronização e controlo experimental a nível de cuidados sanitários, e da garantia de fornecimento de nutrientes na ração, excluindo quaisquer factor externo que pudesse estimular a libertação de cortisol.

Creatina-Cinase

Estudos de Landgren, Weiner e Sitthisomwong mostraram que pode verificar-se um aumento da atividade do músculo masséter em animais que apresentam bruxismo⁴¹ (modelos com roedores foram considerados bons para este efeito uma vez que a sua fisiologia e adaptação estão bem estudadas). No presente estudo avaliou-se a atividade muscular através da medição da variação da concentração sérica de CK, ao longo do tempo experimental.

O presente estudo demonstra que a anfetamina potencia o aumento dos valores de CK produzidos pelo stresse físico. Por um lado estes resultados são consistentes com o estudo de Matte (1975), que mostrou que a indução de stresse resulta num aumento da atividade da CK.⁶⁹ Por outro lado, os resultados obtidos no GIII podem ser atribuídos ao uso de anfetamina que leva à existência de aumento de atividade locomotora,^{3,70} espasmos musculares e rbdomiólise tal como sugerido por outros autores.^{71,72} Adicionalmente, lesões diretas no tecido muscular (contrações excêntricas, injeções intramusculares, isquémia ou esforço excessivo) levam ao aumento da concentração de CK no soro.⁷³⁻⁷⁵

Segundo a análise de resultados, na primeira amostra não existem diferenças significativas entre grupos ($p > 0.05$; Teste LSD de Fisher), podendo dever-se ao facto de os valores da CK apenas se encontrarem elevados algumas horas após o dano muscular.⁷⁶

Conclusões

O stresse promove alterações de comportamento MMNF e na atrição, no aumento da CK, sendo a ATS 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.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a expressão de MMNF atenua a ativação do eixo hipófise-hipotálamo-suprarrenal.

Caracterizar a etiologia do bruxismo é essencial para um cuidado integrador dos abusadores de ATS. Apesar de não se poder aplicar diretamente os resultados de experiências animais em humanos, são proveitosos para extrapolar hipóteses para futuras investigações no Homem

Agradecimentos

Ao Senhor Professor Doutor Frederico Pereira, meu Orientador, pelo apoio, sabedoria e disponibilidade, no decurso da elaboração de todo este trabalho experimental.

Ao Dr.º Júlio Fonseca, meu Co-Orientador, pela incansável orientação, dedicação, empenho, apoio e amizade.

À Dr.ª Diana Gonçalves e à Dr.ª Liliana Santos pela disponibilidade e preciosa ajuda na elaboração desta experiência.

À Área da Medicina Dentária e à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por serem os pilares da minha formação que agora culmina.

Ao Departamento de Patologia Experimental e ao Senhor Professor Doutor Silvério Cabrita que tornaram possível a realização desta experiência.

Referências Bibliográficas

1. Greene SL, Kerr F, Braitberg G. Review article: amphetamines and related drugs of abuse. *Emergency medicine Australasia* : EMA 2008;20(5):391-402.
2. 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.
3. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1993;33:639-77.
4. 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.
5. Connell P. Clinical Manifestations and Treatment of Amphetamine Type of Dependence. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1966;196(8):718-23.
6. 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.
7. 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.
8. 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. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 2007;43(1):110-5.
9. Crime UNOoDa. Vienna: UNODC; 2009.
10. 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.
11. Fan X, Hess EJ. D2-like dopamine receptors mediate the response to amphetamine in a mouse model of ADHD. *Neurobiology of disease* 2007;26(1):201-11.
12. 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.
13. Yamamoto BK, Moszczynska A, Gudelsky GA. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1187:101-21.
14. Baylen CA, Rosenberg H. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction* 2006;101(7):933-47.
15. 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.
16. Lobbezoo F, Naeije M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. *J Oral Rehabil* 2001;28(12):1085-91.
17. 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.
18. Jankelson B. Physiology of human dental occlusion. *J Am Dent Assoc* 1955;50(6):664-80.
19. Ramfjord SP. Bruxism, a clinical and electromyographic study. *J Am Dent Assoc* 1961;62:21-44.
20. Egermark-Eriksson I. Malocclusion and some functional recordings of the masticatory system in Swedish schoolchildren. *Swed Dent J* 1982;6(1):9-20.
21. 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.
22. 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.
23. Manfredini D, Lobbezoo F. Role of psychosocial factors in the etiology of bruxism. *J Orofac Pain* 2009;23(2):153-66.
24. Lavigne GJ, Kato T, Kolta A, Sessle BJ. Neurobiological mechanisms involved in sleep bruxism. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):30-46.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. Restrepo C, Gomez S, Manrique R. Treatment of bruxism in children: a systematic review. *Quintessence Int* 2009;40(10):849-55.
29. Koyano K, Tsukiyama Y, Ichiki R, Kuwata T. Assessment of bruxism in the clinic. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):495-508.
30. Newton RS, Buchanan JR, Scudder JM, Scudder JK, Felter HW, Nellans BH, et al. *The Eclectic medical journal*. Cincinnati, Ohio,: The Eclectic institute publishing company; etc., etc.; 1836.
31. 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.
32. Amir I, Hermesh H, Gavish A. Bruxism secondary to antipsychotic drug exposure: a positive response to propranolol. *Clinical neuropharmacology* 1997;20(1):86-9.
33. See SJ, Tan EK. Severe amphetamine-induced bruxism: treatment with botulinum toxin. *Acta neurologica Scandinavica* 2003;107(2):161-3.
34. 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.
35. 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.
36. Adamson ED. Isoenzyme transitions of creatine phosphokinase, aldolase and phosphoglycerate mutase in differentiating mouse cells. *J Embryol Exp Morphol* 1976;35(2):355-67.
37. 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.
38. Kato R. Effects of starvation and refeeding on the oxidation of drugs by liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1967;16(5):871-81.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Rugh JD, Harlan J. Nocturnal bruxism and temporomandibular disorders. *Adv Neurol* 1988;49:329-41.
43. Rugh JD, Solberg WK. Psychological implications in temporomandibular pain and dysfunction. *Oral sciences reviews* 1976;7:3-30.
44. Lavigne GJ, Khoury S, Abe S, Yamaguchi T, Raphael K. Bruxism physiology and pathology: an overview for clinicians. *J Oral Rehabil* 2008;35(7):476-94.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Gomez FM, Ortega JE, Horrillo I, Meana JJ. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. *Journal of oral rehabilitation* 2010;37(11):827-33.
49. 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.
50. 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.

51. Shoji YN, Bruce IC, Siu LY. Electromyographic assessment of non-functional masseter muscle in an awake animal model. *Cranio* 1994;12(2):110-3.
52. 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.
53. 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. *Journal of dental research* 1967;46(3):527-31.
54. 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.
55. Ernst AM. Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia* 1967;10(4):316-23.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Jones JR, Caul WF, Hill JO. The effects of amphetamine on body weight and energy expenditure. *Physiology & behavior* 1992;51(3):607-11.
60. Ioannides-Demos LL, Proietto J, McNeil JJ. Pharmacotherapy for obesity. *Drugs* 2005;65(10):1391-418.
61. 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.
62. Kalant H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2001;165(7):917-28.
63. Duarte JA, Carvalho F, Natsis K, Remiao F, Bastos ML, Soares JMC, 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.
64. de Wit H, Enggasser JL, Richards JB. Acute administration of d-amphetamine decreases impulsivity in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2002;27(5):813-25.
65. 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.
66. Duplessis C, Rascona D, Cullum M, Yeung E. Salivary and free serum cortisol evaluation. *Mil Med* 2010;175(5):340-6.
67. Guyton AC. *TextBook of Medical Physiology* 10 ed ed: GUANABARA KOOGAN; 2002.
68. 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.
69. Matte AC. Effect of isolation induced aggression in mice on serum creatine kinase. *Psychopharmacologia* 1975;42(2):209-10.
70. 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).
71. Chan P, Chen JH, Lee MH, Deng JF. Fatal and nonfatal methamphetamine intoxication in the intensive care unit. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* 1994;32(2):147-55.
72. Richards JR, Johnson EB, Stark RW, Derlet RW. Methamphetamine abuse and rhabdomyolysis in the ED: a 5-year study. *The American journal of emergency medicine* 1999;17(7):681-5.
73. Fitzpatrick LR. Masseter muscle rigidity, elevated creatine kinase, and rhabdomyolysis following succinylcholine administration: a case report. *AANA J* 2008;76(5):349-54.
74. Gutenbrunner C. Circadian variations of the serum creatine kinase level--a masking effect? *Chronobiol Int* 2000;17(4):583-90.

75. 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.
76. Hutchins MO, Skjonsby HS. Microtrauma to rat superficial masseter muscles following lengthening contractions. J Dent Res 1990;69(9):1580-5

