



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**SARAH SANDERS SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA, NOCICEPÇÃO  
ASSOCIADA E PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO  
COMPORTAMENTO BRUXISMO-SÍMILE EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2015**

SARAH SANDERS SILVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA, NOCICEPÇÃO  
ASSOCIADA E PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO  
COMPORTAMENTO BRUXISMO-SÍMILE EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Lima Vale

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- S586a Silveira, Sarah Sanders.  
Avaliação da atividade muscular mastigatória, nocicepção associada e participação do sistema endocanabinoide no comportamento bruxismo-símile em ratos / Sarah Sanders Silveira. – 2015.  
109 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
1. Bruxismo. 2. Estresse Psicológico. 3. Nociceptividade. I. Título.

---

CDD 617.6061

SARAH SANDERS SILVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA, NOCICEPÇÃO  
ASSOCIADA E PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO  
COMPORTAMENTO BRUXISMO-SÍMILE EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Lima Vale (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Leal Dantas Lobo  
Universidade Federal do Ceará - Sobral

*“Pois o Senhor é bom; o seu amor dura para sempre, e a sua fidelidade não tem fim.”*

Salmos 100:5

*À Deus, pelas graças alcançadas e  
proteção em todos os momentos da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

As meus pais, Rita e Evandro, minhas referências na vida, pelo apoio, carinho e amor incondicional em todas as horas.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Lima Vale, minha orientadora, por aceitar me orientar e confiar no meu trabalho. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados e pelas horas de orientação e dedicação a este trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Delane Viana Gondim, por todas as contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho, desde a idealização do projeto de pesquisa até as colaborações no exame de qualificação. Você acrescentou valores científicos e pessoais na minha formação.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, pela ajuda ímpar no estabelecimento do modelo experimental. Obrigada por todas as horas dedicadas a elaboração dos recursos utilizados, além dos momentos de discussões científicas importantes, de forma sempre muito divertida.

Ao Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale (In memoriam), pelas contribuições físicas e científicas.

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia, pelos conhecimentos compartilhados. Em especial, a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Geanne Matos de Andrade, pela disponibilidade e contribuições no exame de qualificação.

A Central Analítica e o Laboratório de Patologia, pelas contribuições físicas.

Aos amigos e colegas do ‘Lafica de baixo’, pela divertida convivência, pelo apoio e amizade ao longo desse período do mestrado.

A aluna de iniciação científica, Jéssica Jamille, pela ajuda na realização dos experimentos. Sua participação foi essencial para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos Bruno, Mário e Fábio, por toda ajuda durante os experimentos e pelo apoio durante esse período. O companheirismo de vocês foi fundamental.

Ao CNPq e Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP) pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O aumento da atividade muscular mastigatória é considerado uma resposta física de mudanças no estado emocional. O estresse e a ansiedade aumentam a atividade mioelétrica dos músculos do sistema estomatognático, com resultante aumento das parafunções, como apertamento dos dentes. O bruxismo é uma atividade parafuncional diurna ou noturna, incluindo apertamento ou ranger os dentes. Tem forte associação com a dor miofascial mastigatória, uma dor facial crônica dos músculos mastigatórios com possível bloqueio e limitação da abertura de boca. O sistema endocanabinoide é composto pelos receptores canabinoides, pelos ligantes endógenos (endocanabinoides) e proteínas responsáveis pelo seu metabolismo. Os endocanabinoides estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas, como imunomodulação, inflamação e analgesia. A ação antinociceptiva dos canabinoides tem sido demonstrada em vários modelos experimentais de dor, porém, não há relatos na literatura do envolvimento dos canabinoides na nocicepção associada à hiperatividade muscular em situações de hábitos parafuncionais. O objetivo da presente pesquisa foi estudar a atividade muscular mastigatória e a nocicepção associada em modelo de estresse emocional em ratos e o envolvimento do sistema endocanabinoide. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (nº 35/13). A caixa de comunicação foi utilizada como instrumento de estímulo do estresse emocional, durante 14 dias. Foram implantados eletrodos subcutâneos na região dos músculos masseter e temporal para avaliar a atividade muscular mastigatória e realizado teste de hipernocicepção mecânica nos referidos músculos durante o estímulo do estresse emocional. Foram avaliados também parâmetros de comportamento de ansiedade, peso corporal, peso bruto das glândulas adrenais e expressão de c-Fos e receptores canabinoides CB1 e CB2 no gânglio trigeminal e trato espinhal trigeminal. Foi administrado um antagonista canabinoide CB1 e avaliado o comportamento nociceptivo. A expressão dos receptores canabinoides no músculo masseter também foi avaliada. Os resultados demonstraram um aumento significativo da atividade muscular mastigatória nos animais estressados no sétimo dia de estímulo do estresse emocional. Observou-se uma redução significativa do limiar nociceptivo dos músculos mastigatórios, com pico no décimo primeiro dia do estresse emocional. Os animais estressados apresentaram comportamento de ansiedade, sem diferenças no peso corporal e no peso bruto das glândulas adrenais. Os resultados demonstraram ainda que os animais estressados apresentaram acúmulo de vacúolos citoplasmáticos no córtex das glândulas adrenais, e expressão aumentada de c-Fos e receptores CB1 e CB2 no gânglio trigeminal e trato espinhal trigeminal. A administração do antagonista CB1 intensificou a nocicepção no quarto dia de estresse emocional. Os receptores canabinoides CB1 e CB2 apresentam expressão aumentada no músculo masseter dos animais estressados. Os dados sugerem que animais expostos ao estresse emocional apresentaram atividade muscular mastigatória aumentada e comportamento bruxismo-símile, com redução nos limiares nociceptivos dos músculos mastigatórios. O sistema endocanabinoide parece estar envolvido na modulação da nocicepção induzida por estresse emocional com aumento da expressão dos receptores CB1 e CB2 nos gânglios trigeminiais, no trato espinhal do trigêmeo e no músculo masseter.

**Palavras-chave:** Bruxismo. Estresse emocional. Nocicepção. Sistema Endocanabinoide.

## ABSTRACT

### EVALUATION MASTICATORY MUSCLE ACTIVITY, NOCICEPTION ASSOCIATED AND PARTICIPATION OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM IN BRUX-LIKE BEHAVIOR IN RATS

The increased masticatory muscle activity is considered a physical response to changes in emotional state. Stress and anxiety increase the myoelectric activity of the stomatognathic system muscles, with resulting parafunctions increase, as teeth clenching. Bruxism is a diurnal or nocturnal parafunctional activity including clenching or teeth grinding. Bruxism is strongly associated with the masticatory myofascial pain, a chronic facial pain of the masticatory muscles with possible blockage and limited mouth opening. The endocannabinoid system consists of cannabinoid receptors by the endogenous ligands (endocannabinoids) and proteins responsible for its metabolism. Endocannabinoids are involved in different physiological and pathological functions. The antinociceptive action of cannabinoids has been shown in several experimental models of pain, but there are no literature reports of cannabinoids involvement in nociception associated with muscle hyperactivity in parafunctional habits situations. The aim of this study was to study the masticatory muscle activity and nociception associated in emotional stress model in rats and the endocannabinoid system involvement. The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (N° 35/13). The communication box was used as stimulus instrument for emotional stress for 14 days. Subcutaneous electrodes were implanted in the masseter and temporal muscles region to evaluate the masticatory muscle activity and it was performed mechanical hyperalgesia test in these muscles during the emotional stress stimulation. Were also evaluated anxiety behavior parameters, body weight, adrenal glands gross weight and c-Fos expression and cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the trigeminal ganglion and trigeminal spinal tract. Cannabinoid CB1 antagonist was administered and evaluated the nociceptive behavior. The expression of cannabinoid receptors in the masseter muscle was also assessed. The results showed a significant increase in stressed animals masticatory muscle activity on the seventh day of emotional stress stimulus. A significant reduction of masticatory muscles nociceptive threshold was observed, peaking on the eleventh day of emotional stress. The stressed animals showed anxiety behavior, with no differences in body weight or adrenal glands gross weight. The results also pointed that the stressed animals showed cytoplasmic vacuoles accumulation in the adrenal glands cortex, and increased expression of c-Fos and CB1 and CB2 receptors in the trigeminal ganglion and trigeminal spinal tract. The administration of the antagonist CB1 intensified the nociception on the fourth day of emotional stress. Cannabinoids CB1 and CB2 receptors have increased expression in the masseter muscle of the stressed animals. The data suggest that animals exposed to emotional stress have increased masticatory muscle activity and 'brux-like' behavior with a reduction in masticatory muscles nociceptive thresholds. Endocannabinoid system appears to be involved in the modulation of nociception induced emotional stress with increased expression of CB1 and CB2 receptors in the trigeminal ganglion, trigeminal spinal tract and masseter muscle.

**Key words:** Bruxism. Emotional stress. Nociception. Endocannabinoid system.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Respostas do sistema nervoso autônomo e eixo HHA ao estresse .....	25
FIGURA 2 –	Controle do sistema límbico sobre a atividade muscular .....	28
FIGURA 3 –	Organização do complexo trigeminal .....	33
FIGURA 4 –	Representação esquemática da ação endocanabinoide .....	36
FIGURA 5 –	Caixa de comunicação .....	42
FIGURA 6 –	Cirurgia para implantação de eletrodos .....	43
FIGURA 7 –	Esquema ilustrativo do protocolo experimental.....	44
FIGURA 8 –	Registro eletromiográfico.....	45
FIGURA 9 –	Local de aplicação do Von Frey.....	46
FIGURA 10 –	Efeito do estresse emocional sobre a atividade muscular mastigatória em registro eletromiográfico .....	51
FIGURA 11 –	Efeito do estresse emocional sobre limiar nociceptivo na região dos músculos mastigatórios masseter e temporal em ratos .....	53
FIGURA 12 –	Efeito do estresse emocional sobre o ganho de peso corporal .....	55
FIGURA 13 –	Efeito do estresse emocional sobre o peso bruto das glândulas adrenais .	56
FIGURA 14 –	Fotomicrografia do córtex das glândulas adrenais de ratos submetidos ao estresse emocional .....	57
FIGURA 15 –	Quantificação da porcentagem da área (pixels) de vacúolos citoplasmáticos no córtex das glândulas adrenais de ratos submetidos ao estresse emocional .....	58
FIGURA 16 –	Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	60
FIGURA 17 –	Quantificação da porcentagem a área marcada (pixels) da imunexpressão de c-Fos no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	61
FIGURA 18 –	Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	62
FIGURA 19 –	Quantificação da porcentagem a área marcada (pixels) da imunexpressão de c-Fos no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	63
FIGURA 20 –	Fotomicrografia da imunexpressão do receptor CB1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	64

FIGURA 21 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	66
FIGURA 22 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB1 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	67
FIGURA 23 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB1 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	68
FIGURA 24 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB2 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	70
FIGURA 25 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB2 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	71
FIGURA 26 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB2 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	72
FIGURA 27 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB2 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional .....	73
FIGURA 28 – Efeito do antagonista canabinoide CB1 sobre limiar nociceptivo na região dos músculos mastigatórios masseter e temporal em ratos submetidos ao estresse emocional .....	75
FIGURA 29 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB1 no músculo masseter de ratos submetidos ao estresse emocional .....	78
FIGURA 30 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB2 no músculo masseter de ratos submetidos ao estresse emocional .....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado antes e após o período de indução do estresse emocional .....	54
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AEA	Anandamida
AM 251	Antagonista canabinoide CB1
ATM	Articulação Temporomandibular
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CB1	Receptor Canabinoide 1
CB2	Receptor Canabinoide 2
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTM	Disfunção Temporomandibular
EMG	Eletromiografia
EPM	Erro Padrão da Média
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
Hz	Hertz
IL-1 $\beta$	Interleucina-1-beta
i.p.	Intraperitoneal
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
kg	Quilograma
KHz	Quilohertz
LAFICA	Laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer
L-dopa	Levodopa
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
mg	Miligrama

MGL	Lipase monoacilglicerol
mL	Mililitros
mV	Milivolts
PFA	Paraformaldeído
REM	Movimento rápido do olho
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
THC	Tetraidrocanabinol
TLCE	Teste do labirinto em cruz elevado
TN	Teste nociceptivo
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	Volt
2-AG	Glicerol-2-araquidonoil

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Bruxismo</b> .....	20
1.1.1 Fatores Etiológicos .....	21
<b>1.2 Estresse</b> .....	23
1.2.1 Modelos experimentais de estresse .....	26
1.2.2 Estresse emocional .....	27
<b>1.3 Dor miofascial mastigatória</b> .....	29
1.3.1 Via trigeminal .....	32
<b>1.4 Sistema endocanabinoide</b> .....	34
1.4.1 Mecanismo de ação .....	35
1.4.2 Modulação do sistema endocanabinoide sobre a nocicepção .....	36
<b>1.5 Justificativa</b> .....	39
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>2.1 Geral</b> .....	40
<b>2.2 Específicos</b> .....	40
<b>3 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Animais</b> .....	41
3.1.1 Grupos experimentais .....	41
<b>3.2 Modelo de Estresse Emocional</b> .....	41
<b>3.3 Cirurgia para implantação de eletrodos</b> .....	42
<b>3.4 Protocolo Experimental</b> .....	43
<b>3.5 Aplicação do antagonista canabinoide</b> .....	44
<b>3.6 Eletromiografia</b> .....	44
3.6.1 Registro .....	44
3.6.2 Análise .....	45
<b>3.7 Teste Nociceptivo – Hipernocicepção mecânica</b> .....	45
<b>3.8 Teste do labirinto em cruz elevado</b> .....	46
<b>3.9 Remoção dos tecidos</b> .....	47
3.9.1 Remoção do gânglio trigeminal e trato espinhal trigeminal .....	47
3.9.2 Remoção das glândulas adrenais e do músculo masseter .....	48
<b>3.10 Preparação de lâminas histológicas</b> .....	48
<b>3.11 Imunofluorescência para c-Fos, CB1 e CB2 no gânglio trigeminal, trato</b>	

espinhal trigeminal e músculo masseter .....	48
3.12 Análise Estatística.....	49
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
4.1 Análise da atividade muscular mastigatória de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	50
4.2 Análise do limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	52
4.3 Análise do comportamento de ansiedade de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	54
4.4 Análise do ganho peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	55
4.5 Análise do peso bruto das glândulas adrenais de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	56
4.6 Análise histológica das glândulas adrenais de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	57
4.7 Análise da expressão de c-Fos no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	59
4.8 Análise da expressão de receptores CB1 no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	64
4.9 Análise da expressão de receptores CB2 no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	69
4.10 Análise do efeito do antagonista canabinoide AM251 no limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	74
4.11 Análise da expressão de receptores CB1 no músculo masseter de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional e administrados AM251 (Antagonista CB1) .....	77
4.12 Análise da expressão de receptores CB2 no músculo masseter de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional .....	79
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO A – Declaração de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal .....</b>	<b>104</b>

<b>ANEXO B – Análise estatística Two-Way ANOVA da figura 28A .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO C – Análise estatística Two-Way ANOVA da figura 28B .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O movimento do aparelho estomatognático é uma função complexa realizada pelos músculos faciais e pela articulação temporomandibular (ATM). É controlado neurologicamente por mecanismos voluntários e involuntários, em que cada movimento é coordenado para ter uma função máxima, minimizando os danos com qualquer uma das estruturas do mecanismo de mastigação (YADAV, 2011). Desordens motoras orofaciais são definidas por movimentos anormais nos músculos orofaciais, podendo gerar dor e alterações nos padrões da mastigação. Essas desordens englobam uma série de patologias de hipo ou hiperatividade dos músculos orofaciais, dentre elas as discinesias orofaciais, as distonias orais e o bruxismo (CLARK; RAM, 2007; MASCARO et al, 2009).

Dentre as desordens motoras orofaciais, o bruxismo do sono e o apertamento sustentado e habitual (dia ou noite) são as desordens mais comuns. Em situações mais graves podem causar intensa dor de cabeça, distúrbios na ATM, desgaste e fratura dentária, gerando dificuldades no controle motor para realização de funções básicas, como falar e comer, influenciando na qualidade de vida (CLARK; RAM, 2007). O bruxismo é uma atividade parafuncional diurna ou noturna, incluindo apertamento ou ranger os dentes. Apresenta alta prevalência desde a infância até a idade adulta, regredindo em idosos. Vários fatores etiológicos estão envolvidos no seu surgimento, como fatores emocionais, principalmente o estresse e a ansiedade, interferências oclusais e distúrbios neuronais, tornando-se assim, uma disfunção multifatorial (ALAJBEG; ZUVELA; TARLE, 2012).

O bruxismo tem forte associação com a dor miofascial mastigatória, caracterizada como dor facial crônica dos músculos mastigatórios com possível bloqueio e limitação da abertura de boca. É frequentemente associada com condições psicológicas negativas, apresentando altas taxas de somatização e incapacidade (SIDEBOTTOM; PATEL; AMIN, 2013).

Estímulos nociceptivos que chegam ao sistema nervoso central ativam, além dos centros corticais e subcorticais da via nociceptiva, um sistema modulatório descendente com vias neuroquímicas que inibem a sensação de dor. Dentre estas vias, duas das mais estudadas são as vias do sistema opioide e do sistema endocanabinoide. A modulação da nocicepção e da atividade muscular mastigatória é observada em modelos experimentais de hiperatividade muscular mastigatória através dos receptores opioides (TAMBELI et al, 2001; SEO et al, 2001; WATANABE et al, 2010).

O sistema endocanabinoide é composto pelos receptores canabinoides, pelos ligantes endógenos (endocanabinoides) e proteínas responsáveis pelo seu metabolismo. Os endocanabinoides servem como mensageiros de sinalização retrógrada em sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, assim como moduladores de transmissão pós-sináptica que interagem com outros neurotransmissores (ZOGOPOULOS et al, 2013).

Os endocanabinoides estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas, como regulação da ingestão alimentar, imunomodulação, inflamação, analgesia, câncer, comportamento aditivo, epilepsia e outros (GUINDON; HOHMANN, 2009). O uso dos derivados canabinoides como agentes terapêuticos, principalmente no tratamento da dor, tem sido utilizados há tempos (WALKER; HUANG, 2002) e, ultimamente, seus efeitos na transmissão nociceptiva vem sendo estudado (WARE et al., 2010). A ação antinociceptiva dos canabinoides tem sido demonstrada em vários modelos experimentais de dor (ANAND et al, 2009; GONDIM et al, 2012; BAGÜES; MARTÍN; SÁNCHEZ-ROBLES, 2014). Em um estudo foi observado a participação desses receptores na modulação nociceptiva na ATM, mostrando seu envolvimento na dor orofacial de forma periférica e central (GONDIM et al, 2012).

O sistema endocanabinoide parece estar envolvido nas disfunções miofasciais. Pacientes com dor miofascial mastigatória se automedicam com *cannabis* medicinal para o alívio de dor (WARE et al, 2003), entretanto nenhum estudo mostra a participação dos canabinoides na dor miofascial mastigatória associada a hiperatividade muscular.

## 1.1 Bruxismo

Bruxismo é derivado da palavra grega *brygmós*, que significa ‘ranger de dentes’. Possui uma nomenclatura variada, como bruxomania, bruxismo-símile, bruxista (MURALI; RANGARAJAN; MOUNISSAMY, 2015). É definido como uma atividade parafuncional de ranger os dentes de forma rítmica e espasmódica ou apertamento dos dentes sem um propósito funcional (LOBBEZOO et al, 2013). O termo parafunção sugere a distinção entre o estresse oclusal exercido durante a mastigação e deglutição e o estresse oclusal interposto fora da função normal, causando assim uma sobrecarga para as estruturas estomatognáticas (SHETTY et al, 2010).

O bruxismo é considerado como um fator causal das disfunções temporomandibulares (DTM). Os músculos da mastigação são afetados devido ao aumento do tônus muscular, podendo gerar distúrbios intra-articulares (MANFREDINI; LOBBEZOO, 2010; COMMISSO; MARTÍNEZ-REINA; MAYO, 2014). Microtraumatismos crônicos como apertamento dental, morder o lábio, a caneta, o lápis, objetos duros e abrir a boca além do limite fisiológico podem causar DTM, que é considerada a principal causa de dor de origem não dental na região orofacial (LIPTON; SHIP; LARACH-ROBINSON, 1993). A relação entre a DTM e as parafunções orais é questão de debate. Enquanto alguns estudos relatam as atividades parafuncionais como fatores de risco para a dor muscular mastigatória e DTM (WINOCUR et al, 2006; CHEN et al, 2007), outros estudos falharam em descobrir quaisquer associação estatisticamente significativa (VAN DER MEULEN et al, 2006; YACHIDA et al, 2012).

O bruxismo pode ocorrer tanto no sono como na vigília. O bruxismo diurno é caracterizado por atividade de apertamento semivoluntário dos dentes, podendo estar associado a situações de estresse, como pressão no trabalho e responsabilidades familiares. Durante o apertamento há um aumento da tensão em oclusão devido à contração isométrica dos músculos elevadores da mandíbula, causando fadiga e hipertrofia muscular mastigatória (ALVES; ALCHIERI; BARBOSA, 2013). No bruxismo do sono ocorrem movimentos estereotipados de ranger e / ou apertar os dentes durante o sono. Na última década, foi listado na Classificação Internacional de Distúrbios do Sono (LAVIGNE et al, 2008).

Molina et al (2013) utilizaram um questionário de 25 sinais e sintomas, juntamente com o exame clínico para determinar a frequência e o comportamento do bruxismo. O instrumento foi útil, permitindo a classificação do bruxismo em leve, moderado, severo e extremo.

Uma intensa atividade parafuncional pode provocar efeitos patológicos sobre a ATM e suas estruturas próximas. O bruxismo leve parece não ser um importante problema clínico, pois a intensidade e consistência das forças exercidas não aparecem a ponto de causar danos para o sistema mastigatório (MOLINA et al, 2013).

A variabilidade na prevalência do bruxismo pode ser atribuída a diversos fatores, como o tipo de bruxismo estudado (acordado, sono, não especificado), a aplicação metodológica do diagnóstico (questionários, exame clínico) e as características das populações dos estudos (crianças, adultos, população em geral, população de doentes) (LOBBEZOO et al, 2013).

Estima-se que 5% a 21% da população mundial tem bruxismo, de acordo com uma combinação de avaliação do atrito dos dentes e relatos de pais, cônjuges e companheiros de quartos (CLARK; RAM, 2007).

O início pode ocorrer a partir de um ano de idade, após a erupção dos incisivos, com prevalência em crianças entre 14% e 20% (FEU et al, 2013). Machado et al (2014) relataram que aproximadamente 13% dos adolescentes apresentam a parafunção oral. Emodi-Perlman e colaboradores (2012) realizaram um estudo com crianças de 5 a 12 anos e observaram que grande parte da amostra apresentou pelo menos um hábito parafuncional oral e sinais clínicos de DTM. E ressaltaram que eventos estressantes na vida da criança resultam em um aumento do desempenho das parafunções orais.

A prevalência do atrito dental em pessoas entre 18 e 55 anos é alta, apresentando correlação significativa com a sensibilidade dentária (YADAV, 2011). Entretanto, a prevalência diminui para 3% em idosos (LAVIGNE et al, 2008).

### 1.1.1 Fatores Etiológicos

A etiologia do bruxismo é complexa e controversa, fatores emocionais, como estresse e ansiedade, interferências oclusais, distúrbios neuronais estão relacionados com o seu aparecimento, tornando-se assim, uma disfunção multifatorial (ALAJBEG; ZUVELA; TARLE, 2012). Primeiramente, os fatores morfológicos eram considerados os mais importantes para a etiologia do bruxismo (LOBBEZZO; NAEIJE, 2001). Entretanto, estudos mostraram que essa relação não tem forte evidência científica. Lobbezoo e colaboradores (2001a) compararam variáveis oclusais e cefalométricas entre bruxistas e não-bruxistas, não encontrando diferenças entre os dois grupos. Nahás-Scocate, Coelho e Almeida (2014) avaliaram a associação entre o bruxismo e a presença de mordida cruzada posterior em

crianças de 2 a 6 anos. A prevalência do hábito parafuncional foi de 28,8% nas crianças, porém sem resultados significativos da relação com a mordida cruzada. Em sua revisão sobre bruxismo e mordida, Lobbezzo et al (2012) mostraram também que não existe correlação entre os dois fatores.

Diversos fatores fisiopatológicos estão sendo associados na precipitação do bruxismo, como alguns medicamentos (inibidores seletivos da receptação de serotonina, antidepressivos tricíclicos, antipsicóticos) e drogas ilícitas (anfetaminas, cocaína). O bruxismo induzido por medicamentos surge devido aos efeitos adversos, incluindo efeitos extrapiramidais no controle motor, tremor anormal e contrações musculares involuntárias (PATEL; KUMAR, 2012; FRATTO; MANZON, 2014).

O álcool e o tabagismo também são fatores desencadeantes do bruxismo. Há uma relação significativa entre o tabagismo e o bruxismo, na qual os episódios da parafunção são duas vezes maiores nos bruxistas fumantes do que em bruxistas que não fumam. Níveis mais elevados de nicotina aumentam a liberação da dopamina, sendo fortemente relacionada com o bruxismo (RINTAKOSKI et al, 2010). Indivíduos que consomem álcool aumentam significativamente os níveis de atividade do músculo masseter durante o sono (HOJO et al, 2007).

O bruxismo pode ocorrer durante todos os estágios do sono, mas ocorre de forma desproporcional durante o estágio dois e na fase do sono com movimento rápido do olho (REM) (WRUBLE; LUMLEY; MCGLYNN, 1989). Tem sido sugerido como parte de uma resposta de excitação do sono, que é caracterizada como uma mudança súbita na profundidade do sono, na qual o indivíduo ou chega a um estágio mais leve do sono ou realmente acorda. Essa resposta é acompanhada por movimentos corporais amplos, aumento na frequência cardíaca, vasoconstrição periférica e aumento das atividades musculares (MACALUSO et al, 1998).

Lobbezzo e Naeije (2001) afirmam que essa disfunção é modulada por vários neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC), sendo associada especificamente a distúrbios no sistema dopaminérgico central. Os movimentos orais parecem ser influenciados por receptores de dopamina. Koshikawa e colaboradores (1991) mostraram o envolvimento do sistema dopaminérgico no movimento mandibular através da estimulação dos receptores de dopamina D1 e D2. Lobbezzo et al (1997) observaram o efeito do precursor da dopamina, a L-DOPA, no bruxismo. Os resultados mostraram que a administração do fármaco diminuiu agudamente o número médio de episódios de bruxismo por hora durante o sono e normalizou os padrões de atividade eletromiográfica. Entretanto, o uso crônico de L-dopa pode causar

bruxismo (MAGEE, 1970). Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) também causam bruxismo com o uso prolongado (LOBBEZOO et al, 2001b). Dessa forma, há dois tipos de bruxismo, um tipo idiopático que pode ser tratado em curto prazo com agonistas dopaminérgicos. E outro tipo iatrogênico, causado pela administração crônica de medicamentos dopaminérgicos (LOBBEZZO; NAEIJE, 2001).

As principais fontes de dopamina no SNC são os neurônios localizados na área tegmental ventral e na porção compacta da *substantia nigra*. O complexo nigral é uma importante via de saída para o controle motor, com projeções para o complexo estriatal. Desequilíbrio nessas projeções geram desordens motoras (AIRES, 2012).

A neurotransmissão dopaminérgica estriatal está envolvida na gênese dos movimentos orais. Atividades mastigatórias não funcionais, como mascar chicletes, roer unhas, apertamento dental aumentam as concentrações de dopamina estriatal (GOMÉZ et al, 1999). Alterações nas concentrações de dopamina também foram vistas no córtex pré-frontal de ratos que apresentaram atividades mastigatórias não funcionais induzidas por estresse, mostrando que a dopamina parece exercer um papel importante no planejamento e execução de comportamento na tentativa de lidar com situações de estresse (GOMÉZ et al, 2010).

Ao longo dos anos, os fatores psicossociais têm sido amplamente ressaltados na etiologia do bruxismo, tanto para desencadear como para perpetuar os sinais e sintomas. Hábitos parafuncionais são observados em momentos de estresse como uma via de saída para tensão gerada. Alguns estudos mostram a íntima relação da ansiedade e do estresse, com os comportamentos parafuncionais orais (MOLINA et al, 2006; GOMÉZ et al, 2010; ABEKURA et al, 2011; MOLINA et al, 2011).

A ansiedade é um estado emocional desencadeado pelo corpo, incluindo componentes fisiológicos e psicológicos, quando exagerada ou desproporcional torna-se patológica. Indivíduos com bruxismo mostram diferenças significativas nos níveis de ansiedade quando comparado a indivíduos normais (ALVES; ALCHIERI; BARBOSA, 2013). Pacientes psiquiátricos, com diagnóstico de esquizofrenia, depressão psicótica, distúrbio obsessivo-compulsivo também apresentam sinais clínicos de bruxismo, desgaste dental e sensibilidade muscular (WINOCUR et al, 2007).

## 1.2 Estresse

O estresse tem se tornado um problema real na sociedade, tornando-se a principal razão para aconselhamento médico (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ;

WIECKIEWICZ, 2014). Caracteriza-se como uma resposta fisiológica e psicológica a estímulos nocivos e mudanças ambientais. O estresse crônico afeta negativamente a saúde mental e física, levando a doenças, predominante em todo o mundo (KUBO; IINUMA; CHEN, 2015).

Situações estressantes conduzem ao desenvolvimento de hábitos parafuncionais, porém essa correlação do estresse e com o bruxismo permanece controversa. Watanabe, Ichikawa e Clark (2003) e Pierce et al (1995) mostraram em seus estudos que não há relação dos comportamentos diários, como o estresse e a raiva, com o bruxismo.

Já Giraki e colaboradores (2010) avaliaram 69 indivíduos, dos quais 48 eram bruxistas, observaram correlações significativas com problemas cotidianos, problemas no trabalho, fadiga e problemas físicos no grupo de indivíduos com bruxismo. Tal grupo apresentou maior tendência a sentir estresse no trabalho e na vida diária, influenciando no estado físico.

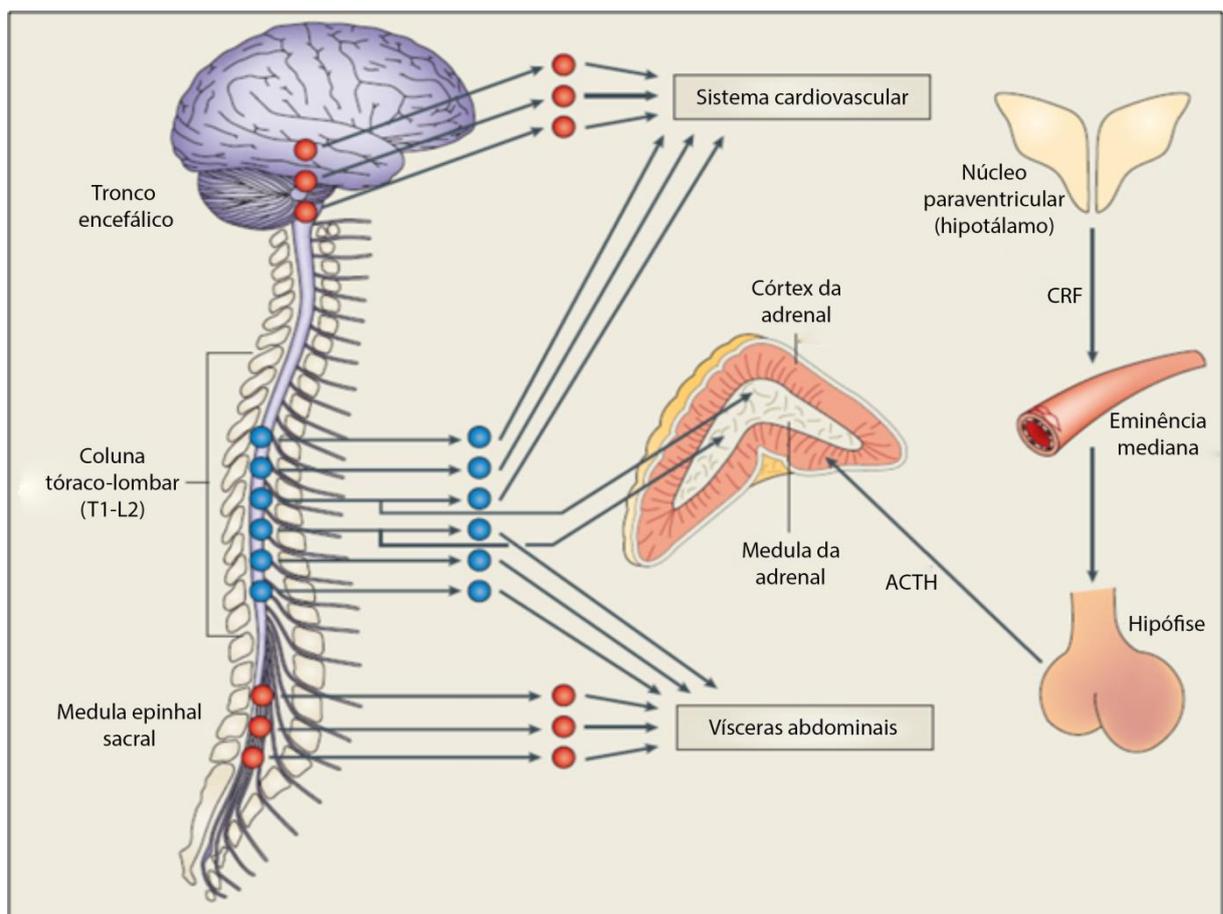
Fatores estressantes estimulam reações adaptativas no organismo, que são controladas por processos hormonais e neuro-hormonais. O SNC é responsável por avaliar e processar esses fatores externos especificamente no sistema límbico, local de controle das reações vitais (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014).

O organismo contém um sistema de bloqueio que visa manter a integridade fisiológica em resposta ao estresse, com isso ocorre ativação do sistema neuroendócrino via sistema nervoso autônomo (SNA) e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O SNA possui resposta imediata no estresse pela ativação do braço simpático adrenomedular, produzindo e liberando catecolaminas, que geram repercussões cardiovasculares, principalmente o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). O hipotálamo é responsável pelo controle da homeostasia do meio interno, sendo rapidamente ativado na presença de um fator estressor. Neurônios da região parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico secretam o fator liberador de corticotrofina (CRF), transportado para a adeno-hipófise pelo sistema vascular porta-hipotálamo-hipofisário, fazendo com que o sangue coletado na eminência mediana profunda a hipófise anterior. O CRF estimula a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), responsável por estimular a síntese e secreção de glicocorticoides no córtex das glândulas adrenais. A secreção de ACTH é sensível ao estresse, o que causa elevação nos seus níveis plasmáticos e consequente aumento dos glicocorticoides (FIGURA 1) (AIRES, 2012).

O cortisol é sintetizado na zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais. A maior fonte para sua produção é o colesterol transportado no plasma pelas lipoproteínas de

baixa densidade (LDL). Essas lipoproteínas são captadas pelas células adrenocorticais, através de receptores específicos de LDL. Após sua entrada na célula, o colesterol é esterificado e estocado em vacúolos citoplasmáticos (AIRES, 2012). Através da ação do ACTH, o cortisol é produzido e liberado, obedecendo a um padrão de ritmo circadiano. A elevação de cortisol circulante inibe a secreção de ACTH, por um mecanismo de retroalimentação negativa. Na presença do estresse, esse mecanismo é prejudicado, havendo uma produção excessiva de ACTH e cortisol. O estresse crônico aumenta a excitabilidade do eixo HHA e do sistema adrenomedular, promovendo uma liberação facilitada de ACTH, cortisol e noradrenalina. Há também alterações na estrutura e função das regiões cerebrais envolvidas no controle neuroendócrino, como aumento da expressão de CRF e diminuição da expressão de receptores de glicocorticoides no núcleo paraventricular hipotalâmico (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Figura 1 – Respostas do sistema nervoso autônomo e eixo HHA ao estresse



Fonte: Adaptado de ULRICH-LAI; HERMAN, 2009. Os eixos simpático-adrenomedular e HHA são ativados durante o estresse. A ativação dos neurônios simpáticos pré-ganglionares na coluna tóraco-lombar estimula a produção de adrenalina na medula da adrenal, com consequente aumento da frequência cardíaca e pressão arterial. A ativação dos neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo estimula a produção de CRF que age sobre a hipófise para promover a secreção do ACTH, que por sua vez atua sobre o córtex da adrenal, iniciando a síntese e liberação de glicocorticoides.

O sistema límbico trabalha em paralelo influenciando na ativação do eixo HHA. A amígdala controla atividades emocionais, exteriorização de humor e comportamento de ansiedade e medo. Seu núcleo central está envolvido na regulação autonômica. Já os núcleos medial e basolateral afetam o eixo HHA e são ativados pelo estresse psicológico. A estimulação do hipocampo diminui a secreção de glicocorticoides, mas lesões induzidas por estresse favorece o aumento da secreção de cortisol (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Mascaro e col (2005) mostraram o envolvimento do núcleo central da amígdala com o núcleo motor trigeminal. Neurônios do núcleo central da amígdala se projetam para o núcleo motor trigeminal, com inervação predominantemente dopaminérgica. Tais neurônios contêm CRF, que desempenha um importante papel na resposta ao estresse. Dessa forma, as fibras dopaminérgicas podem modular os neurônios da amígdala que inervam áreas relacionadas com o controle motor oral.

### 1.2.1 Modelos experimentais de estresse

Os modelos experimentais de estresse são fundamentais para o conhecimento das alterações fisiopatológicas ocorridas durante o estresse e para o desenvolvimento de novos fármacos para o manejo do estresse. Os modelos animais, agudos e crônicos, simulam a condição de estresse no animal semelhante aos seres humanos. A avaliação do estresse nos animais é realizada através da avaliação do comportamento e dos níveis bioquímicos e fisiológicos. A avaliação comportamental inclui o teste de campo aberto e o teste de interação social. Análises quantitativas de ACTH e de corticosterona no plasma indicam o perfil bioquímico; mudanças no peso corporal, no peso das glândulas adrenais e ulcerações gástricas demonstram as alterações fisiológicas, como índices de estresse (BALI; JAGGI, 2015).

Nos modelos experimentais de estresse os animais são expostos a estressores físicos e psicológicos. Os principais modelos de estresse físico são: modelo de contenção/imobilização, modelo de variação de temperatura e modelo de choque elétrico na pata. O modelo de isolamento neonatal, o modelo de alterações no ritmo circadiano e o modelo choque elétrico na pata indireto são utilizados como protocolo para indução de estresse psicológico (CAMPOS et al, 2013; BALI; JAGGI, 2015). Um tipo de modelo do choque elétrico na pata indireto é a caixa de comunicação, onde o choque elétrico na pata gera um estresse emocional nos animais que observam (OGAWA, 1990).

Alguns modelos experimentais de estresse são utilizados para induzir alterações no comportamento oral dos animais. O modelo de aperto na cauda (GÓMEZ et al, 2010), o

modelo da caixa de comunicação (ROSALES et al, 2002) e o modelo de contenção (SATO et al, 2010) mostram atividades mastigatórias não funcionais nos animais.

### 1.2.2 Estresse emocional

A ligação direta entre os fatores psicológicos e as parafunções é vista principalmente por relatórios clínicos e estudos epidemiológicos, porém sem evidência direta. O estresse psicológico ou emocional pode ocorrer quando o organismo percebe a incapacidade de lidar com um desafio ou quando não consegue responder adequadamente as ameaças físicas ou emocionais, seja real ou imaginário. É capaz de gerar diversas disfunções no cérebro, no trato gastrintestinal, bexiga e músculos (LI et al, 2011; LI et al, 2013).

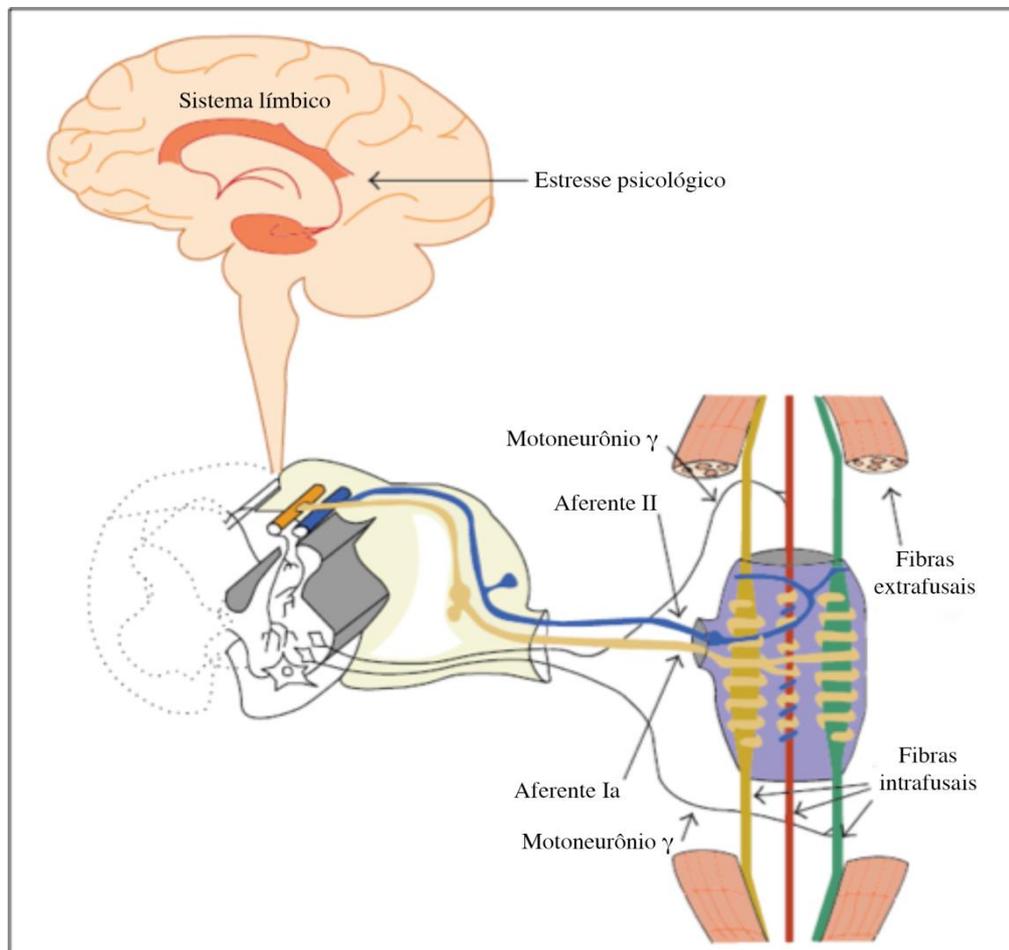
O sistema neuroendócrino é influenciado pelo estresse emocional, onde uma condição emocional negativa aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona em animais (ISHIKAWA et al, 1992; LI et al, 2011) e níveis salivares de cortisol em humanos (TAHARA; SAKURAI; ANDO, 2007). As atividades centrais do cérebro, como a neurotransmissão dopaminérgica, também são afetadas em estados emocionais negativos, com um aumento seletivo da dopamina (KANEYUKI et al, 1991; FUNADA; HARA, 2001).

Comportamentos orais como apertamento dental, mascar goma, roer unhas são observados nos períodos estressantes com o intuito de aliviar a tensão emocional gerada (GÓMEZ et al, 2010). Curiosamente, pessoas que apresentam o comportamento de mastigar ou apertar os dentes durante o momento de tensão exibem redução dos níveis de cortisol salivar quando comparado a pessoas que não apresentam tal comportamento (TAHARA; SAKURAI; ANDO, 2007).

O estresse emocional induz as atividades parafuncionais pelo sistema reticular no hipotálamo e sistema límbico, com influência na atividade muscular (CHISNOIU et al, 2015). O estresse psicológico aumenta as estimulações centrais, com ativação do sistema eferente gama. Com essa atividade eferente gama aumentada, há contração das fibras intrafusais, resultando em estiramento parcial das regiões sensoriais dos fusos musculares. Quando os fusos estão parcialmente estirados, é necessário menos estiramento do músculo como um todo para iniciar uma ação reflexa. Isso afeta o reflexo miotático, resultando no aumento do tônus muscular (FIGURA 2). Dessa forma, os centros mais elevados do cérebro conduzem a um aumento anormal do tônus muscular, desencadeados por estímulos psicológicos (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014).

O aumento da atividade muscular mastigatória é considerado uma resposta física de mudanças no estado emocional. O estresse e a ansiedade aumentam a atividade mioelétrica dos músculos do sistema estomatognático, com resultante aumento das parafunções, como apertamento dos dentes (NICHOLSON; TOWNSEN; GRAMLING, 2000). Atividade “brux-like” ou comportamento bruxismo-símile, observada em animais estressados emocionalmente, apresenta padrão eletromiográfico de explosões cíclicas com maior amplitude e duração mais longa. Tais alterações eletromiográficas são revertidas com uso de ansiolíticos (ROSALES et al, 2002; WU et al, 2013).

Figura 2 – Controle do Sistema límbico sobre a atividade muscular



Fonte: Adaptado de WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014. Retroalimentação positiva entre o sistema eferente e aferente. Ativação do sistema eferente gama pelo estresse emocional ativa de fibras intrafusais. A ativação dessas fibras é seguida da ativação das fibras sensitivas do fuso muscular provocando um estímulo aferente que induz um aumento do tônus muscular por afetar o reflexo miotático. Qualquer leve estiramento do músculo causará um reflexo de contração.

Três tipos de atividade motora são vistas no bruxismo, a tônica, uma contração muscular sustentada por mais de 2 segundos; a fásica constitui contrações repetidas da musculatura mastigatória com três ou mais rajadas consecutivas na eletromiografia com 0,25 e 2 segundos cada; e combinado, alternando os episódios tônicos e fásicos. No bruxismo diurno o padrão motor é predominantemente tônico, já no bruxismo do sono são episódios fásicos e combinados (MURALI; RANGARAJAN; MOUNISSAMY, 2015).

Além da hiperatividade muscular, pacientes com bruxismo apresentam níveis elevados de catecolaminas na urina em comparação com indivíduos sem bruxismo (CLARK; RUGH; HANDELMAN, 1980). O risco relativo de desenvolver bruxismo aumenta com o aumento dos níveis de adrenalina e dopamina, essa tendência fortalece consideravelmente a relação positiva entre estados emocionais estressantes e bruxismo. É também provável que a gravidade do bruxismo aumenta de acordo com o aumento dos níveis das catecolaminas (VANDERAS et al, 1999).

### **1.3 Dor miofascial mastigatória**

A dor miofascial mastigatória é uma das causas mais comuns de dores musculoesqueléticas, sendo caracterizada por uma sensação dolorosa irradiada nos músculos mastigatórios, associada ou não com disfunção mandibular, que geralmente envolve a limitação de abertura (PANKAJ et al, 2015). É uma condição dolorosa muscular regionalizada caracterizada pela ocorrência de bandas musculares tensas palpáveis, identificando pontos intensamente dolorosos (YENG; KAZIYAMA; TEIXEIRA, 2003).

O sinal clínico da dor miofascial é o ponto gatilho, um componente sensorial com nociceptores que dão informações de dor, espasmos musculares e dor referida. O componente motor da dor miofascial é causado pelo excesso de acetilcolina nas placas terminais, que causam nós de contração, acumulando-se nas fibras musculares e tornando-se palpável no músculo (SIDEBOTTOM; PATEL; AMIN, 2013). Os pontos gatilhos variam de 2,5 mm de diâmetro e podem ser ativos ou latentes. A palpação dos pontos gatilhos com o dedo em profunda pressão provoca alteração na dor, na zona de referência ou faz com que a dor seja irradiada em direção à zona de referência. A reação comportamental à palpação firme dos pontos gatilhos é uma característica da dor miofascial, considerado como um sinal positivo. Esta reação inclui retirada da cabeça e enrugamento da face ou da testa (PANKAJ et al, 2015). Em um modelo animal de pontos gatilhos miofasciais foi observado que as fibras

musculares e padrões mioelétricos apresentam alterações em comparação aos animais normais (HUANG et al, 2013).

As principais causas da dor miofascial mastigatória são traumatismos, sobrecargas agudas ou microtraumatismos repetitivos das estruturas musculoesqueléticas. Quando ocorre uma lesão na fibra muscular, seja por sobrecarga ou estresses de repetição, há ocorrências dos pontos gatilhos resultando em contração muscular exagerada e fadiga muscular. Assim, ocorre isquemia focalizada e liberação de substâncias algogênicas gerando um círculo vicioso caracterizado por atividade de elevação motora e do sistema nervoso neurovegetativo, aumentando a sensibilização à dor. Estes efeitos dolorosos podem ser sustentados por fenômenos de sensibilização centrais e periféricos (YENG; KAZIYAMA; TEIXEIRA, 2003).

Os microtraumatismos localizados causam ruptura do retículo sarcoplasmático e liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) no sarcoplasma. O  $\text{Ca}^{++}$  reage com a adenosina trifosfato (ATP) causando deslizamento e interação da actina com a miosina e encurtamento do sarcômero, que resulta na hipertonia muscular localizada, sem atividade elétrica. A atividade contrátil não controlada aumenta o consumo de energia e gera um colapso da microcirculação local (compressão mecânica). O gasto energético aumentado sob condições isquêmicas provoca depleção localizada de ATP, resultando no comprometimento de recaptação ativa de  $\text{Ca}^{++}$  pela bomba do retículo sarcoplasmático. A conservação da contração muscular causa um círculo vicioso de contração muscular-isquemia-contração muscular (YENG; KAZIYAMA; TEIXEIRA, 2003).

A hipersensibilidade dos pontos gatilhos à palpação deve-se a excitação e a sensibilização dos nociceptores pelo acúmulo de substâncias algogênicas. Nociceptores sensibilizados exibem atividade espontânea, diminuição do limiar de ativação e aumento da capacidade de respostas aos estímulos nocivos subsequentes. Essas alterações contribuem para dor espontânea, alodinia (dor devido a um estímulo que normalmente não causa dor) e hiperalgesia (aumento da resposta a um estímulo que normalmente é doloroso) que são características de pacientes com dor miofascial (SVENSSON et al, 2008). Dessa forma, a dor gera, reflexamente, espasmo muscular, e o espasmo agrava a condição original (YENG; KAZIYAMA; TEIXEIRA, 2003).

Shah e col (2005) avaliaram os níveis de prótons, de mediadores inflamatórios, de catecolaminas, de neuropeptídeos e de citocinas em músculos com pontos gatilhos. Os resultados mostraram que indivíduos com pontos gatilhos ativos possuíam pH mais baixo, por causa da presença de maior quantidade de ácidos, e níveis elevados de bradicinina, serotonina,

norepinefrina, substância P, peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ).

A abordagem de tratamento mais comum para a dor miofascial baseia-se no relaxamento muscular com modalidades terapêuticas conservadoras como placas oclusais, fisioterapia, tratamentos comportamentais, físicos e uso farmacológico de drogas. Novos estudos estão surgindo propondo novos tratamentos, como a toxina botulínica (GUARDA-NARDINI et al, 2008; GUARDA-NARDINI et al 2012; SIDEBOTTOM; PATEL; AMIN, 2013).

O estresse psicológico está relacionado com atividades parafuncionais orais e conseqüentemente geram dor. A relação entre estresse, aumento dos padrões de atividade muscular e dor foi descrita como a teoria psicofisiológica por Laskin (1969). De acordo com a teoria, a fadiga muscular seria causada por hábitos orais crônicos (apertamento dos dentes), na maioria dos casos envolve mais o aspecto emocional do que fatores mecânicos. Além disso, o espasmo muscular leva a dor, limitação e uma leve mudança na posição da mandíbula, ocasionando uma oclusão incorreta (LASKIN, 1969).

Estudos experimentais mostram a relação de dor, estresse e hiperatividade muscular. Em um estudo utilizando um modelo de estresse emocional, os autores observaram que os animais estressados apresentam alterações sensitivas nos músculos mastigatórios, sendo reversível após a retirada do fator estressor (HUANG et al, 2011). Outros estudos que utilizaram um óleo irritante que evoca um aumento sustentado e reversível na EMG dos músculos mandibulares demonstram um comportamento nociceptivo e que pode ser modulado pelo sistema opioide (TAMBELI et al, 2001; BONJARDIM et al, 2009).

Dois modelos são propostos para relação bruxismo e dor miofascial. O modelo psicofisiológico, que postula que o estresse é fator causal do bruxismo, com associação positiva entre atividade muscular e dor (LASKIN, 1969). O modelo adaptativo da dor propõe que a dor nos músculos mastigatórios inibe a atividade dos músculos da mandíbula como uma resposta reflexa protetora (LUND et al, 1991).

A hiperatividade muscular é descrita como qualquer aumento na atividade muscular acima daquela necessária para função que inclui as atividades parafuncionais e outros hábitos orais, mas também qualquer aumento próximo ao tônus muscular (OKESON, 2008). Acredita-se que a hiperatividade muscular é o fator desencadeante da dor e disfunção na ATM, gerando assim, um ciclo vicioso (MOLINA et al, 2001). A dor miofascial é comumente associada ao bruxismo (PATEL; KUMAR, 2012). Há uma clara associação entre a percepção de dor e o bruxismo, principalmente no sexo feminino (AHLBERG et al, 2005).

Marklund e Wänman (2008) ao analisarem a dor miofascial e os hábitos parafuncionais, em relação ao gênero feminino observaram que as mulheres são mais propensas a desenvolver dor miofascial frequente do que os homens. Os autores também relataram que o bruxismo mostrou associação com os sinais e sintomas miofasciais. Essa diferença relacionada ao sexo na dor também é observada nos estudos experimentais em animais (BEREITER; SHEN; BENETTI, 2002; DONG et al, 2007).

Glaros e Williams (2012) observaram que a porcentagem de tempo gasto em atrito dos dentes é significativamente maior do que o tempo gasto em apertar os dentes, e tanto o atrito como o apertamento estão associados com dor miofascial ou dor de cabeça. Michelotti e col. (2010) também afirmam que o apertamento é um fator significante para a dor miofascial. Outros estudos relatam a associação inversa entre desgaste do dente e severidade da dor miofascial (LAVIGNE et al, 1997; JANAL et al, 2007). Yachida e colaboradores (2012) observaram que não há diferenças significativas na atividade eletromiográfica de pacientes com dor miofascial e pacientes sem dor.

### 1.3.1 Via trigeminal

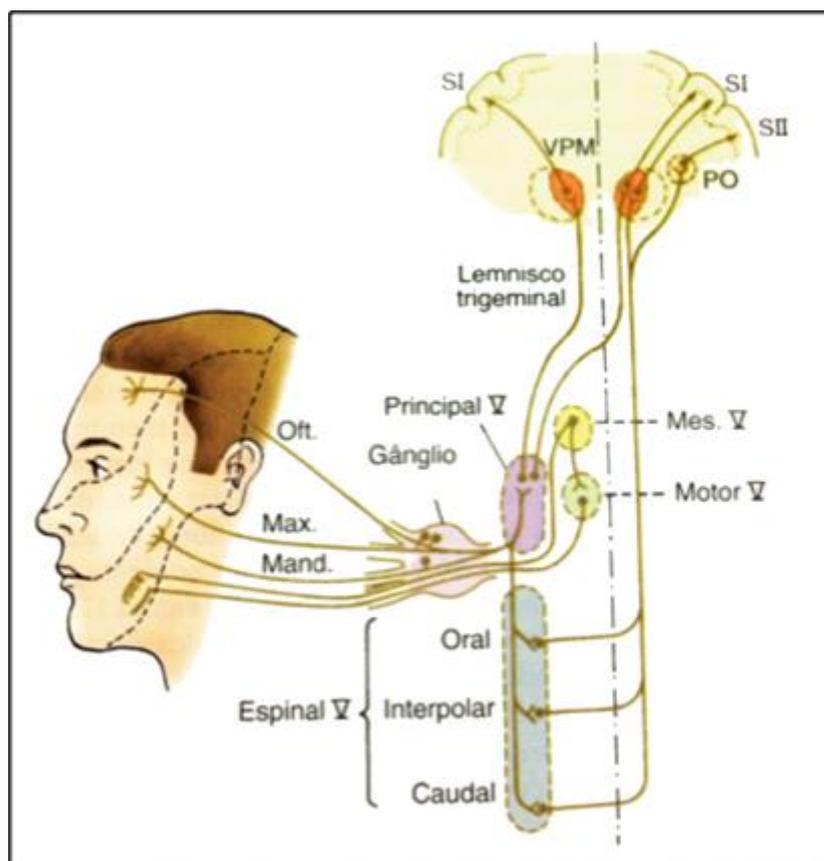
As informações somestésicas e proprioceptivas da região orofacial são conduzidas pelo nervo trigêmeo, quinto par dos nervos cranianos, como também a inervação motora dos músculos mastigatórios. O trigêmeo possui três ramificações, o ramo oftálmico, o ramo maxilar, que são exclusivamente sensitivos e o ramo mandibular, que conduz ambos os tipos de fibras, sensoriais e motoras. Os corpos celulares trigeminais estão localizados no gânglio trigeminal (AIRES, 2012).

O complexo trigeminal é composto pelos núcleos: principal, mesencefálico, motor e espinhal (FIGURA 3). O núcleo principal trigeminal recebe projeções ipsilaterais de mecanorreceptores da face e da cavidade oral, conduzindo informações táteis da face; apresenta também uma ramificação descendente que chega ao núcleo espinhal trigeminal (AIRES, 2012). O núcleo mesencefálico é formado por neurônios que conduzem informações proprioceptivas dos músculos da mastigação e do ligamento periodontal dos dentes. Suas fibras aferentes projetam-se ao núcleo motor, responsável por controlar o tônus dos músculos mastigatórios e os movimentos mandibulares. Os dois núcleos estabelecem uma via que torna possível a realização de um reflexo similar ao reflexo de estiramento, o reflexo nociceptivo, que constitui o reflexo de abrir a boca quando há algo duro na mastigação que levaria a uma fratura dentária (MASCARO et al, 2008).

A região sensitiva trigeminal, o núcleo espinal está localizada no tronco cerebral e é responsável por receber todas as aferências nociceptivas, dividindo-se em três subnúcleos, o caudal, o oral e o interpolar (MASCARO et al, 2008). O subnúcleo espinal caudal recebe fibras nociceptivas provenientes da face apresentando características anatômicas e fisiológicas semelhantes ao corno dorsal da medula espinal, sendo uma projeção análoga à via espinotalâmica (SVENSSON et al, 2008; AIRES, 2012).

As fibras trigeminais A-delta e C dos neurônios aferentes de primeira ordem conduzem a sensibilidade térmica e dolorosa entrando no tronco encefálico para fazer sinapse com o neurônio de segunda ordem localizado no núcleo do trato espinal trigeminal. As projeções no subnúcleo caudal saem contralateralmente sendo transmitidas e conduzidas até os núcleos ventro-póster-medial e posterior do tálamo e, em seguida, ao córtex somatossensorial (AIRES, 2012).

Figura 3 – Organização do complexo trigeminal



Fonte: AIRES, 2012. Complexo trigeminal mostrando a via aferente sensitiva, desde a periferia passando pelos núcleos trigeminais principal (Principal V) e espinal (Espinal V), chegando até os núcleos talâmicos ventro-póster-medial (VPM) e Posterior (PO), com projeções para o córtex somestésico primário (SI) e secundário (SII). Aferências proprioceptivas da musculatura mastigatória projetam-se ao núcleo mesencefálico trigeminal (Mes. V), conectando-se aos motoneurônios mastigatórios localizados no núcleo motor (Motor V).

Devido a sua característica multidimensional, a dor pode ser modulada por uma variedade de agentes farmacológicos e intervenções físicas. A modulação da dor significa que impulsos originados a partir de um estímulo nociceptivo, podem ser alterados antes de chegar ao córtex para reconhecimento (OKESON, 2008).

O processo de modulação nociceptiva pode ser exercido através da influência de substâncias inibitórias com mecanismos de regulação pré-sináptica ou pós-sináptica. Essas substâncias incluem os opioides, as encefalinas, a serotonina e ácido gama-aminobutírico (GABA), modificando os sinais nociceptivos aferentes (SVENSSON et al, 2008).

#### **1.4 Sistema endocanabinoide**

A planta *Cannabis sativa* tem sido utilizada por séculos para tratamento medicinal, devido ao seu efeito analgésico, antiemético e sedativo. O modo de ação da erva só ficou claro após a identificação do seu principal componente ativo, o  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC), que ocorreu tardiamente por causa da sua natureza lipídica (MECHOULAM, 1970). Posteriormente, foram identificados sítios específicos de ligação no cérebro de mamíferos e caracterização das substâncias ligantes endógenas. Atualmente, sabe-se que a *cannabis* tem mais de 60 substâncias, como o canabidiol, canabinol, canabigerol, canabicitrol e canabicromeno (DEVANE et al, 1988). O  $\Delta^9$ -THC produz a tétrede canabinoide (analgesia, catalepsia, hipotermia e hipolocomoção), além de várias ações farmacológicas em animais e seres humanos (HU; HO; CHIOU, 2014).

O sistema endocanabinoide inclui os receptores, os agonistas endógenos e o aparato bioquímico responsável por sintetizar essas substâncias e terminar suas ações (ZOGOPOULOS et al, 2013). Dois tipos de receptores foram identificados, CB1 clonado em 1990, e CB2, clonado em 1993. Ambos receptores são acoplados a proteína G, sua ativação promove a inibição da atividade da adenilato-ciclase, reduzindo a formação do segundo mensageiro AMPcíclico (PERTWEE, 2001).

Os receptores CB1 são encontrados principalmente no SNC e, em menor extensão, em certos tecidos periféricos, incluindo células do sistema imunológico, tecidos reprodutivos, tecidos gastrintestinais, gânglios simpáticos, coração, pulmão e glândulas adrenais (PERTWEE; ROSS, 2002). Estes receptores estão localizados nos terminais pré-sinápticos e são responsáveis pela maioria dos efeitos neurocomportamentais dos canabinoides. São distribuídos de forma heterogênea no SNC e podem responder por várias propriedades farmacológicas proeminentes de seus agonistas, como por exemplo, a

capacidade de afetar a cognição e memória e alterar o controle da função motora (PERTWEE, 2001). Os receptores CB2 estão localizados principalmente em células do sistema imune, particularmente nas células B e células natural killer, mas também podem se expressar em neurônios. A distribuição desses receptores proporciona uma base anatômica para os seus efeitos analgésicos (GUINDON; HOHMANN, 2009).

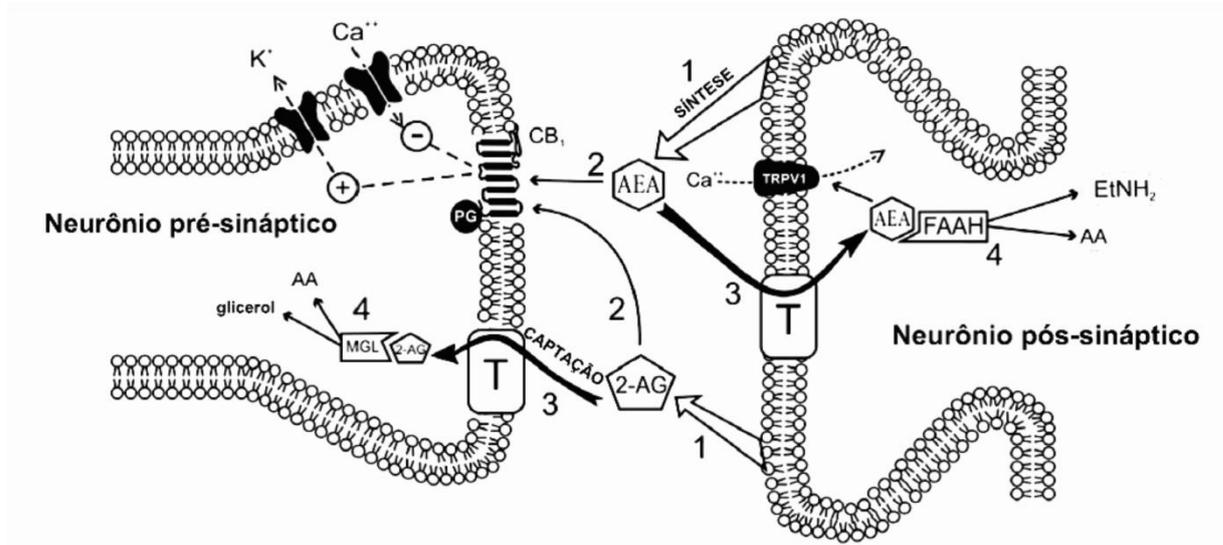
Os principais agonistas endógenos de CB1 e CB2 são os derivados do ácido araquidônico. A etanolamina araquidonoil, apelidada de anandamida, foi o primeiro endocanabinoide identificado, em seguida, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (DEVANE et al, 1992). Outros endocanabinoides já foram identificados, a dopamina-N-araquidonoil, o éter glicerol 2-araquidonoil e a etanolamina O-araquidonoil. Os endocanabinoides modulam diversos processos comportamentais que incluem apetite, cognição, emoção, processamento sensorial e nocicepção (DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009). Apesar de apresentarem estruturas químicas semelhantes, a anandamida e o 2-AG possuem vias distintas de síntese e degradação. Farmacologicamente, a anandamida funciona como um agonista parcial, enquanto o 2-AG é um agonista total do receptor CB1 (HU; HO; CHIOU, 2014).

#### 1.4.1 Mecanismo de ação

Os endocanabinoides são mensageiros atípicos, medeiam as mudanças de informações dos terminais pós-sinápticos aos pré-sinápticos de forma retrógrada. Além disso, são sintetizados sob demanda e não são armazenados em vesículas. As sínteses ocorrem nos neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio e ativação das fosfolipases que convertem os fosfolipídeos em endocanabinoides. Após serem sintetizados, atingem rapidamente a fenda sináptica por difusão simples ou assistidas e se acoplam aos receptores pré-sinápticos. A ativação dos receptores canabinoides resulta em uma diminuição do influxo de cálcio nos terminais axônicos e consequente diminuição da liberação do neurotransmissor (FIGURA 4). A ativação dos receptores canabinoides também ativa os canais de potássio e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (PIOMELLI, 2003).

A anandamida também se liga ao receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), esse receptor é ativado por calor, baixo pH e pela capsaicina. O TRPV1 é expresso nos neurônios pós-sinápticos, é possível que seja ativado pela anandamida ainda na forma intracelular. A ativação desse receptor pela anandamida promove uma despolarização aumentada das membranas pós-sinápticas (SAGAR et al, 2009).

Figura 4 – Representação esquemática da ação endocanabinoide



Fonte: SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010. 1 – Síntese dos endocanabinoides na membrana dos neurônios pós-sinápticos segundo a demanda e após influxo de cálcio; 2 – Ativação dos receptores pré-sinápticos e redução da atividade neural; 3 – Remoção da anandamida e do 2-AG pela capturação pós- e pré-sináptica, respectivamente; 4 – Hidrólise dos endocanabinoides pelas enzimas de metabolização. AEA: anandamida, 2-AG: 2-araquidonoil glicerol,  $Ca^{++}$ : Cálcio, FAAH: amida hidrolase de ácidos graxos, MGL: lipase monoacilglicerol, TRPV1: receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1.

As ações dos endocanabinoides são interrompidas por um processo que envolve a internalização seguida por catabolismo. A internalização dos canabinoides ocorre por meio de difusão passiva ou por transportadores específicos. Após a internalização, os endocanabinoides são hidrolisados por enzimas específicas, a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a lipase monoacilglicerol (MGL), que hidrolisam a anandamida e o 2-AG, respectivamente. A FAAH é localizada principalmente nos neurônios pós-sinápticos e a MGL nos neurônios pré-sinápticos (PIOMELLI, 2003).

#### 1.4.2 Modulação do sistema endocanabinoide sobre a nocicepção

Após a descoberta dos receptores canabinoides, os mecanismos analgésicos dos seus constituintes foram alvos de diversos estudos. A ação antinociceptiva dos canabinoides tem sido demonstrada em diversos modelos experimentais de dor aguda e de dor crônica. Os efeitos analgésicos são mediados tanto por CB1 a nível central como periférico (WARE et al., 2010; GONDIM et al, 2012). Agonistas seletivos CB2 também apresentam efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios significativos in vivo, oferecendo menores efeitos colaterais indesejáveis (KINSEY et al, 2011).

Alguns trabalhos apontam a participação do sistema endocanabinoide na modulação da neurotransmissão orofacial. Neurônios do complexo trigeminocervical foram estudados utilizando técnicas eletrofisiológicas extracelulares, o agonista não seletivo canabinoide, WIN55,212, inibiu as respostas nas fibras aferentes A e C, e tal efeito foi bloqueado por um antagonista CB1, mas não por um antagonista CB2 (AKERMAN; KAUBE; GOADSBY, 2007).

Em um modelo de dor inflamatória, o efeito antinociceptivo do WIN55,212 foi mediado pela ativação dos receptores CB1, e foi tão eficaz quanto o efeito antinociceptivo da morfina (BURGOS et al, 2010). Liang, Huang e Hsu (2007), no modelo de dor neuropática trigeminal também descreveram que o efeito antinociceptivo induzido pelo WIN55,212 é bloqueado por antagonistas seletivos de receptores CB1. Essas evidências sugerem que os receptores CB1 desempenham um papel mais importante do que os receptores CB2 no efeito antinociceptivo em modelos de dor orofacial.

Os canabinoides tem a capacidade de atenuar a nocicepção em um modelo animal de dor muscular aguda no masseter. Os efeitos ocorrem tanto pela administração de canabinoides sintéticos por via sistêmica como por via local e ambos os receptores estão envolvidos (SÁNCHEZ-ROBLES; BAGÜES; MARTÍN, 2012). O THC também apresentou resultados similares no mesmo modelo de dor muscular aguda (BAGÜES; MARTÍN; SÁNCHEZ-ROBLES, 2014).

Ware e col (2003) observaram que o uso da *cannabis* para o alívio da dor é maior em pacientes com dor miofascial mastigatória. A hipótese é que a ativação dos receptores CB1 localizados no terminal distal do nervo amorteceria as atividades de ativadores e sensibilizadores, desse modo, o receptor CB1 fecharia o canal de sódio e abriria o canal de potássio, tornando o nociceptor hiperpolarizado, prevenindo a sensibilização periférica e hiperalgesia, porém esse mecanismo não está totalmente claro na literatura (AGARWAL et al, 2007).

A administração sistêmica de canabinoides produz um efeito analgésico com uma eficácia semelhante à dos opioides (WALKER et al, 2001). Existe uma relação entre o sistema opioide e o sistema canabinóide, na qual os opioides endógenos medeiam a antinocicepção promovida pelos canabinoides, mostrando uma interação sinérgica entre os dois sistemas. A antinocicepção promovida pelos canabinoides parece ser modulada através de receptores opioides  $\mu$  a nível supraespinal, enquanto receptores  $\kappa$  modulam essa resposta a nível espinal (GONDIM et al, 2012).

À semelhança do sistema opioide, sabe-se que o sistema endocanabinoide atua na modulação da dor e alguns estudos mostram uma atividade modulatória na via nociceptiva trigeminal (GONDIM et al, 2012; NADAL et al, 2013). Entretanto, não existem estudos, até o momento, sobre a modulação exercida pelo sistema endocanabinoide sobre a atividade mastigatória parafuncional como nos casos de bruxismo. A busca por sistemas endógenos capazes de influenciar os mecanismos envolvidos na patogênese do bruxismo, bem como na dor miofascial desencadeada por essa disfunção, subsidia estudos que possam levar a descoberta de novos tratamentos para essas condições.

## 1.5 Justificativa

O bruxismo é uma desordem motora orofacial prevalente e tem uma associação positiva com a dor miofascial. Causa prejuízos funcionais e estéticos, influenciando de forma negativa na qualidade de vida dos pacientes. Possui etiologia multifatorial, entretanto, os fatores psicológicos são apontados como importantes fatores na precipitação e manutenção do bruxismo. Há uma estreita relação entre estresse, dor e aumento dos padrões eletromiográficos, onde a hiperatividade muscular gera a dor miofascial.

De acordo com o que foi descrito acima, pesquisas mostram a participação de opioides na modulação nociceptiva trigeminal e atividade muscular mastigatória. Sabe-se que há uma interação entre o sistema opioide e o sistema endocanabinoide na modulação da dor, e que receptores opioides modulam reflexos nociceptivos no aumento da atividade muscular mastigatória. O sistema canabinoide está envolvido na via nociceptiva trigeminal, porém não há estudos que mostrem o envolvimento desse sistema em condições parafuncionais, como o bruxismo.

O conhecimento sobre a participação do sistema canabinoide na dor e atividade muscular mastigatória no bruxismo, bem como os mecanismos envolvidos nessa resposta é essencial para o estabelecimento de um tratamento diferenciado, que permitirá manejar a sintomatologia e com isso alcançar um maior índice de sucesso no tratamento dessa disfunção, principalmente nos casos que envolvem a dor miofascial crônica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a atividade muscular mastigatória, nocicepção associada e participação do sistema endocanabinoide no comportamento bruxismo-símile em ratos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade muscular mastigatória de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Avaliar as alterações no limiar nociceptivo orofacial de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Avaliar o comportamento de ansiedade em ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Analisar o peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Avaliar as alterações da glândula adrenal (peso bruto e aspectos histomorfológicos) em ratos submetidos ao estresse emocional;
- Avaliar a expressão de c-Fos e receptores canabinoides CB1 e CB2 na região do gânglio trigeminal e do trato espinhal do trigêmeo de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Estudar o efeito do antagonista canabinoide CB1 (AM 251) no limiar nociceptivo orofacial de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional;
- Avaliar a expressão de receptores canabinoides CB1 e CB2 no músculo masseter de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional e tratados com antagonista canabinoide CB1 (AM 251).

## 3 MATERIAS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram utilizados 8 animais por grupo experimental, totalizando 55 animais. Os animais foram mantidos em gaiolas, em uma sala especial sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, sendo oferecido ração e água *ad libitum* e permaneceram nestas mesmas condições durante todos os dias do experimento.

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, sob o protocolo número 35/13 (ANEXO A).

#### 3.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- Estressados emocionalmente (ESTRESSE)
- Não estressados emocionalmente (CONT)
- Emissores de estresse com choque elétrico na pata (CP)

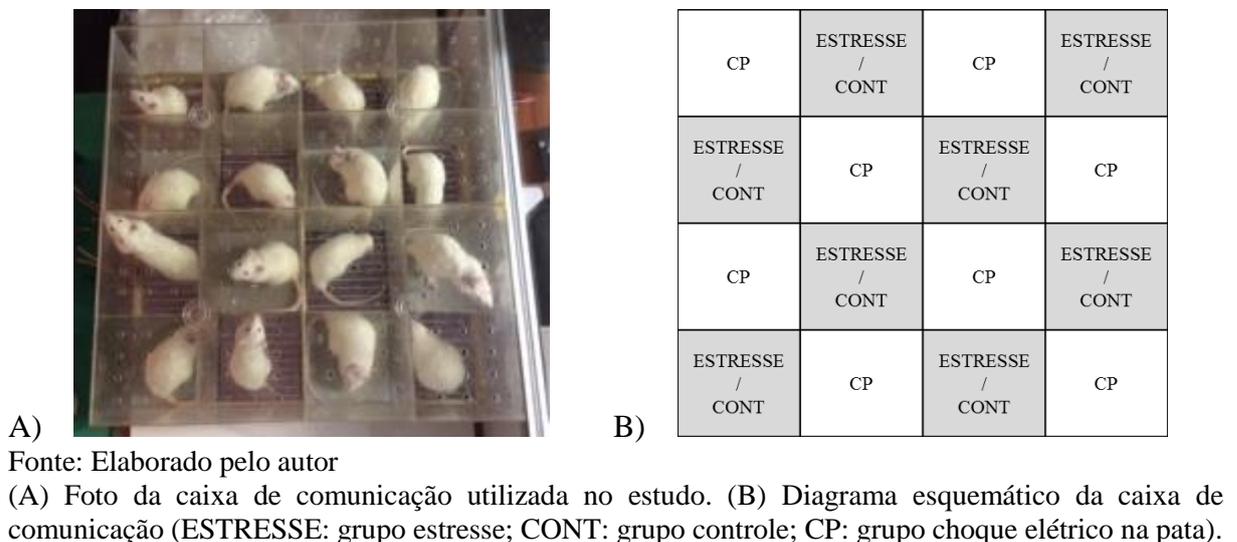
### 3.2 Modelo de Estresse Emocional

A caixa de comunicação foi utilizada como instrumento de estresse emocional para induzir um comportamento bruxismo-símile nos animais (ROSALES et al, 2002). A caixa consiste de 16 compartimentos (16x16 cm), separados por placas de plástico transparente com vários orifícios pequenos. As placas impedem o contato físico entre os animais, mas permite o contato visual, auditivo e sensações olfativas dos animais vizinhos. Os compartimentos foram equipados com um piso de hastes de aço inoxidável vazado (5mm de diâmetro e 1,3 cm colocados à parte). Um eletroestimulador (LE 12406, Panlab Harvard Apparatus) de corrente contínua (1Hz) foi ligado ao pavimento das hastes de aço para produzir uma corrente elétrica de 40V, gerando um choque elétrico na pata do animal durante 10 segundos com um intervalo de 60 segundos. Os pisos de oito compartimentos foram

cobertos por placas de plástico para evitar choque elétrico e serviu como compartimento não choque para os ratos dos grupos estresse e controle (FIGURA 5).

Antes do dia de início da estimulação do estresse, os ratos foram confinados nos compartimentos da caixa durante uma hora, sem qualquer choque elétrico, durante 5 dias, a fim de adaptá-los ao ambiente. O período do estresse emocional durou 14 dias, onde os animais eram colocados no mesmo compartimento da caixa do período de adaptação. Os animais CP receberam choque elétrico na pata durante 1 hora (10 segundos com um intervalo de 60 segundos), os animais ESTRESSE no compartimento não choque foram então expostos a estímulos emocionais dos animais vizinhos, como vocalizações, cheiro de urina ou fezes e resposta de salto. Conseqüentemente, os animais ESTRESSE eram considerados em um estado de medo ou de ansiedade. Os animais CONT também foram confinados no compartimento não-choque, mas sem qualquer choque elétrico, após a retirada os animais ESTRESSE. Os animais do grupo CP só foram utilizados para emissão do estresse, não sendo avaliados em nenhum parâmetro.

Figura 5 – Caixa de comunicação

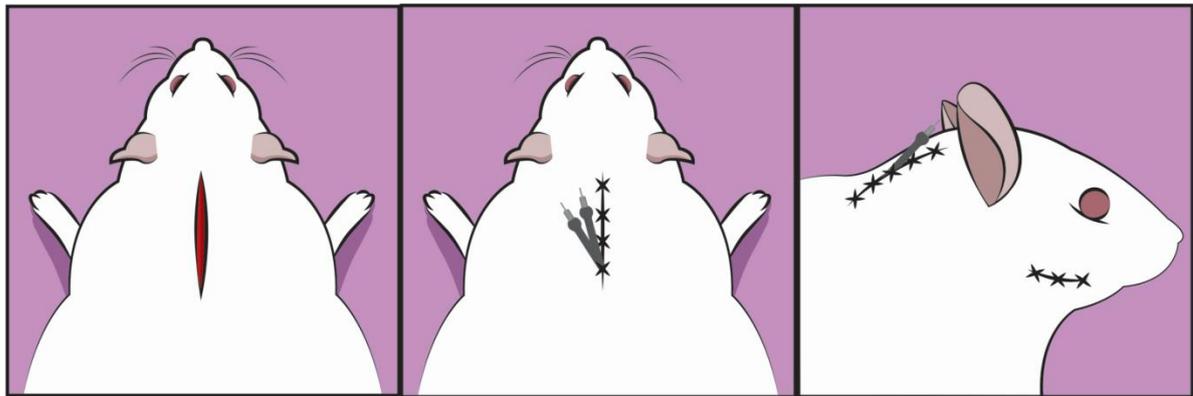


### 3.3 Cirurgia para implantação de eletrodos

Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg), via intraperitoneal (i.p.) e posicionados em decúbito ventral. Foi realizada uma incisão na superfície dorsal ao nível das escápulas. Dois eletrodos de fio de cobre revestidos por polietileno (1mm de diâmetro, confecção própria), medindo 6,0cm e 6,5cm cada, foram posicionados sobre os músculos masseter e temporal direito por via subcutânea. A ponta de

cada eletrodo foi exposta para ficar em contato direto com os músculos. Outra incisão foi feita sobre a face de cada músculo, para avaliar o correto posicionamento dos eletrodos, em seguida os eletrodos foram suturados ao tecido para evitar deslocamento. A outra ponta ficou exposta no dorso para conexão com o cabo do aparelho de eletromiografia (FIGURA 6). O método da cirurgia foi adaptado de acordo com o proposto por Rosales e col (2002). Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em caixas individuais.

Figura 6 – Cirurgia para implantação de eletrodos



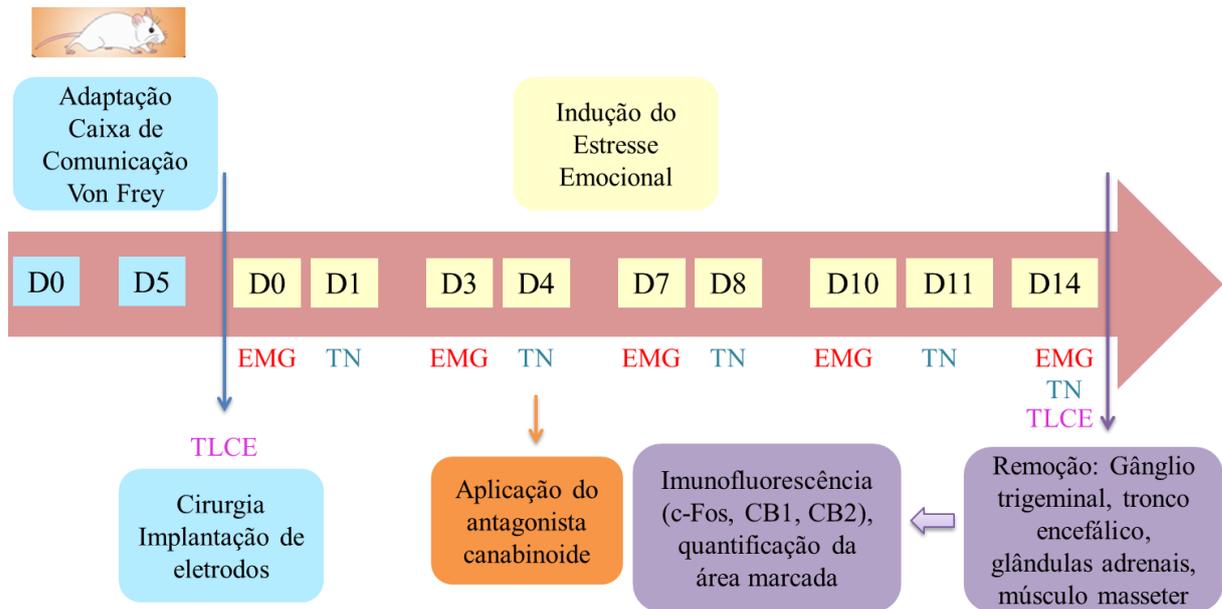
Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.4 Protocolo Experimental

Inicialmente, os animais foram adaptados na caixa de comunicação e no teste nociceptivo durante cinco dias. No dia seguinte foi realizada a cirurgia para implantação dos eletrodos, os animais foram colocados individualmente em caixas separadas, a fim de evitar contato com os outros animais para impedir a quebra dos eletrodos. O registro basal da EMG foi feito em um dia após a cirurgia (D0) e o registro basal do teste nociceptivo foi realizado no primeiro dia do estresse emocional (D1), antes do estímulo. O estresse emocional foi induzido por 14 dias consecutivos com coletas periódicas dos registros eletromiográficos e do teste nociceptivo. Posteriormente os animais foram sacrificados e coletados os tecidos (gânglio trigeminal, trato espinhal trigeminal e glândulas adrenais) para análise (FIGURA 7).

O ganho de peso corporal foi observado durante o período da indução do estresse emocional, os animais foram pesados em uma balança semianalítica (Marte BL3200H) no primeiro dia (D1), antes do estímulo, no sétimo dia (D7) e décimo quarto dia (D14) do estresse emocional.

Figura 7 – Esquema ilustrativo do protocolo experimental



Fonte: Elaborado pelo autor

(EMG: Eletromiografia; TN: Teste nociceptivo; TLCE: Teste do labirinto em cruz elevado)

### 3.5 Aplicação do antagonista canabinoide

O antagonista canabinoide AM 251 (antagonista CB1) (1,0 mg/kg, i.p., Tocris Bioscience, Bistol) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%, com volume de 1ml/kg, foi administrado nos dias 4, 5 e 6 da indução do estresse emocional, 30 minutos antes do estímulo na caixa de comunicação.

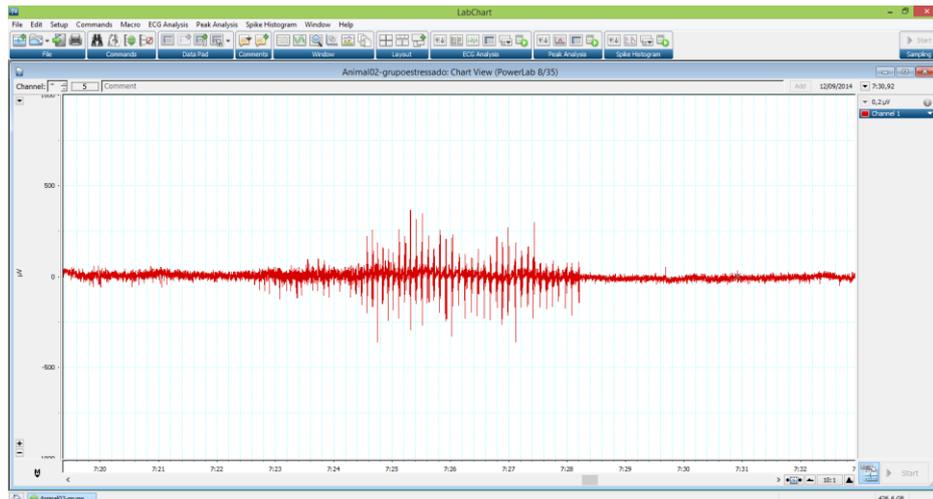
### 3.6 Eletromiografia

#### 3.6.1 Registro

A eletromiografia (EMG) foi utilizada para avaliação da atividade mioelétrica dos músculos masseter e temporal dos ratos estresse e controle. A captação dos sinais mioelétricos foi realizada pelo aparelho PowerLab 8/35 (ADInstruments). Os sinais captados através dos eletrodos passaram por um amplificador e filtro, possibilitando a apresentação na tela de um computador as imagens do registro (FIGURA 8). Os eletrodos foram ligados no amplificador por um cabo de cobre. Os registros eletromiográficos foram feitos através do software LabChart 7.3 (ADInstruments), com range 1mV, Low pass 1KHz, High pass 0,3Hz, durante 10 minutos.

O registro da EMG foi realizado um dia antes da indução do estresse emocional para gravar a atividade do tônus basal muscular, durante e após o período de indução do estresse de acordo com o protocolo experimental. Durante o registro eletromiográfico os animais permaneceram nas suas gaiolas individuais, onde se movimentavam livremente.

Figura 8 – Registro eletromiográfico



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.6.2 Análise

Os dados eletromiográficos foram analisados através do software pCLAMP 10, onde foi quantificado o número de picos no registro, correspondente ao número de disparos da musculatura. A quantidade de picos foi dividida pelo tempo em segundos (s), obtendo a frequência de picos para cada dia de registro. A frequência dos dias registrados foi dividida pela frequência basal (primeiro registro), realizado antes da indução do estresse emocional, correspondendo à frequência relativa ao basal.

### 3.7 Teste Nociceptivo – Hipernocicepção mecânica

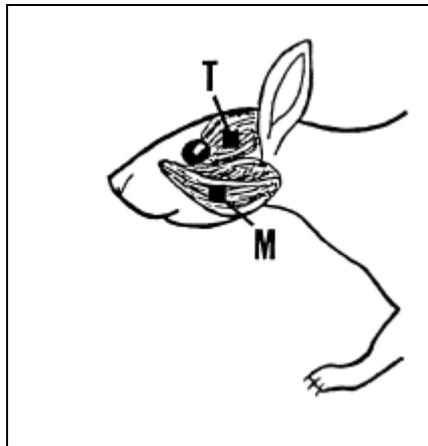
O limiar de nocicepção do animal foi obtido através do registro da intensidade de força aplicada na região do músculo masseter e do músculo temporal, necessário para obtenção de uma resposta reflexa (movimento de retirada da cabeça). Para isso, o aparelho Von Frey eletrônico (Analgesímetro Digital, Insight, São Paulo, Brasil), que é um transdutor

de força que mede o limiar de nocicepção em gramas (g), sendo aplicado perpendicularmente na região avaliada.

Os animais do grupo estresse e controle foram submetidos a sessões de condicionamento ao teste de hipernocicepção mecânica antes da indução do estresse emocional, durante 5 dias. Os animais foram mantidos durante 10 min em caixas plásticas e submetidos a aplicação do aparelho Von Frey na região dos músculos masseter e temporal esquerdo (FIGURA 9). O teste basal foi realizado no primeiro dia do estresse emocional, antes de iniciar o estímulo. Medidas do teste foram realizadas durante e depois do período da indução do estresse emocional, de acordo com o protocolo experimental, meia hora depois do estímulo na caixa de comunicação.

Um observador foi treinado para a aplicação gradual de pressão na região do músculo do animal e o aparelho foi automaticamente removido, o registro da pressão em gramas foi obtido assim que o animal realizou o movimento de retirada da cabeça (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Figura 9 – Local de aplicação do Von Frey



Fonte: Adaptado de COUSINS; ATHERTON; SALAMONE (1998)

### 3.8 Teste do labirinto em cruz elevado (TLCE)

O labirinto em cruz elevado é baseado no modelo proposto em ratos por Pellow et al (1985), consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 cm) também opostos, em forma de cruz. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). Os braços fechados apresentam paredes de 40 cm de altura, com a

porção superior aberta. A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em madeira. O aparelho está elevado a 50 cm do chão.

O TLCE foi realizado em uma sala iluminada artificialmente, com temperatura controlada, no laboratório de Neurofarmacologia da UFC. Cada animal foi submetido ao teste duas vezes, antes e no último dia de indução do estresse emocional, 30 minutos após o estímulo na caixa de comunicação. Os animais foram colocados no centro do labirinto e observados durante cinco minutos por um pesquisador treinado. Após cada teste, o labirinto foi cuidadosamente limpo com álcool para eliminar o odor dos animais testados anteriormente. Uma entrada em cada braço foi considerada quando o animal colocava os quatro membros em um braço aberto ou fechado. Foi registrado o tempo de permanência nos braços abertos e fechados e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Os resultados foram convertidos posteriormente em porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos ( $\text{tempo (s) nos braços abertos} \times 100 / \text{tempo total de observação}$ ), em porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados ( $\text{tempo (s) nos braços fechados} \times 100 / \text{tempo total de observação}$ ), em porcentagem de tempo de permanência o centro do labirinto ( $\text{tempo (s) no centro} \times 100 / \text{tempo total de observação}$ ), número de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados. A preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados representa um índice fidedigno de ansiedade, sendo que quanto maiores os níveis de ansiedade, menor o número de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (CAMPOS et al, 2013).

### **3.9 Remoção dos tecidos**

#### **3.9.1 Remoção do gânglio trigeminal e trato espinhal trigeminal**

Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg), via i.p., em seguida foi realizada perfusão intracardíaca com 60 ml de solução salina, seguido de uma solução contendo paraformaldeído (PFA) 4%, 0,02% de ácido pícrico em 0.1M de tampão fosfato. O gânglio trigeminal e a região Sp5C do tronco encefálico foram removidos e pós-fixados por 2 horas na mesma solução de PFA 4% e depois feito crioproteção com solução de sacarose 30% durante 72 horas. Os tecidos coletados foram então congelados com meio Tissue-Tek OTC (-70°C) e para a realização de cortes histológicos (10µm de espessura) em criostato (Leica CM1850) a -24°C, em seguida foram fixados em lâminas silanizadas para a realização de imunofluorescência.

No laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer (LAFICA), Cavalcante et al (2013) localizaram a área a ser retirada por estereotaxia do núcleo espinal do trigêmeo (subnúcleo caudal), utilizando um atlas de cérebro de rato. Na peça anatômica foi identificado o óbex e com o auxílio do paquímetro mediu-se 5 milímetros a partir dessa região onde a porção caudal foi delimitada com o auxílio de uma matriz de acrílico específica para cérebro de rato (Insight, Ribeirão Preto).

### 3.9.2 Remoção das glândulas adrenais e do músculo masseter

Após a perfusão intracardíaca, foi realizada uma incisão na pele e tecido subcutâneo na linha média, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Após a visualização dos órgãos abdominais, foi pinçada a gordura peri-renal abaixo da adrenal, removendo as glândulas. A gordura envolta das glândulas foi removida, posteriormente as glândulas foram pesadas numa balança analítica (Mettler Toledo AL204).

Foi realizada uma incisão na região da face sobre o masseter. Após a exposição completa o músculo foi removido e posteriormente fixado em formol.

### 3.10 Preparação de lâminas histológicas

As glândulas adrenais e o músculo masseter foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Em seguida, foram colocados em álcool a 70% por mais 24 h e processados para inclusão em parafina. Foram realizados corte seriados de 4 µm de espessura. Os cortes das glândulas adrenais foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histológica qualitativa e quantitativa.

As lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio (Leica DM 2000), com aumento de 400x e 1000x. Nas glândulas adrenais, foi observada a região da zona fasciculada no córtex, quantificando a área dos vacúolos citoplasmáticos. Para isso, foi utilizado o programa Image J.

### 3.11 Imunofluorescência para c-Fos, CB1 e CB2 no gânglio trigeminal, trato espinal trigeminal e músculo masseter

Os cortes foram fixados em metanol (para c-Fos) e em acetona (para CB1 e CB2) por 2 minutos e ficaram imersos em PBS até o momento de começar a imunofluorescência.

Em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M (pH 6,0), sob aquecimento em forno micro-ondas, por 18 minutos, à temperatura de 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente, por 20 minutos, foi feita a permeabilização da membrana nuclear (para c-Fos) com Triton X-100 (0,2%) e foi feito o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 5% acrescida de glicina 0,3M por 30 minutos para todas as lâminas. Os cortes foram lavados com PBS e incubados, durante a noite, à temperatura de 4°C, com o anticorpo primário feito em coelho anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology®) nas lâminas dos gânglios trigeminais e trato espinhal, ou anti-CB1 (Abcam®) ou anti-CB2 (Santa Cruz Biotechnology®) na diluição 1:200 em BSA 5%. As lâminas foram lavadas e incubadas, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo secundário anti-igG de coelho Alexa flúor 568 (Invitrogen®) na diluição de 1:400 em BSA 5%. Para a marcação dos neurônios, os cortes foram incubados, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo NeuN conjugado com Alexa Flúor 488 (Merck Millipore®) na diluição de 1:100 em BSA 5%. Em todas as lâminas para CB1 e CB2 foram lavadas com PBS e DAPI por 30 minutos, em seguida todas as lâminas foram lavadas com PBS, montadas com ProLong® Gold (Invitrogen®) e fotografadas no microscópio confocal (LM 710, Zeiss).

A quantificação da área marcada nas fotos foi feita diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelha e verde). Para isso, foi utilizado o programa Fiji Image J. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada à marcação positiva para um determinado marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados foram definidos previamente.

### **3.12 Análise Estatística**

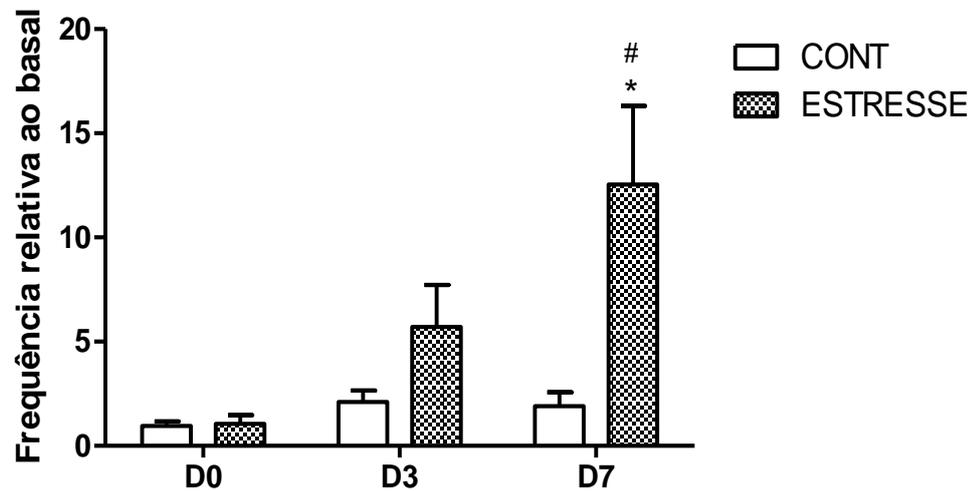
Os dados foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita usando o teste t de Student, análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls para comparação de medidas repetidas e Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Significância estatística foi observada quando  $p < 0,05$ . Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Prisma 5.0 da *GraphPad Software*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da atividade muscular mastigatória de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

Durante o registro basal em D0 não houve diferenças estatísticas ( $p=0,75$ ) entre o grupo ESTRESSE ( $0,379 \pm 0,145$ ) e o grupo CONT ( $0,433 \pm 0,098$ ). No registro eletromiográfico em D3 da estimulação do estresse emocional, houve um aumento da frequência de picos relativa ao basal no grupo ESTRESSE ( $3,749 \pm 1,058$ ) em relação ao grupo CONT ( $2,157 \pm 0,582$ ), mas sem diferença significativa ( $p=0,17$ ). Já em D7, o grupo ESTRESSE apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de picos relativa ao basal ( $11,400 \pm 3,999$ ) quando comparado ao grupo CONT ( $1,696 \pm 0,732$ ) (FIGURA 10). Não houve animais suficientes com eletrodos intactos até o final da indução do estresse emocional para registro e análise estatística.

Figura 10 – Efeito do estresse emocional sobre a atividade muscular mastigatória em registro eletromiográfico

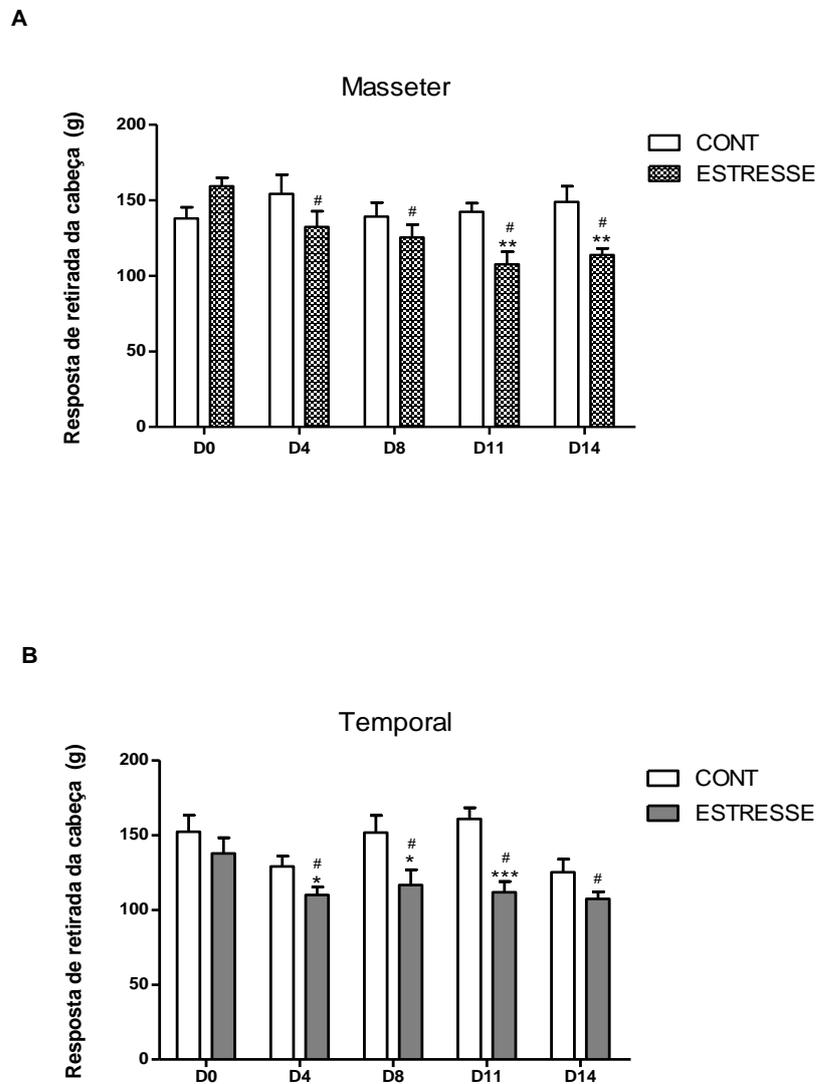


A figura representa o gráfico da frequência de picos do registro eletromiográfico dos músculos masseter e temporal de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE) que foi avaliada antes da indução de estresse (D0), 3º dia (D3) e 7º Dia (D7) pós-indução. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da frequência de picos relativa ao basal de 8 animais por grupo. O asterisco indica a diferença significativa entre os dois grupos nos dias específicos (teste t de Student,  $*p < 0,05$ ). #representa diferença significativa na frequência dos animais estressados comparados com D0 (ANOVA, seguido de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

#### **4.2 Análise do limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

O estresse emocional promoveu alterações no limiar nociceptivo no músculo masseter na resposta de retirada da cabeça a um estímulo mecânico (força em grama), a partir de D4 nos animais estressados ( $132,4 \pm 10,3$ ), mas sem diferenças significativas quando comparado com o grupo controle ( $154,2 \pm 12,7$ ). O pico da alteração do limiar nociceptivo foi observado em D11 no grupo ESTRESSE ( $107,7 \pm 8,2$ ) de forma significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo CONT ( $142,3 \pm 5,8$ ). A alteração do limiar nociceptivo se manteve significativa ( $p < 0,01$ ) até o fim do estresse emocional, ou seja, em D14, no grupo estressado ( $113,8 \pm 4,4$ ) (FIGURA 11A). O limiar nociceptivo do músculo temporal diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir de D4 no grupo estressado ( $110,0 \pm 5,2$ ) em relação ao grupo controle ( $129,1 \pm 6,9$ ). Durante a estimulação do estresse emocional, o limiar nociceptivo continuou diminuído no músculo temporal com um pico em D11, o grupo estresse ( $111,8 \pm 7,1$ ) apresentou diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle ( $160,9 \pm 7,4$ ) (FIGURA 11B).

Figura 11 – Efeito do estresse emocional sobre limiar nociceptivo na região dos músculos mastigatórios masseter e temporal em ratos



A figura representa os gráficos do limiar nociceptivo, mensurado através da resposta de retirada da cabeça a um estímulo mecânico (força em grama) na região dos músculos mastigatórios masseter (A) e temporal (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE) que foi avaliado nos dias D0, D4, D8, D11 e D14 na estimulação do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da resposta de retirada da cabeça em gramas de 8 animais por grupo. O asterisco indica a diferença significativa entre os dois grupos (teste t de Student,  $*p < 0,05$ ,

\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). #representa diferença significativa na resposta dos animais estressados comprados com D0 (ANOVA, seguido de Newman-Keuls, p< 0,05).

### 4.3 Análise do comportamento de ansiedade de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

O comportamento de ansiedade foi avaliado no TLCE através do número de entradas no braço aberto e da porcentagem do tempo de permanência no braço aberto. Antes do estímulo do estresse emocional não houve diferença sobre o comportamento dos animais em ambos os grupos. Os animais do grupo estresse exibiram menor número de entradas no braço aberto ( $3,2 \pm 0,3$ ), de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle ( $4,8 \pm 0,6$ ) no final do período de indução do estresse emocional. Além disso, os animais estressados apresentaram menor tempo significativo ( $p < 0,05$ ) dispendido no abraço aberto ( $13,4 \pm 2,1$ ), quando comparado com o grupo controle ( $23,5 \pm 2,9$ ) (TABELA 1).

Tabela 1 – Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado antes e após o período de indução do estresse emocional

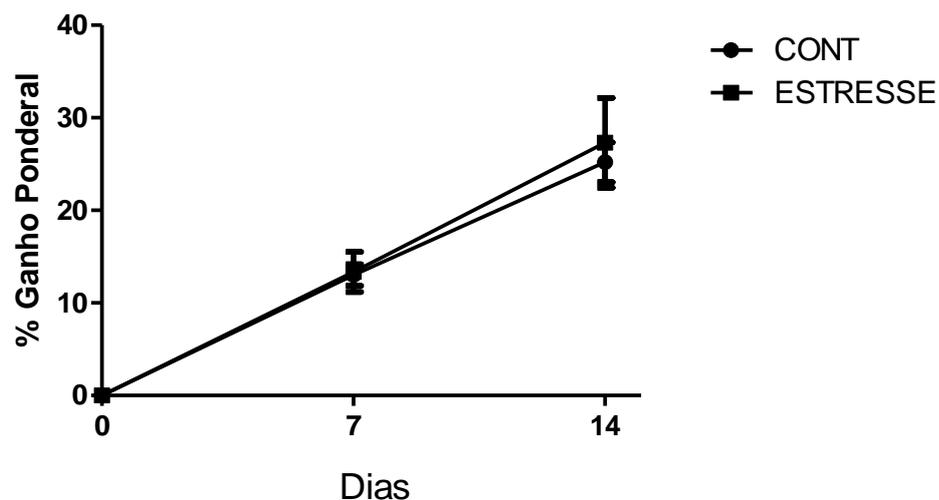
Variáveis	Pré-estímulo			Pós-estímulo		
	Média ± EPM		P	Média ± EPM		P
	CONT	ESTRESSE		CONT	ESTRESSE	
<b>Número de entradas no braço aberto</b>	3,2±0,6	3,0±0,4	0,75	4,8±0,6	3,2±0,3	0,04*
<b>% tempo permanência no braço aberto</b>	21,5±5,2	15,8±1,4	0,29	23,5±2,9	13,4±2,1	0,01*
<b>Número de entradas no braço fechado</b>	7,3±0,7	6,5±0,8	0,44	8,0±0,7	7,8±0,5	0,82
<b>% tempo permanência no braço fechado</b>	34,7±5,6	41,7±3,8	0,32	48,4±4,3	43,8±3,1	0,39

Fonte: Dados da pesquisa. CONT: animais controles; ESTRESSE: animais estressados; EPM: erro padrão da média. \*p<0,05, teste t de Student

#### 4.4 Análise do ganho de peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

O ganho de peso dos animais foi monitorado durante o estímulo do estresse emocional. Os animais do grupo estresse ( $13,3 \pm 2,1$ ) ganharam peso durante os primeiros setes dias do estímulo, sem diferenças significativas ( $p=0,89$ ) em relação ao grupo controle ( $13,0 \pm 1,1$ ). Houve um aumento no ganho de peso até o fim do estresse emocional nos grupos estresse ( $27,3 \pm 4,8$ ) e controle ( $25,5 \pm 2,1$ ), sem diferença estatística (FIGURA 12).

Figura 12 – Efeito do estresse emocional sobre o ganho de peso corporal

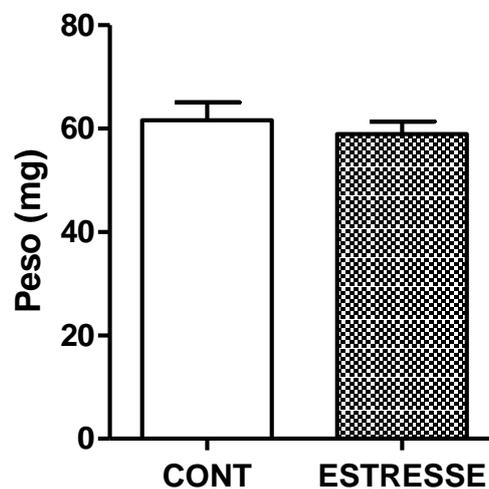


A figura representa o gráfico da porcentagem de ganho de peso de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE) que foi avaliada antes da indução de estresse (D0), 7º dia (D7) e 14º Dia (D14) pós-indução. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da porcentagem de ganho ponderal de 8 animais por grupo.

#### 4.5 Análise do peso bruto das glândulas adrenais de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

O estresse emocional não apresentou nenhum efeito significativo sobre o peso bruto das glândulas adrenais em miligramas (mg) dos animais grupo ESTRESSE ( $58,9 \pm 2,4$ ) em relação ao grupo CONT ( $61,6 \pm 3,4$ ) (FIGURA 13).

Figura 13 – Efeito do estresse emocional sobre o peso bruto das glândulas adrenais

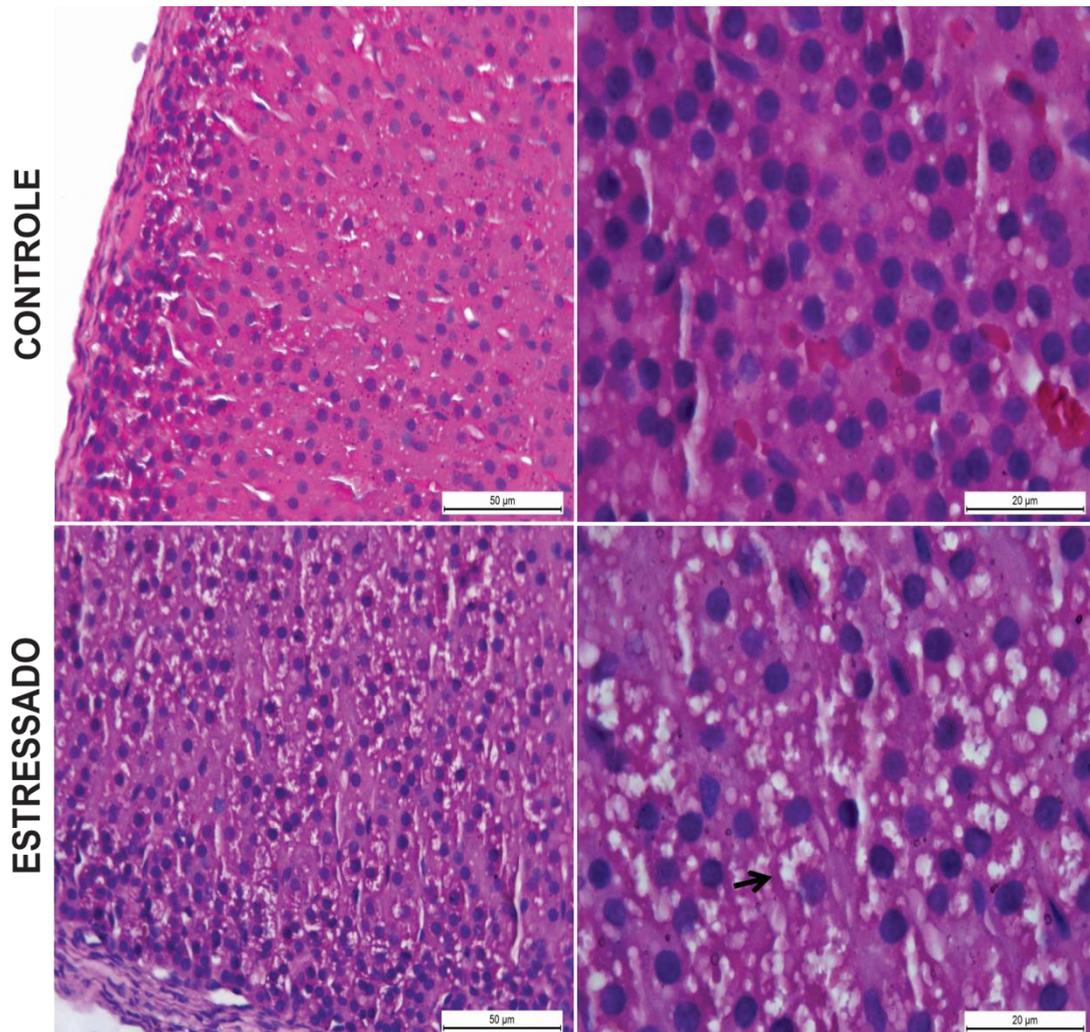


A figura representa o gráfico do peso bruto em miligramas (mg) das glândulas adrenais de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE) que foi mensurado no final do estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM do peso em mg de 8 animais por grupo.

#### 4.6 Análise histológica das glândulas adrenais de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

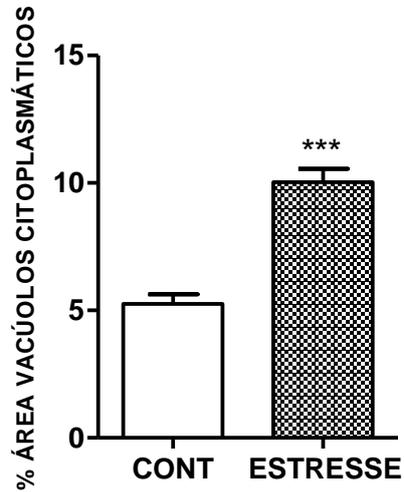
A análise histológica do córtex das glândulas adrenais demonstrou perfis diferentes entre os grupos estresse e controle após o estresse emocional. A zona fasciculada do córtex das adrenais dos animais do grupo ESTRESSE apresentou uma maior concentração de vacúolos citoplasmáticos, que foram pouco visualizados nos animais do grupo controle (FIGURA 14). A quantificação dos vacúolos citoplasmáticos foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) no grupo estressado ( $10,0 \pm 0,5$ ) em relação ao grupo controle ( $5,2 \pm 0,3$ ) (FIGURA 15).

Figura 14 – Fotomicrografia do córtex das glândulas adrenais de ratos submetidos ao estresse emocional



A seta indica a presença dos vacúolos citoplasmáticos. Aumento de 400x e 1000x

Figura 15 – Quantificação da porcentagem da área (pixels) de vacúolos citoplasmáticos no córtex das glândulas adrenais de ratos submetidos ao estresse emocional

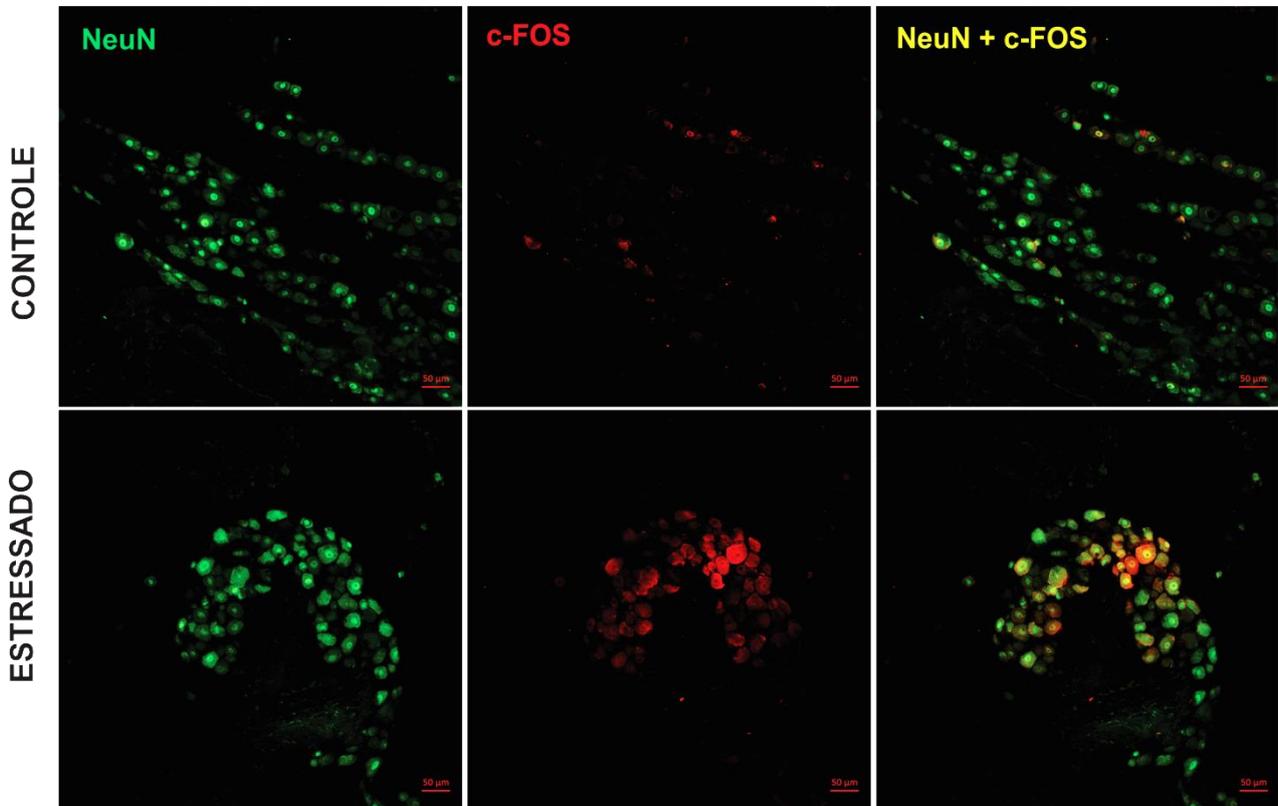


A figura representa o gráfico da porcentagem de área dos vacúolos citoplasmáticos de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área de vacúolos citoplasmáticos de 15 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student, \*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### **4.7 Análise da expressão de c-Fos no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

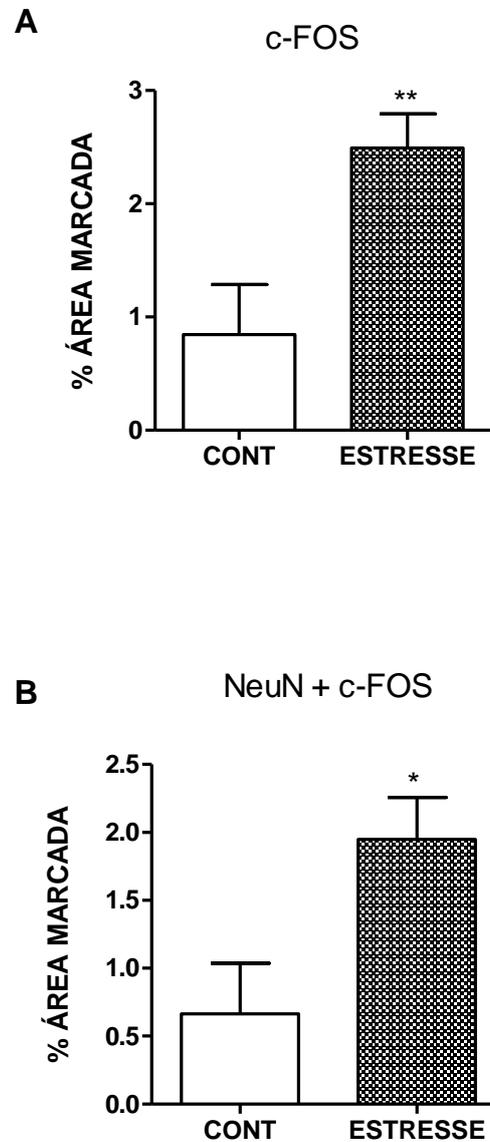
Na análise de imunofluorescência foi observado que o estresse emocional induziu uma maior expressão de c-Fos no gânglio trigeminal (FIGURA 16). Os animais do grupo estressado ( $2,49 \pm 0,30$ ) apresentaram imunoexpressão significativamente maior ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle ( $0,84 \pm 0,44$ ). A co-marcação de c-Fos juntamente com NeuN foi maior significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo estressado (FIGURA 17). Esse mesmo resultado também foi visto no trato espinhal trigeminal (FIGURA 18). O grupo ESTRESSE ( $2,26 \pm 0,47$ ) apresentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) maior expressão de c-Fos, quando comparado com o grupo CONT ( $0,50 \pm 0,20$ ), além do aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na co-marcação de c-Fos com NeuN (FIGURA 19).

Figura 16 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



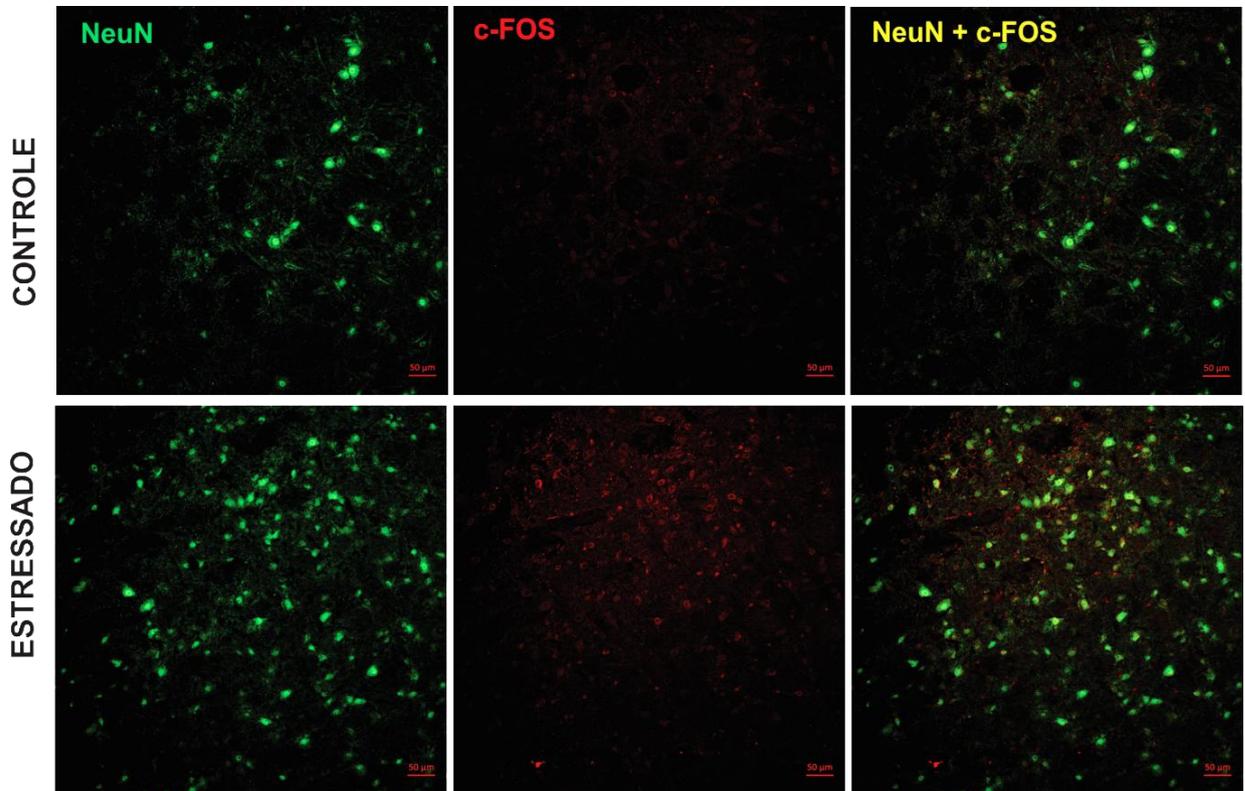
Vermelho: c-FOS; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 400x

Figura 17 – Quantificação da porcentagem a área marcada (pixels) da imunopressão de c-Fos no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



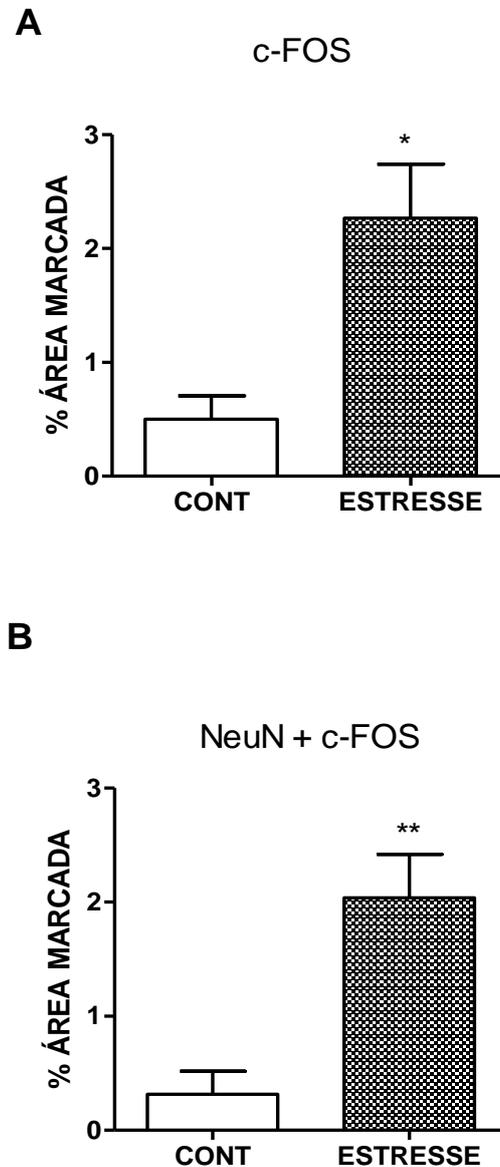
A figura representa os gráficos da porcentagem (%) da área marcada pela imunopressão no gânglio trigeminal de c-Fos (A) e pela co-marcação c-Fos junto com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de pelo menos 6 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Figura 18 – Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no trato espinal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



Vermelho: c-FOS; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 200x

Figura 19 – Quantificação da porcentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão de c-Fos no trato espinal trigeminal de animais submetidos ao estresse emocional

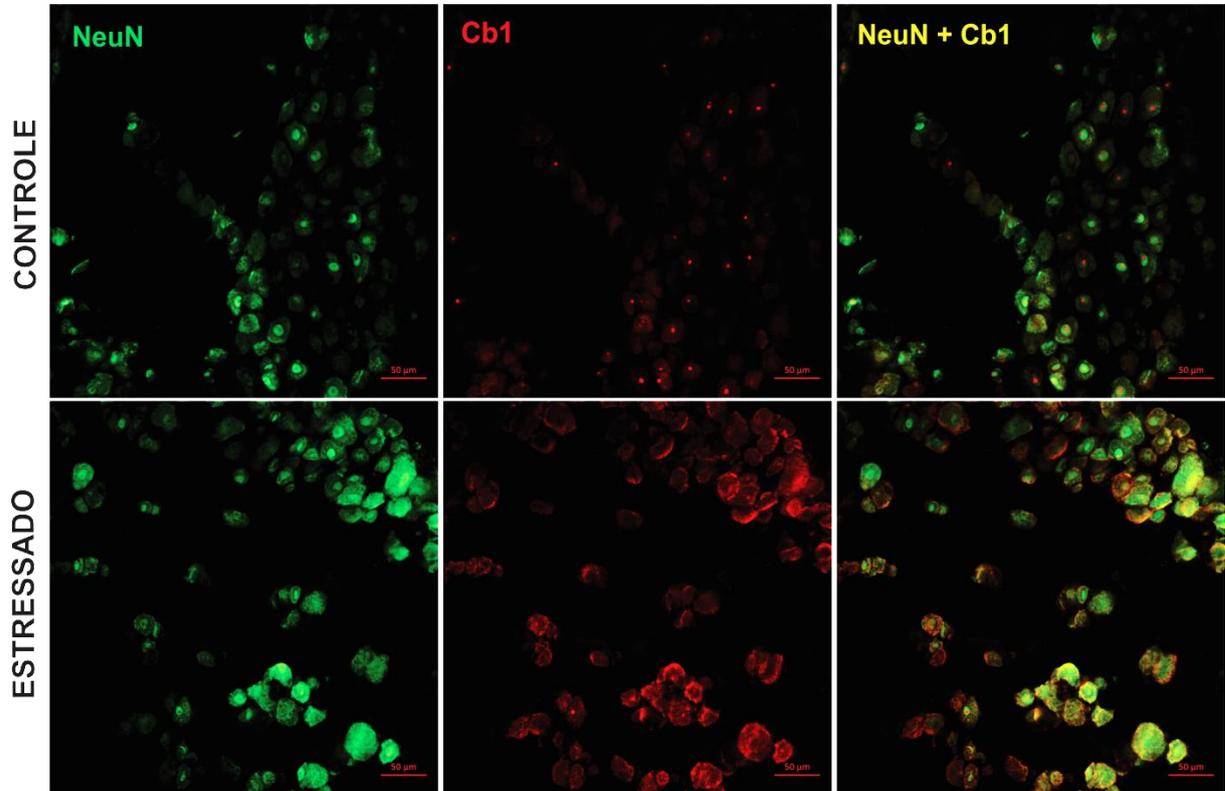


A figura representa os gráficos da porcentagem da área marcada pela imunoexpressão no trato espinal trigeminal de c-Fos (A) e pela co-marcação c-Fos com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de pelo menos 6 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

#### **4.8 Análise da expressão de receptores CB1 no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

Na análise de imunofluorescência foi observada a expressão de receptor CB1 nos dois grupos estudados. No gânglio trigeminal (FIGURA 20), os animais estressados ( $11,55 \pm 1,79$ ) apresentaram expressão do receptor CB1 significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em relação ao grupo controle ( $5,46 \pm 1,22$ ) no D14. O mesmo resultado foi observado na co-marcação de CB1 juntamente com NeuN, os animais estressados ( $10,17 \pm 1,89$ ) exibiram uma co-marcação significativamente maior quando comparado aos animais controle ( $4,84 \pm 0,86$ ) (FIGURA 21). No trato espinhal trigeminal (FIGURA 22), o receptor CB1 foi expresso nos dois grupos, controle ( $0,72 \pm 0,13$ ) e estresse ( $0,93 \pm 0,11$ ), sem diferenças significativas. Na co-marcação de CB1 e NeuN, também não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo controle ( $0,68 \pm 0,12$ ) e o grupo estresse ( $0,69 \pm 0,08$ ) (FIGURA 23).

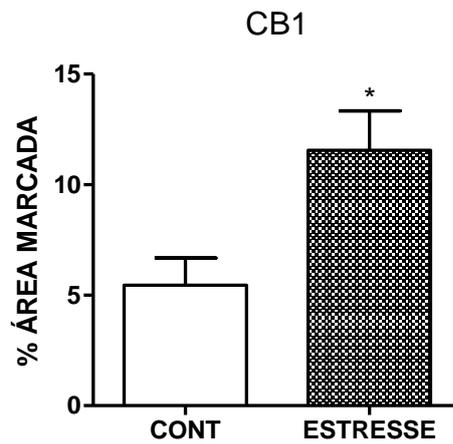
Figura 20 – Fotomicrografia da imunexpressão do receptor CB1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



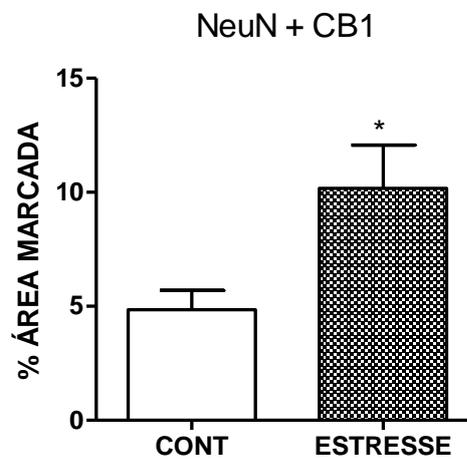
Vermelho: CB1; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 400x

Figura 21 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional

**A**

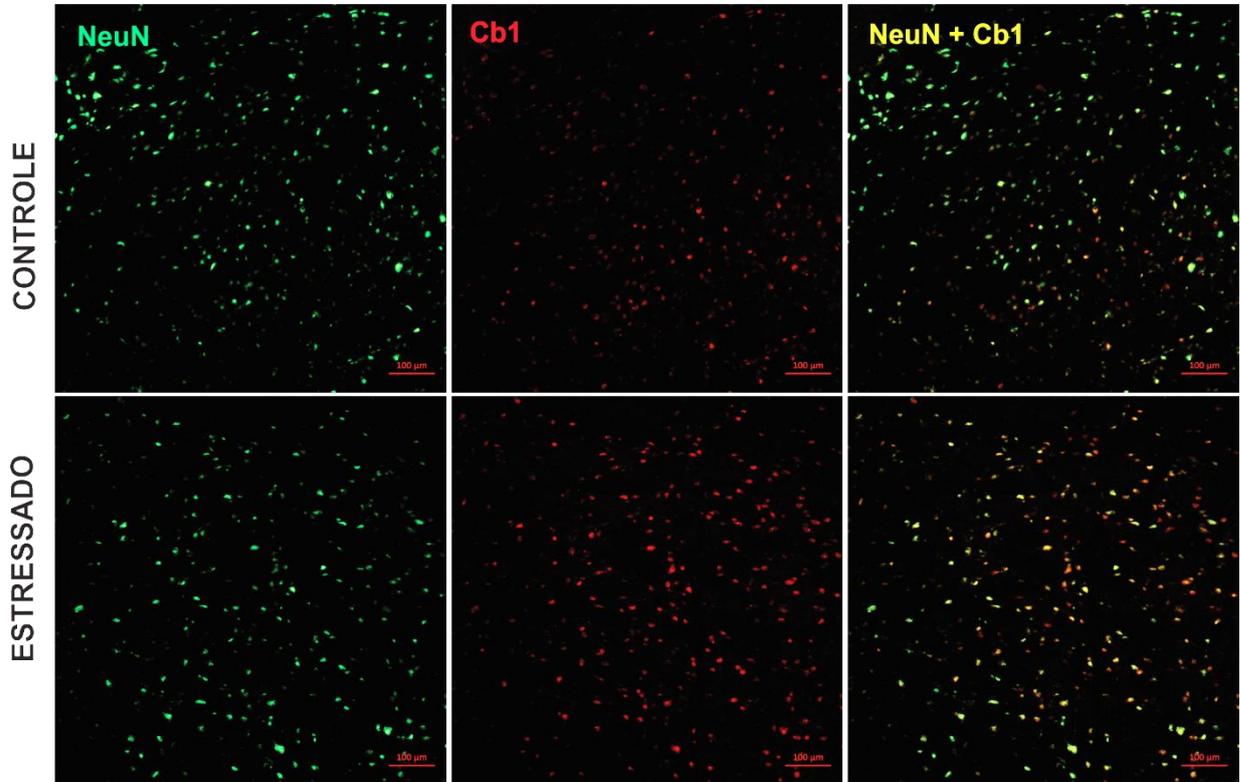


**B**



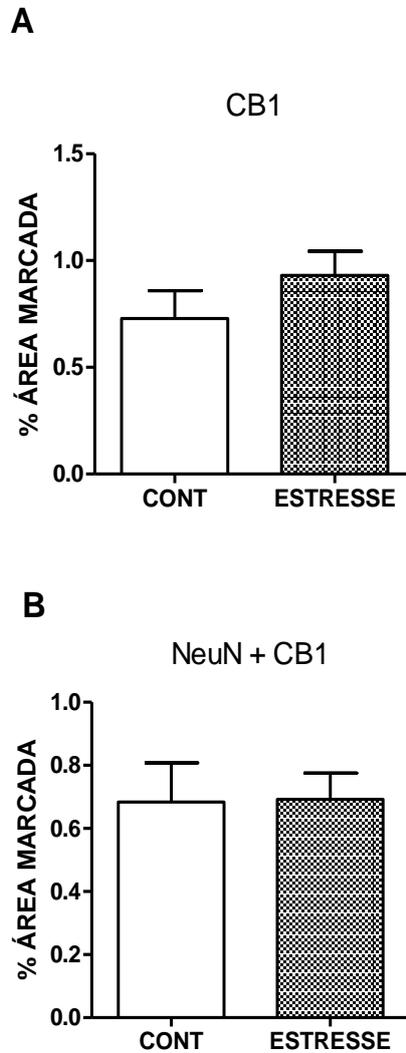
A figura representa os gráficos da percentagem (%) da área marcada pela imunoexpressão no gânglio trigeminal do receptor CB1 (A) e pela co-marcação CB1 junto com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de 10 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student,  $*p < 0,05$ ).

Figura 22 – Fotomicrografia da imunoexpressão do receptor CB1 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



Vermelho: CB1; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 200x

Figura 23 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB1 no trato espinhal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional

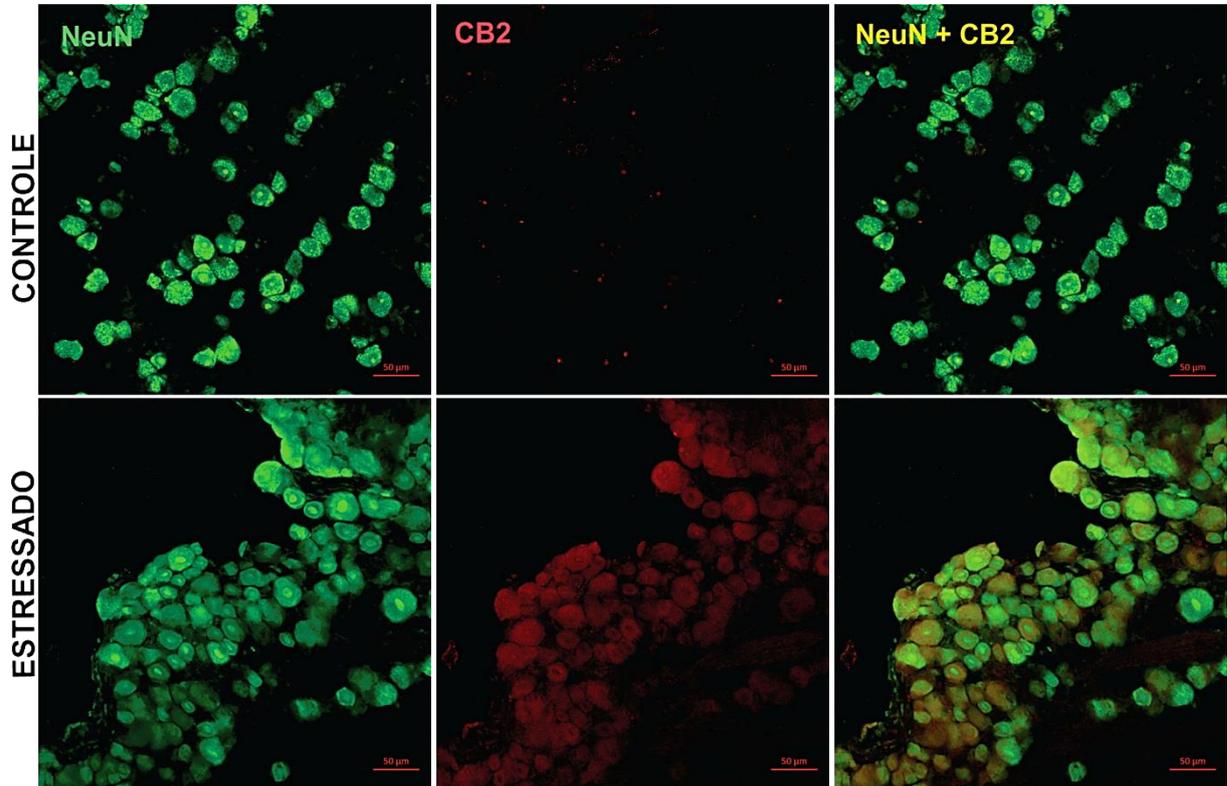


A figura representa os gráficos da percentagem (%) da área marcada pela imunoexpressão no trato espinhal trigeminal do receptor CB1 (A) e pela co-marcação CB1 junto com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de pelo menos 7 fotos por grupo.

#### **4.9 Análise da expressão de receptores CB2 no gânglio trigeminal e no trato espinhal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

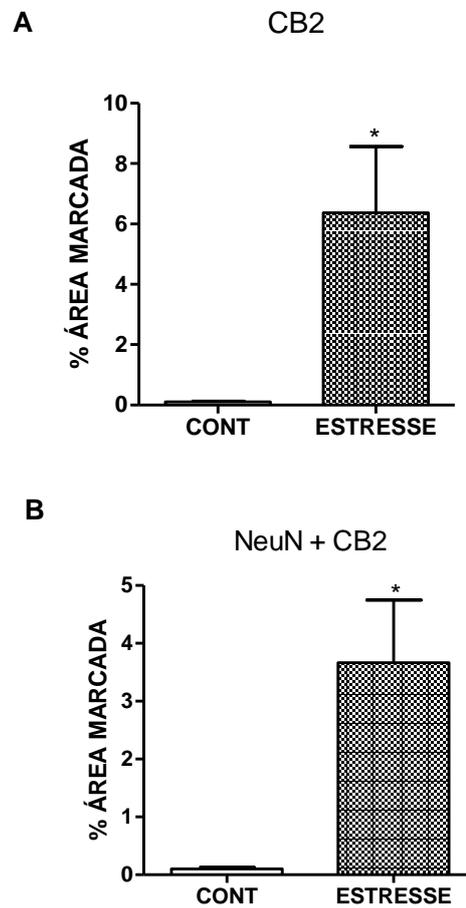
Na análise de imunofluorescência da expressão de receptor CB2 no gânglio trigeminal (FIGURA 24), os animais estressados ( $6,36 \pm 2,19$ ) apresentaram expressão do receptor CB2 significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em relação ao grupo controle ( $0,10 \pm 0,02$ ). O mesmo resultado foi observado na co-marcação de CB2 juntamente com NeuN, os animais estressados ( $3,66 \pm 1,08$ ) exibiram uma co-marcação significativamente maior quando comparado aos animais controle ( $0,10 \pm 0,02$ ) (FIGURA 25). No trato espinhal trigeminal (FIGURA 26), a expressão foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos animais estressados ( $0,24 \pm 0,03$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $0,10 \pm 0,02$ ). Na co-marcação de CB2 e NeuN, não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo controle ( $0,10 \pm 0,02$ ) e o grupo estresse ( $0,14 \pm 0,04$ ) (FIGURA 27).

Figura 24 – Fotomicrografia da imunexpressão do receptor CB2 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



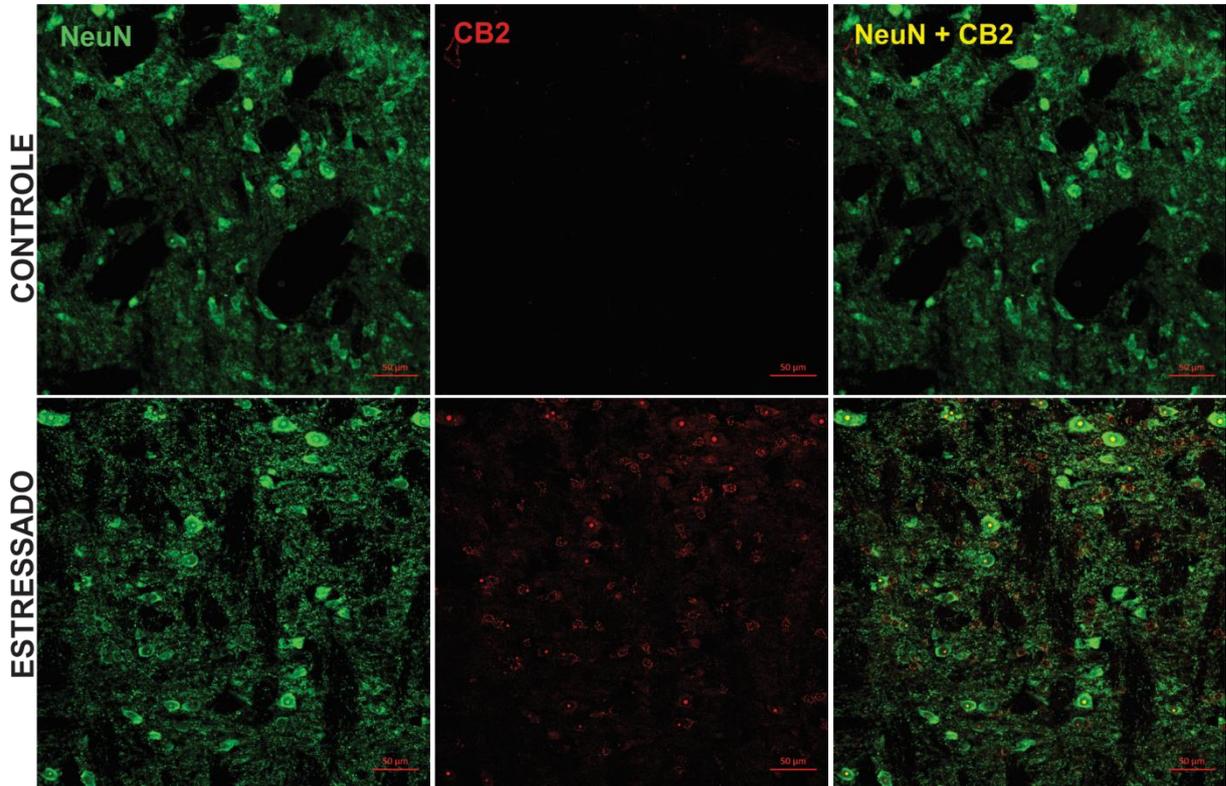
Vermelho: CB2; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 400x

Figura 25 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB2 no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



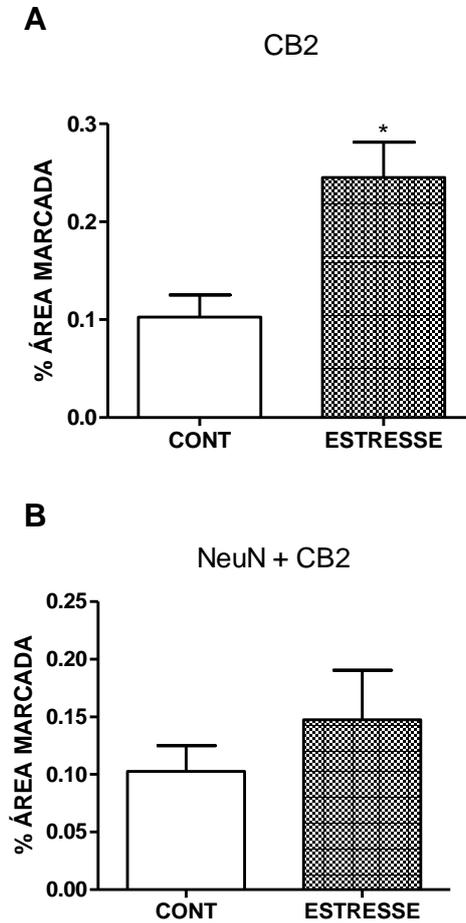
A figura representa os gráficos da percentagem (%) da área marcada pela imunoexpressão no gânglio trigeminal do receptor CB2 (A) e pela co-marcação CB2 junto com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de 5 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student,  $*p < 0,05$ ).

Figura 26 – Fotomicrografia da imunoposição do receptor CB2 no trato espinal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



Vermelho: CB2; verde: NeuN (marcador de neurônio); amarelo: co-marcação. Aumento de 400x

Figura 27 – Quantificação da percentagem a área marcada (pixels) da imunoexpressão do receptor CB2 no trato espinal trigeminal de ratos submetidos ao estresse emocional



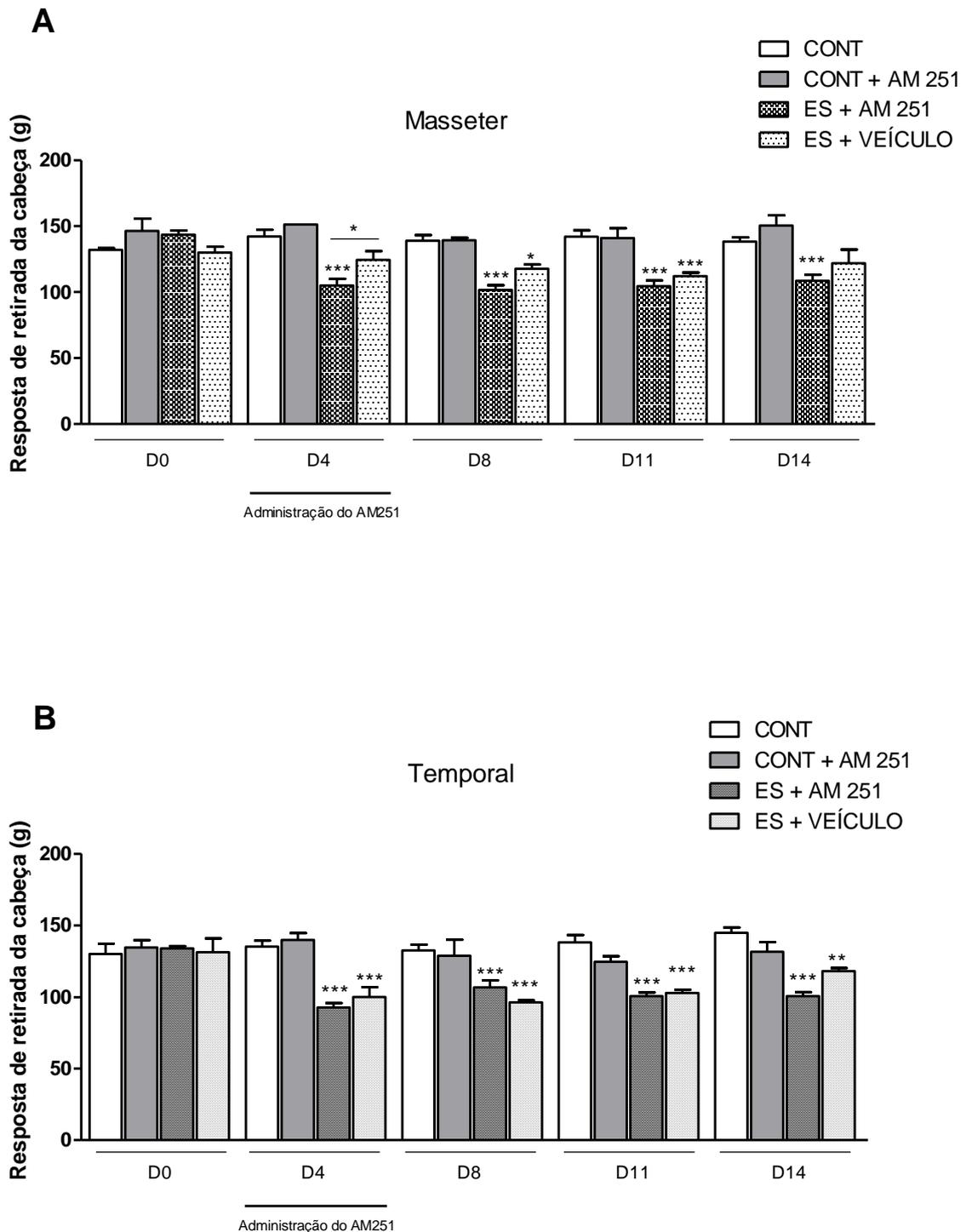
A figura representa os gráficos da percentagem (%) da área marcada pela imunoexpressão no trato espinal trigeminal do receptor CB2 (A) e pela co-marcação CB2 junto com NeuN (B) de animais controles (CONT) e animais submetidos ao modelo de estresse emocional (ESTRESSE), após o estímulo do estresse emocional. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da % de área marcada de 5 fotos por grupo. Os asteriscos indicam a diferença significativa (teste t de Student, \* $p < 0,05$ ).

#### **4.10 Análise do efeito do antagonista canabinoide AM251 no limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

O limiar nociceptivo foi avaliado pela resposta de retirada da cabeça no teste de hipernocicepção mecânica. A administração do antagonista canabinoide CB1 em D4 reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) o limiar nociceptivo no masseter dos animais estressados que foram tratados com a droga (ES + AM251) ( $105,0 \pm 5,0$ ) em relação ao grupo controle (CONT) ( $142,3 \pm 5,0$ ). Essa redução se manteve significativa ( $p < 0,001$ ) até o D14. O limiar também foi significativamente ( $p < 0,05$ ) menor em relação aos animais estressados tratados com veículo (ES + VEÍCULO) ( $124,4 \pm 6,5$ ). Os animais do grupo ES + VEÍCULO apresentaram redução do limiar nociceptivo a partir de D8, com pico em D11 ( $112,1 \pm 2,6$ ) comparados aos animais do grupo CONT ( $142,1 \pm 4,7$ ). Os animais do grupo controle tratados com a droga (CONT + AM 251) não apresentaram diferenças em relação aos animais do grupo CONT (FIGURA 28A).

O limiar nociceptivo do músculo temporal diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) em D4 tanto no grupo ES + AM251 ( $92,5 \pm 4,1$ ) como no grupo ES + VEÍCULO ( $100,1 \pm 6,7$ ) em comparação com o grupo CONT ( $135,3 \pm 4,1$ ). Não houve diferenças entre o grupo tratado com a droga com o grupo tratado com veículo em D4. A redução do limiar nociceptivo se manteve reduzida significativamente ( $p < 0,001$ ) até D14 nos dois grupos ES + AM251 e ES + VEÍCULO. Os animais do grupo controle tratados com a droga (CONT + AM 251) também não apresentaram diferenças em relação aos animais do grupo CONT (FIGURA 28B).

Figura 28 – Efeito do antagonista canabinoide CB1 sobre limiar nociceptivo na região dos músculos mastigatórios masseter e temporal em ratos submetidos ao estresse emocional



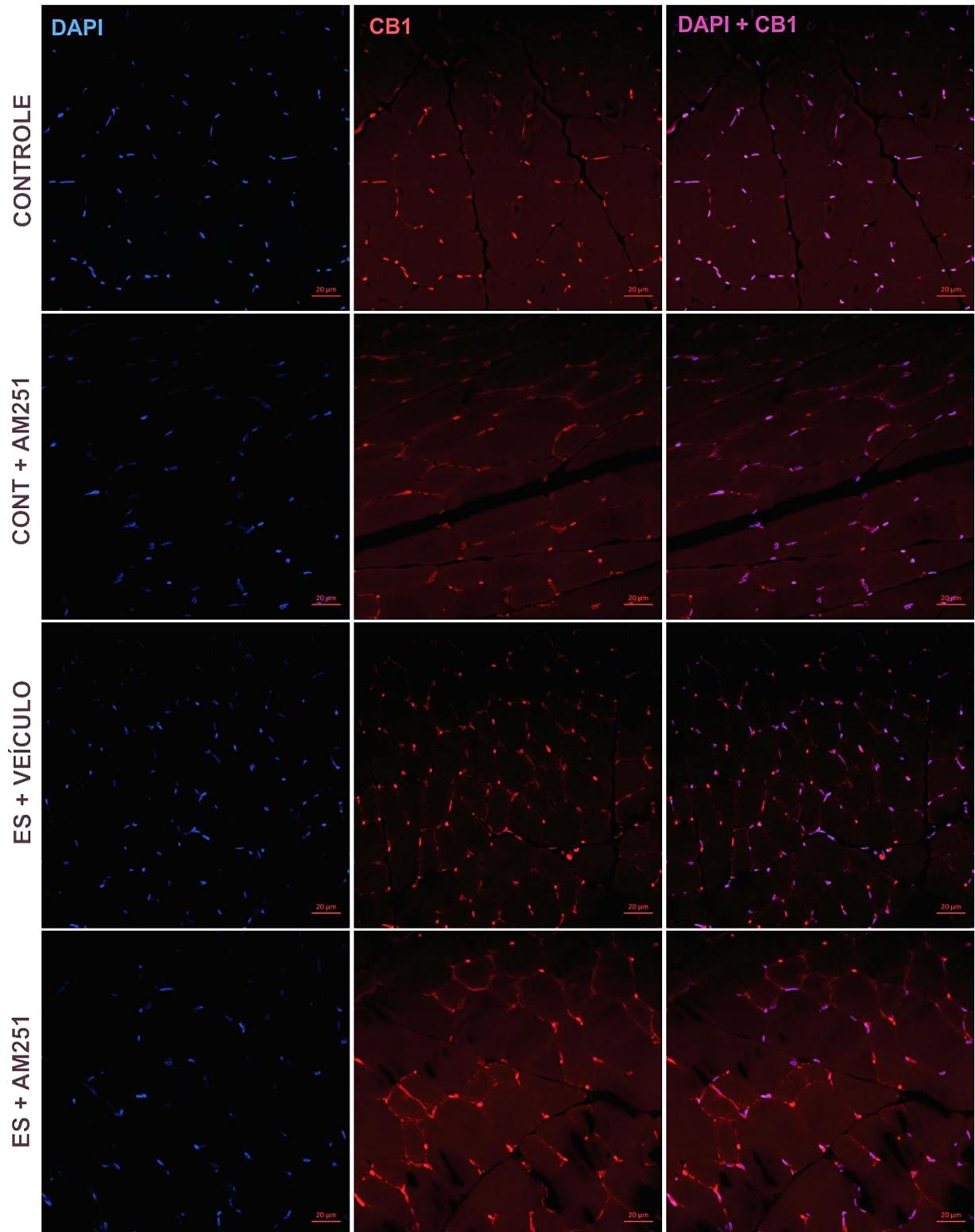
A figura representa os gráficos do efeito do antagonista canabinoide CB1 sobre o limiar nociceptivo, mensurado através da resposta de retirada da cabeça a um estímulo mecânico (força em grama) na região dos músculos mastigatórios masseter (A) e temporal (B) de animais controles (CONT), animais controle com antagonista canabinoide CB1 (CONT +

AM251), animais estressados com o veículo (ES + VEÍCULO) e animais estressados com antagonista canabinoide CB1 (ES + AM 251) que foi avaliado nos dias D0, D4, D8, D11 e D14 na estimulação do estresse emocional. O antagonista canabinoide foi administrado em D4, D5 e D6. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM da resposta de retirada da cabeça em gramas de 8 animais por grupo. O asterisco indica a diferença significativa em relação ao grupo controle (Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### **4.11 Análise da expressão de receptores CB1 no músculo masseter de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional e administrados AM251 (Antagonista CB1)**

Na análise de imunofluorescência do receptor CB1 no músculo masseter, observou-se a expressão do receptor em todos os grupos analisados (FIGURA 29). O grupo controle (CONT) apresentou uma marcação mais evidente do que o grupo controle tratado com o antagonista canabinoide CB1 (CONT + AM251). O grupo estressado tratado com veículo (ES + VEÍCULO) e o grupo estressado tratado com o antagonista (ES + AM251) apresentaram maior expressão em relação aos grupos controles. A área marcada da expressão dos receptores CB1 não foi quantificada.

Figura 29 – Fotomicrografia da imunopressão do receptor CB1 no músculo masseter de ratos submetidos ao estresse emocional

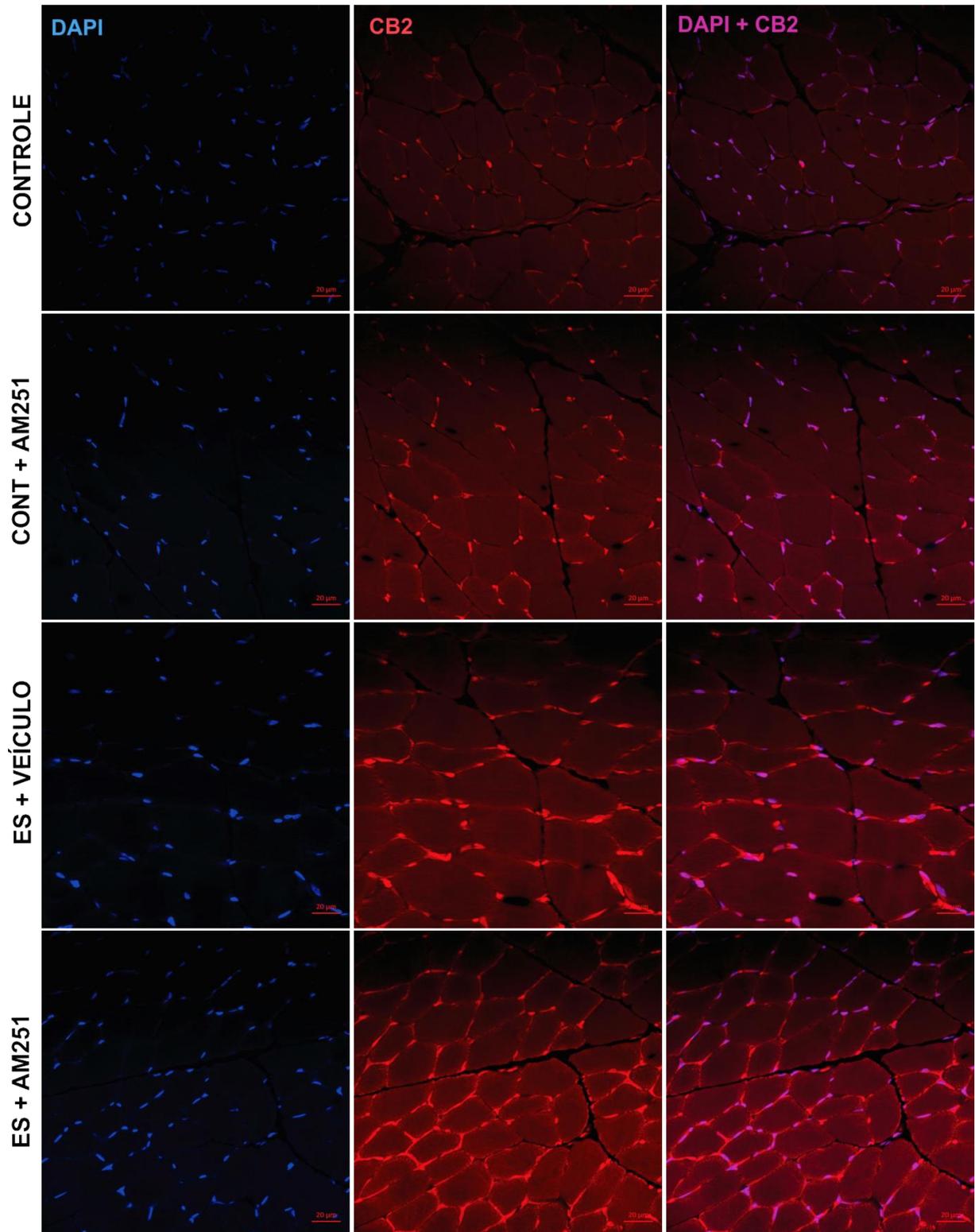


Vermelho: CB1; azul: DAPI; violeta: co-marcação. Aumento de 400x. CONT: Controle; ES: Estresse; AM251: antagonista canabinoide

#### **4.12 Análise da expressão de receptores CB2 no músculo masseter de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional**

Na análise de imunofluorescência do receptor CB2 no músculo masseter, observou-se a expressão do receptor em todos os grupos analisados (FIGURA 30). O grupo controle (CONT) apresentou uma fraca marcação em relação aos outros grupos. O grupo controle tratado com o antagonista canabinoide CB1 (CONT + AM251) apresentou expressão do receptor CB2, menos evidente em relação aos grupos estressado tratado com veículo (ES + VEÍCULO) e estressado tratado com o antagonista (ES + AM251). Observou-se uma forte marcação nos grupos dos animais estressados, mais evidente no grupo ES + AM251. A área marcada da expressão dos receptores CB2 não foi quantificada.

Figura 30 – Fotomicrografia da imunopressão do receptor CB2 no músculo masseter de ratos submetidos ao estresse emocional



Vermelho: CB2; azul: DAPI; violeta: co-marcação. Aumento de 400x. CONT: Controle; ES: Estresse; AM251: antagonista canabinoide

## 5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, procurou-se abordar o bruxismo acordado em animais influenciado por fatores psicológicos. Há uma estreita relação entre ansiedade e estresse com as parafunções orais descrita na literatura (MANFREDINI et al, 2005; ABEKURA et al, 2011; AHLBERG et al, 2013). Estudos em seres humanos e animais relatam os fatores psicológicos como fatores de início e de exacerbação dos sinais e sintomas do bruxismo (ROSALES et al, 2002; MOLINA et al, 2006; GIRAKI et al, 2010).

A caixa de comunicação foi utilizada como instrumento de indução do estresse emocional. Inicialmente idealizada por Ogawa (1990), é um modelo atrativo e útil para estudar as alterações comportamentais e fisiológicas sob o estresse psicológico, por produzir ansiedade experimental baseada na comunicação emocional entre os animais, sem estresse físico direto. O presente estudo é o primeiro a utilizar esse modelo experimental em nosso laboratório, serviu como base para implantação do modelo e estabelecimento dos protocolos experimentais utilizados.

Nossos resultados mostram que o estresse emocional foi capaz de aumentar a atividade muscular mastigatória na EMG, de forma significativa no D7 da estimulação. Entretanto, não obtivemos animais suficientes com eletrodos para registro até o fim do protocolo, ou seja, até o D14. A permanência dos animais em caixas individuais não evitou a quebra dos eletrodos.

A hiperatividade muscular dos músculos mastigatórios também foi observada por Rosales et al (2002) e Wu et al (2013) em animais estressados emocionalmente utilizando a caixa de comunicação. Outro modelo de estresse psicológico, o nado forçado, também aumentou significativamente a atividade do músculo masseter nos animais (OKAMOTO et al, 2012). Esses resultados também foram vistos em estudos clínicos por Nicholson et al (2000) e Tsai et al (2002), indicando claramente que o estresse provoca um aumento na atividade muscular, tornando-se um importante fator etiológico para o bruxismo.

Bruxistas diurnos apresentam níveis aumentados da atividade no repouso do masseter observada na EMG em comparação com indivíduos normais. Além disso, os bruxistas respondem diferentemente em situações estressantes do que os indivíduos normais. Esses dados suportam que a etiologia do bruxismo diurno envolve inicialmente uma resposta muscular específica ao estresse (RAO; GLAROS, 1979).

O aumento do nível de estresse emocional influencia a função mastigatória sob o comando dos centros emocionais do cérebro. O hipotálamo, o sistema reticular e,

particularmente o sistema límbico são responsáveis pelo estado emocional do indivíduo. Uma das maneiras desses centros influenciarem a atividade muscular é através de impulsos eferentes gama. O estresse ativa o hipotálamo, que por intermédio de vias neurais aumenta a atividade dos eferentes gama, na qual fazem com que as fibras intrafusais dos fusos musculares se contraíam. O fuso torna-se sensibilizado de tal maneira que qualquer leve estiramento do músculo causará um reflexo de contração, produzindo um aumento do tônus muscular (OKESON, 2008).

Um estado emocional negativo aumenta a mioeletricidade dos músculos com consequente aumento da pressão intra-articular gerando um dano na matriz da cartilagem condilar na ATM. No trabalho de WU et al (2013), os autores observaram que os animais emocionalmente estressados apresentavam potenciais elétricos significativamente maiores que os animais controles, e alterações na fibras de colágeno da cartilagem. O estresse psicológico também contribui com alterações do metabolismo dos músculos mastigatórios, diminuindo o metabolismo aeróbico e aumentando o metabolismo anaeróbico (CHEN et al, 2010).

O estudo da função muscular pela EMG é definido pela análise do sinal elétrico produzido durante a contração muscular, permitindo interpretações em condições normais e patológicas. A EMG tem sido amplamente utilizada como um método de diagnóstico para o bruxismo, pois permite avaliar as respostas funcionais e biomecânicas dos músculos mastigatórios em repouso ou durante a mastigação (KATO et al, 2011). No nosso estudo, utilizou-se a EMG para verificar a ocorrência de aumento da frequência de picos de atividade elétrica nos músculos masseter e temporal. Assim, a avaliação da EMG permitiu diferenciar animais normais de animais com bruxismo por estresse emocional.

A ligação entre hiperatividade muscular e dor, gerada por estímulos emocionais, foi observada nesse estudo. Os resultados mostram uma redução significativa no limiar nociceptivo nos músculos mastigatórios dos animais estressados, com pico no D11 da indução do estresse emocional. Isso sugere que a hiperatividade muscular observada em D7 (avaliada por EMG) contribuiu para a dor miofascial mastigatória nos animais emocionalmente estressados. Os resultados estão de acordo com os de Huang et al (2011), em que os animais estressados também apresentaram diminuição do limiar nociceptivo nos músculos mastigatórios, porém com pico no sétimo dia de estimulação. A diferença nos dias do pico nociceptivo poderia ser atribuída às diferenças metodológicas. O autor utilizou o Von Frey filamentos no teste nociceptivo, enquanto em nosso trabalho foi utilizado o Von Frey eletrônico.

No estudo de Zhao et al (2015) o estresse de contenção reduziu o limiar nociceptivo. Os autores observaram uma redução no limiar de retirada da cabeça no sétimo dia até o décimo quarto dia nos animais expostos ao estresse. O estresse agudo induz analgesia (JORUM, 1988), porém, a exposição crônica resulta em hiperalgesia (GAMEIRO et al, 2006).

A relação entre estresse, dor e hiperatividade é similarmente observada em pesquisas clínicas (OHRBACH et al, 1998; BODÉREÉ et al, 2005). Dessa forma, pacientes com bruxismo exibem sintomatologia dolorosa severa (MOLINA et al, 2011). A contração isométrica voluntária com pequenos períodos de relaxamento causa dor muscular. O acúmulo de metabólitos, tais como lactato ou a falta de oxidação dos produtos de metabolização pode desempenhar um papel significativo na dor miofascial. A presença de mediadores causa a sensibilização dos nociceptores musculares que levam a dor evocada na estimulação mecânica (SVENSSON et al, 2008). Entretanto, alguns estudos não encontraram relação entre dor e hiperatividade muscular (LUND et al, 1991; LAVIGNE et al, 1997). A dor muscular mastigatória induzida por solução salina hipertônica causa uma redução na força de mordida voluntária máxima no músculo masseter, promovendo um efeito de inibição da atividade muscular (WANG et al, 2000). Esse resultado está de acordo com o modelo de adaptação da dor proposto por Lund (1991). A divergência nos resultados dos estudos sobre hiperatividade muscular e dor torna o assunto controverso.

Em nosso estudo foram observadas diferenças na resposta do limiar nociceptivo entre os músculos. No músculo temporal dos animais estressados observamos a redução significativa no quarto dia de indução do estresse emocional comparando com a medida basal e com o grupo controle. No músculo masseter do grupo estressado houve uma redução do limiar nociceptivo apenas comparado com a medida basal. Esse resultado sugere que o músculo temporal é mais sensível em situações de estresse. Pacientes com cefaleia apresentam dor à palpação de maneira significativa no temporal em comparação com outros sítios musculares (FRANCO et al, 2011). No estudo de Santos Silva et al (2005), o limiar de dor a pressão mensurado com um algômetro é significativamente menor em pacientes com dor miofascial mastigatória. Além disso, os autores observaram que os músculos mastigatórios exigem pressões diferentes, o músculo temporal apresentou maior sensibilidade.

Na presença de estímulos nociceptivos, podem ocorrer mudanças nas atividades dos neurônios trigeminiais, que recebem as aferências nociceptivas orofaciais e transmitem aos neurônios superiores. A expressão de c-Fos é um índice de ativação dos neurônios do corno dorsal da medula e do subnúcleo caudal espinhal seguida do estímulo nocivo (SHIMIZU et al,

2006). O estresse emocional aumentou a expressão de c-Fos no gânglio trigeminal e no trato espinhal trigeminal dos animais estressados. Esse resultado mostra ativação neuronal e sugere envolvimento de mecanismos centrais na hiperalgesia muscular. Quintero e colaboradores (2003) observaram que o estresse psicológico aumenta a expressão de c-Fos no corno dorsal da medula após a injeção de formalina na pata traseira. No modelo de estresse por nado forçado em animais, Duenes et al (2010) também encontraram um aumento da expressão de c-Fos, afirmando que o estresse causa ativação prolongada dos neurônios trigeminais caudais.

O aumento da atividade mastigatória nos animais estressados, possivelmente está envolvido na diminuição do limiar nociceptivo nos músculos mastigatórios, correlacionando o bruxismo com aumento da sensibilidade à dor. Esses parâmetros mimetizam a situação clínica encontrada em indivíduos com apertamento e dor miofascial na região dos músculos mastigatórios.

O modelo de estresse emocional gerou um comportamento de ansiedade nos animais estressados, visto no teste do labirinto em cruz elevado. Os animais estressados diminuíram o número de entradas e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Esse resultado confirma o comportamento de ansiedade, pois os animais ansiosos tem preferência pelos braços fechados (CAMPOS et al, 2013). O mesmo resultado foi visto por Chen et al (2010), Huang et al (2011) e Li et al (2013); os autores também utilizaram a caixa de comunicação para indução do estresse emocional. Esses estudos confirmam que a caixa de comunicação produz satisfatoriamente um comportamento ansioso experimental. Clinicamente, o comportamento de ansiedade é observado em pacientes com bruxismo (MANFREDINI et al, 2005). O nível de ansiedade é maior em indivíduos com bruxismo moderado a grave (MOLINA et al, 2006).

A indução do estresse emocional não provocou alterações no ganho de peso corporal entre o grupo estressado e o grupo controle. Esse resultado é consistente com o de Ishikawa et al (1995), Rosales et al (2002) e Huang et al (2011); entretanto, a diminuição do peso corporal foi vista nos trabalhos de Li et al (2011) e Li et al (2013). Nesses estudos, o protocolo de estimulação do estresse emocional durou cinco semanas e redução do ganho de peso foi vista já na primeira semana da indução do estresse emocional. Zhao et al (2015) observaram a redução do ganho de peso corporal em um protocolo de 14 dias, porém utilizaram outro modelo de estresse, o modelo de imobilização.

A inibição da ingestão de alimentos e perda de peso corporal são respostas fisiológicas típicas ao estresse. Modelos experimentais de restrição, de derrota social, de estresse crônico leve promovem perda de peso em condições agudas, em exposições de horas

e poucos dias (HARRIS, 2015). Possivelmente, o tipo de estresse e o tempo utilizado no nosso trabalho não foram suficientes para promover a redução do ganho de peso nos animais.

A indução do estresse pode promover mudanças no peso do timo, baço e glândulas adrenais (MARSH; RASMUSSEN, 1960). No presente estudo, foi medido apenas o peso das glândulas adrenais e observamos que não houve diferença do peso das glândulas entre os animais dos grupos estressado e controle. Esse achado também foi encontrado nos trabalhos de Ishikawa et al (1995) e Rosales et al (2002). Contudo, no trabalho de Li et al (2011), houve um aumento no peso das glândulas adrenais dos animais na terceira e quinta semana de indução do estresse emocional. Igualmente ao ganho de peso corporal, o tempo utilizado, ou seja, 14 dias de estresse emocional e o tipo de estresse, possivelmente foi insuficiente para alterar o peso das glândulas adrenais.

O estresse psicológico gera impulsos nos centros corticais do cérebro e são transmitidos através do sistema límbico para o hipotálamo. Durante esse processo, as células do núcleo paraventricular do hipotálamo são ativadas para produzir o CRF, que chega à hipófise para estimular a síntese do ACTH, esse hormônio age sobre a zona fasciculada nas glândulas adrenais para síntese e secreção de cortisol. O nível de cortisol sanguíneo é controlado por um mecanismo de retroalimentação negativa (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). No entanto, a estimulação repetida da secreção de glicocorticoides pelo estresse pode resultar em danos no hipocampo, uma vez que o hipocampo é envolvido na regulação negativa da produção de cortisol (KUBO; IINUMA; CHEN, 2015). Assim, é comum encontrarmos um aumento da concentração de cortisol plasmático em indivíduos submetidos a situações de estresse crônico.

Nos ratos o principal glicocorticoide produzido por estresse é a corticosterona (ISHIKAWA et al, 1992; LI et al, 2011). O aumento dos vacúolos citoplasmáticos sugere um aumento da produção de glicocorticoide pela adrenal. Além disso, o efeito trófico do ACTH envolve um aumento na massa da adrenal além de aumentar a capacidade esteroideogênica das células da zona fasciculada resultando no aumento da secreção de glicocorticoides. (NUSSDORFER, 1986).

Na análise histológica, foi encontrado um aumento na expressão de vacúolos citoplasmáticos na zona fasciculada das glândulas adrenais nos animais emocionalmente estressados. Em um modelo de estresse agudo, os autores observaram o acúmulo de gotículas lipídicas na zona fasciculada dos animais estressados (KOKO et al, 2004). No presente estudo não foi analisado o nível de corticosterona nos animais. No entanto, diversos estudos mostram que o modelo experimental de estresse emocional através da caixa de comunicação aumenta

de forma significativa os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais (KANEYUKI et al, 1991; ISHIKAWA et al, 1992; CHEN et al, 2010; LI et al, 2011; LI et al, 2013).

Assim, foi observado que a indução de estresse emocional nos ratos através da caixa de comunicação causou um aumento da atividade mastigatória e comportamento ansioso nos animais. Além disso, o aumento da presença de gotículas lipídicas, vista pela análise histológica da zona fasciculada do córtex das adrenais coletadas, sugere um aumento da produção esteroidogênica, corroborando para a presença de estresse.

Após a implantação e estabelecimento do modelo e parâmetros de avaliação, foi investigada a participação do sistema endocanabinoide na modulação nociceptiva e na atividade muscular mastigatória. Inicialmente, avaliamos a expressão dos receptores canabinoides no glânglio trigeminal e trato espinhal trigeminal após o estresse emocional. De acordo com os resultados, foi observada a expressão aumentada significativa de receptores CB1 e CB2 no glânglio trigeminal dos animais estressados. No trato espinhal trigeminal, não houve diferença na expressão de CB1 entre os grupos estudados. Esse resultado sugere que a ativação dos receptores CB1 está sendo mais intensa a nível periférico.

O sistema endocanabinoide desempenha um papel importante na regulação do comportamento em circunstâncias estressantes. Apresenta mecanismos endógenos de antinocicepção que afetam a mobilização de recursos, modifica o enfrentamento e a tomada de decisões em situações de ameaça (HILLARD, 2014). O estresse ativa sistemas neurais que inibem a sensação de dor, essa resposta é conhecida como analgesia induzida por estresse e envolve a participação de mediadores químicos, entre eles, os endocanabinoides (KURRIKOFF et al, 2008). Hohmann et al (2005) mostraram que o desenvolvimento da analgesia induzida por estresse pode ser prevenido bloqueando os receptores canabinoides CB1 e facilitado pelo aumento dos níveis no cérebro dos ligantes endógenos, a anandamida e o 2-AG. O aumento da expressão dos receptores canabinoides encontrado em nosso estudo sugere um mecanismo endógeno para promover analgesia. Entretanto, a exposição repetida ao estresse emocional promoveu a redução do limiar nociceptivo.

Os receptores CB1 estão expressos em concentrações elevadas em diversas áreas do SNC, como no hipocampo, núcleos estriatais, cerebelo, tronco cerebral, áreas do córtex cerebral, amígdala, hipotálamo, além de órgãos e tecidos periféricos, em menor expressão. O padrão de distribuição dos receptores CB1 é heterogêneo e pode responder por diversas propriedades farmacológicas proeminentes de agonistas CB1, como por exemplo, a sua capacidade de afetar a cognição e a memória e alterar o controle de função motora (PERTWEE, 2001). Os receptores CB2 são expressos no sistema imunológico, porém podem

expressar-se em neurônios (GUINDON; HOHMANN, 2009). A expressão dos receptores canabinoides pode ser influenciada pelo sexo, Niu, Zhang e Ro (2012) observaram a expressão significativa de CB1 no gânglio trigeminal de ratos, mas não em ratas.

No SNC, o efeito analgésico dos canabinoides é mediado principalmente através dos receptores CB1 localizados em estruturas que medeiam a neurotransmissão nociceptiva incluindo o corno dorsal da medula, a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo dorsal da rafe e núcleo talâmico ventral posterolateral (HU; HO, CHIU, 2014). Antinocicepção periférica dos canabinoides ocorre através da ativação de receptores canabinoides localizados nos neurônios nociceptivos primários. Price et al (2003) encontraram a expressão do RNAm de receptores CB1 em 30% dos neurônios trigeminais e nenhuma evidência para receptores CB2.

Após a análise da expressão dos receptores canabinoides no modelo de estresse emocional, avaliamos a modulação farmacológica com o antagonista canabinoide CB1 AM251. O uso do AM251 reduziu significativamente o limiar nociceptivo dos músculos mastigatórios em relação ao grupo controle e ao grupo estressado tratado com veículo, no quarto dia de indução do estresse emocional. O efeito antinociceptivo dos canabinoides na via trigeminal em modelos de dor inflamatória e dor neuropática têm sido alvo de diversos estudos (LIANG; HUANG; HSU, 2007; BURGOS et al, 2010; GONDIM et al, 2012). Entretanto, até o presente momento, não há estudos avaliando a participação do sistema endocanabinoide na atividade muscular mastigatória e nocicepção associada em condições parafuncionais, como o apertamento dos dentes.

Alguns autores avaliaram as propriedades analgésicas dos canabinoides em modelos de dor muscular aguda. Sánchez Robles, Bagues e Martín (2012) avaliaram a contribuição dos receptores canabinoides na dor muscular no masseter induzida por salina hipertônica, os resultados mostraram que agonistas seletivos e não seletivos reduziram significativamente a nocicepção. Esse efeito foi bloqueado com a presença dos antagonistas seletivos, sugerindo o envolvimento dos dois receptores canabinoides nesse modelo de dor muscular orofacial. Os mesmos resultados foram observados por Cumella et al (2012), utilizando um agonista seletivo CB1 sem propriedades psicoativas.

Recentemente, Bagues, Martín e Sánchez Robles (2014) analisaram o efeito do THC no mesmo modelo de dor muscular, observando uma redução do comportamento nociceptivo. Clinicamente, os canabinoides estão sendo utilizados em distúrbios musculoesqueléticos. O Sativex® foi recentemente comercializado para melhorar a dor e a espasticidade em pacientes com esclerose múltipla (KARST et al, 2010).

Em um modelo de mioosite aguda, um agonista específico CB1 reduziu a hipersensibilidade mecânica no músculo masseter, que foi revertida por um antagonista CB1. Esses dados mostram que a antinocicepção induzida pelos canabinoides na região orofacial é eficientemente mediada pela ativação dos receptores CB1 (NIU; ZHANG; RO, 2012). Akerman, Kaube e Goadsby (2007) observaram que o agonista canabinoide não seletivo WIN55,212 inibiu as respostas das fibras aferentes trigeminais e esse efeito foi bloqueado por um antagonista CB1, mas não por um antagonista CB2 (AKERMAN; HOLLAND; GOADSBY, 2007).

Os receptores canabinoides CB2 apresentam efeitos antinociceptivos sem desencadear efeitos comportamentais. No estudo de Kinsey et al (2011), um agonista canabinoide CB2 seletivo reduziu o comportamento nociceptivo no modelo experimental de neuropatia induzida por lesão constritiva crônica no nervo ciático, sem alterar o comportamento motor e causar hipotermia.

As principais causas para prescrição de *cannabis* medicinal são a dor e o espasmo muscular (BORGELT et al, 2013). A dor miofascial mastigatória é uma causa comum para automedicação de cannabis (WARE et al, 2003), o que poderia supor que os pontos gatilhos apresentam receptores canabinoides. Há níveis elevados de CB1 no músculo esquelético, próximo a junção neuromuscular, a ativação de CB1 amortece a liberação de acetilcolina, impedindo a formação do ponto gatilho (MCPARTLAND, 2008).

Em nossa pesquisa observou-se a expressão dos receptores canabinoides CB1 e CB2 no músculo masseter. Os receptores canabinoides podem ser expressos em tecidos periféricos, Cavuoto et al (2007) ressaltam a expressão dos receptores CB1 e CB2 em humanos e roedores, além da enzima FAAH no músculo esquelético, o que revela um resultado importante para o desenvolvimento de alvos terapêuticos. Sánchez Robles, Bagues e Martín (2012) observaram que o efeito da administração local de agonistas canabinoides CB e CB2 atenua a nocicepção muscular aguda no masseter. Dessa forma, o sistema endocanabinoide pode modular periféricamente a nocicepção muscular em casos de hiperatividade muscular.

Os canabinoides modulam centralmente a atividade motora através da expressão dos receptores CB1 nos gânglios basais. A administração do antagonista canabinoide CB1 aumenta a estimulação do movimento induzida pela administração de um agonista dopaminérgico. A estimulação é atenuada com a administração do inibidor de transporte do endocanabinoide, AM404 (GORRITI et al, 1999). Alta densidade de receptores CB1 foi observada na junção neuromuscular contribuindo para modulação da liberação de acetilcolina

(NEWMAN et al, 2007; SÁNCHEZ-PASTOR et al, 2007). Assim, os canabinoides tornam-se um alvo farmacológico para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas em situações de hiperatividade muscular, como no caso de pacientes com bruxismo.

Não avaliamos o efeito do antagonista canabinoide na atividade muscular mastigatória devido ao insuficiente número de animais com eletrodos para registro da EMG. Nossos resultados mostram de forma inédita a participação do sistema endocanabinoide na nocicepção associada a hiperatividade muscular. Novos estudos serão realizados para avaliar o efeito da administração de agonistas canabinoides na nocicepção e no aumento da atividade muscular mastigatória induzida pelo estresse emocional. Além disso, para identificar se os efeitos são modulados por via central ou por periférica.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluímos que animais expostos ao estresse emocional apresentam atividade muscular mastigatória aumentada e comportamento ‘brux-like’, com redução nos limiares nociceptivos dos músculos mastigatórios. Além disso, apresentam comportamento ansioso aumentado e alterações histomorfológicas no córtex da glândula adrenal. Os resultados mostram, de forma inédita, que o sistema endocanabinoide parece estar envolvido na modulação da nocicepção induzida por estresse emocional com aumento da expressão dos receptores CB1 e CB2 nos gânglios trigeminais, no trato espinhal do trigêmeo e no musculo masseter. O bloqueio de receptor CB1 amplifica o efeito nociceptivo do estresse, indicando provável efeito protetor desses receptores nessa condição.

## REFERÊNCIAS

- ABEKURA, H.; TSUBOI, M.; OKURA, T.; KAGAWA, K.; SADAMORI, S.; AKAGAWA, Y. Association between sleep bruxism and stress sensitivity in an experimental psychological stress task. **Biomed Res**, v. 32, n. 6, p. 395-9, 2011.
- AGARWAL, N.; PACHER, P.; TEGEDER, I.; AMAYA, F.; CONSTANTIN, C.E.; BRENNER, G.J.; RUBINO, T.; MICHALSKI, C.W.; MARSICANO, G.; MONORY, K.; MACKIE, K.; MARIAN, C.; BATKAI, S.; PAROLARO, D.; FISCHER, M.J.; REEH, P.; KUNOS, G.; KRESS, M.; LUTZ, B.; WOOLF, C.J.; KUNER, R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 7, p. 870-9, 2007.
- AHLBERG, K.; AHLBERG, J.; KÖNÖNEN, M.; ALAKUIJALA, A.; PARTINEN, M.; SAVOLAINEN, A. Perceived orofacial pain and its associations with reported bruxism and insomnia symptoms in media personnel with or without irregular shift work. **Acta Odontol Scand**, v. 63, n. 4, p. 213-217, 2005.
- AHLBERG, J.; LOBBEZOO, F.; AHLBERG, K.; MANFREDINI, D.; HUBLIN, C.; SINISALO, J.; KÖNÖNEN, M.; SAVOLAINEN, A. Self-reported bruxism mirrors anxiety and stress in adults. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 1, p. e7-77, 2013.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- AKERMAN, S.; HOLLAND, P.R.; GOADSBY, P.J. Cannabinoid (CB1) receptor activation inhibits trigeminovascular neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 1, p. 64-71, 2007.
- ALAJBEG, I. Z.; ZUVELA, A.; TARLE, Z. Risk factors for bruxism among Croatian navy employees. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 39, p. 668-676, 2012.
- ALVES, A.C.; ALCHIERI, J.C.; BARBOSA, G.A. Bruxism. Masticatory implications and anxiety. **Acta Odontol Latinoam**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2013.
- ANAND, P.; WHITESIDE, G.; FOWLER, C. J.; HOHMANN, A. G. Targeting CB<sub>2</sub> receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, p. 255-266, 2009.
- BAGÜÉS, A.; MARTÍN, M.I.; SÁNCHEZ-ROBLES, E.M. Involvement of central and peripheral cannabinoid receptors on antinociceptive effect of tetrahydrocannabinol in muscle pain. **Eur J Pharmacol**, v.745, p. 69-75, 2014.
- BALI, A.; JAGGI, A.S. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. **Eur J Pharmacol**, n. 746, p. 282-92, 2015.
- BEREITER, D.A.; SHEN, S.; BENETTI, A.P. Sex differences in amino acid release from rostral trigeminal subnucleus caudalis after acute injury to the TMJ region. **Pain**, v. 98, n. 1-2, p. 89-99, 2002.

BODÉRE, C.; TÉA, S.H.; GIROUX-METGES, M.A.; WODA, A. Activity of masticatory muscles in subjects with different orofacial pain conditions. **Pain**, v. 116, n. 1-2, p. 33-41, 2005.

BONJARDIM, L.R.; DA SILVA, A.P.; GAMEIRO, G.H.; TAMBELI, C.H.; FERRAZ DE ARRUDA VEIGA, M.C. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 3, p. 321-6, 2009.

BORGELT, L.M.; FRANSON, K.L.; NUSSBAUM, A.M.; WANG, G.S. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. **Pharmacotherapy**, v. 33, n. 2, p. 195-209, 2013.

BURGOS, E.; PASCUAL, D.; MARTÍN, M.I.; GOICOECHEA, C. Antinociceptive effect of the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, in the orofacial and temporomandibular formalin tests. **Eur J Pain**, v. 14, n. 1, p. 40-8, 2010.

CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35, Suppl 2, p. 101-11, 2013.

CAVALCANTE, A.L.; SIQUEIRA, R.M.; ARAUJO, J.C.; GONDIM, D.V.; RIBEIRO, R.A.; QUETZ, J.S.; HAVT, A.; LIMA, A.A.; VALE, M.L. Role of NMDA receptors in the trigeminal pathway, and the modulatory effect of magnesium in a model of rat temporomandibular joint arthritis. **Eur J Oral Sci**, v. 121, v. 6, p. 573-83, 2013.

CAVUOTO, P.; MCAINCH, A.J.; HATZINIKOLAS, G.; JANOVSÁ, A.; GAME, P.; WITTERT, G.A. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 364, n. 1, p. 105-10, 2007.

CHEN, C. Y.; PALLA, S.; ERNI, S.; SIEBER, M.; GALLO, L. M. Nonfunctional tooth contact in healthy controls and patients with myogenous facial pain. **J Orofac Pain**, v. 21, p. 185-193, 2007.

CHEN, Y.J.; HUANG, F.; ZHANG, M.; SHANG, H.Y. Psychological stress alters ultrastructure and energy metabolism of masticatory muscle in rats. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, n. 302693, 2010.

CHISNOIU, A.; LASCU, L.; PASCU, L.; GEORGIU, C.; CHISNOIU, R. Emotional stress evaluation in patients with temporomandibular joint disorder. **HVM Bioflux**, v. 7, n. 2, p. 104-107, 2015.

CLARK, G.T.; RUGH, J.D.; HANDELMAN, S.L. Nocturnal masseter muscle activity and urinary catecholamine levels in bruxers. **J Dent Res**, v. 59, p. 1571-1576, 1980.

CLARK, G. T.; RAM, S. Four oral motor disorders: bruxism, dystonia, dyskinesia and drug-induced dystonic extrapyramidal reactions. **Dent Clin North Am**, v. 51, p. 225-243, 2007.

COMMISSO, M.S.; MARTÍNEZ-REINA, J.; MAYO, J. A study of the temporomandibular joint during bruxism. **Int J Oral Sci**, v. 6, n. 2, p. 116-23, 2014.

CONTI, P. C. R.; PINTO-FIAMENGUI, L. M. S.; CUNHA, C. O.; CONTI, A. C. C. F. Orofacial pain and temporomandibular disorders – the impact on oral health and quality of life. **Braz Oral Res**, v. 26, p. 120-123, 2012.

CUMELLA, J.; HERNÁNDEZ-FOLGADO, L.; GIRÓN, R.; SÁNCHEZ, E.; MORALES, P.; HURST, D.P.; GÓMEZ-CAÑAS, M.; GÓMEZ-RUIZ, M.; PINTO, D.C.; GOYA, P.; REGGIO, P.H.; MARTIN, M.I.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; SILVA, A.M.; JAGEROVIC, N. Chromenopyrazoles: non-psychoactive and selective CB<sub>1</sub> cannabinoid agonists with peripheral antinociceptive properties. **Chem Med Chem**, v. 7, n. 3, p. 452-63, 2012.

DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2009.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L. L.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K.; MUSCARA, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v.13, n. 8, p. 812-819, 2009.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A. 3RD; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 605-13, 1988.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, 1992.

DONG, X.D.; MANN, M.K.; KUMAR, U.; SVENSSON, P.; ARENDT-NIELSEN, L., HU, J.W.; SESSLE, B.J.; CAIRNS, B.E. Sex-related differences in NMDA evoked rat masseter muscle afferent discharge result from estrogen- mediate modulation of peripheral NMDA receptor activity. **Neuroscience**, v. 146, n. 2, p. 822-32, 2007.

DUENES, S.L.; THOMPSON, R.; CHANG, Z.; OKAMOTO, K.; BEREITER, D.A. Psychophysical stress increases the expression of phospho-CREB, Fos protein and neurokinin-1 receptors in superficial laminae of trigeminal subnucleus caudalis in female rats. **Neurosci Lett**, v. 486, p. 207–210, 2010.

EMODI-PERLMAN, A.; ELI, I.; FRIEDMAN-RUBIN, P.; GOLDSMITH, C.; REITER, S.; WINOCUR, E. Bruxism, oral parafunctions, anamnestic and clinical findings of temporomandibular disorders in children. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 39, p. 126-135, 2012.

FEU, D.; CATHARINO, F.; QUINTÃO, C.C.A.; ALMEIDA, M.A.O. Asystematic review of etiological and risk factors associated with bruxism. **Journal of Orthodontics**, v. 40, p. 163-171, 2013.

FRANCO, A. L.; BORGES DE OLIVEIRA, C.; FERNANDES, G.; CASTANHARO, S. M.; DE GODÓI GONÇALVES, D.A.; CAMPARIS, C.M. Sensibilidade dolorosa à palpação em

pacientes com disfunção temporomandibular crônica. **Rev Cuba Estomatol**, v. 48, n. 4, p. 352-362, 2011.

FRATTO, G.; MANZON, L. Use of psychotropic drugs and associated dental diseases. **Int J Psychiatry Med**, v. 48, n. 3, p. 185-97, 2014.

FUNADA, M.; HARA, C. Differential effects of psychological stress on activation of the 5-hydroxytryptamine- and dopamine-containing neurons in the brain of freely moving rats. **Brain Res**, v. 901, p. 247-51, 2001.

GAMEIRO, G.H.; GAMEIRO, P.H.; ANDRADE ADA, S.; PEREIRA, L.F.; ARTHURI, M.T.; MARCONDES, F.K. ; VEIGA, M.C. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiol Behav**, v. 87, n. 4, p. 643-649, 2006.

GIRAKI, M.; SCHNEIDER, C.; SCHÄFER, R.; SINGH, P.; FRANZ, M.; RAAB, W.H.; OMMERBORN, M.A. Correlation between stress, stress-coping and current sleep bruxism. **Head Face Med**, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2010.

GLAROS, A.G.; WILLIAMS, K.; LAUSTEN, L. The role of parafunctions, emotions and stress in predicting facial pain. **J Am Dent Assoc**, v. 136, n. 4, p. 451-8, 2005.

GLAROS, A. G.; WILLIAMS, K. Tooth contact versus clenching: oral parafunctions and facial pain. **J Orofac Pain**, v. 26, n. 3, p. 176-80, 2012.

GÓMEZ, F.M.; GIRALT, M.T.; SAINZ, B.; ARRÚE, A.; PRIETO, M.; GARCÍA-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**, v. 107, n. 6, p. 461-7, 1999.

GÓMEZ, F.M.; ORTEGA, J.E.; HORRILLO, I.; MEANA, J.J. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. **J Oral Rehabil**, v. 37, n. 11, p. 827-33, 2010.

GONDIM, D. V.; ARAÚJO, J. C.; CAVALCANTE, A. L.; HAVT, A.; QUETZ, JDA. S.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, RDE. A.; VALE, M. L. CB1 and CB2 contribute to antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 90, n. 11, p. 1479-89, 2012.

GORRITI, M.A.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; NAVARRO, M.; PALOMO, T. Chronic (-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 365, p. 133-142, 1999.

GUARDA-NARDINI, L.; MANFREDINI, D.; SALAMONE, M.; SALMASO, L.; TONELLO, S.; FERRONATO, G. Efficacy of botulinum toxin in treating myofascial pain in bruxers: a controlled placebo pilot study. **Cranio**, v. 26, n. 2, p. 126-35, 2008.

GUARDA-NARDINI, L.; STECCO, A.; STECCO, C.; MASIERO, S.; MANFREDINI, D. Myofascial pain of the jaw muscles: comparison of short-term effectiveness of botulinum toxin injections and fascial manipulation technique. **Cranio**, v. 30, n. 2, p. 95-102, 2012.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The Endocannabinoid System and Pain. **Neurol Disord Drug Targets**, v. 8, n. 6, p. 403–421, 2009.

HARRIS, R.B. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. , p. 250-65, 2015.

HILLARD, C.J. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. **Semin Immunol**, v. 26, n. 5, p. 380-8, 2014.

HOHMANN, A.G.; SUPLITA, R.L.; BOLTON, N.M.; NEELY, M.H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J.F.; WALKER, J.M.; HOLMES, P.V.; CRYSTAL, J.D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108-12, 2005.

HOJO, A.; HAKETA, T.; BABA, K.; IGARASHI, Y. Association between the amount of alcohol intake and masseter muscle activity levels recorded during sleep in healthy young women. **Int J Prosthodont**, v. 20, n. 3, p. 251-5, 2007.

HU, S.S.; HO, Y.C.; CHIOU, L.C. No more pain upon Gq-protein coupled receptor activation: role of endocannabinoids. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 467-84, 2014.

HUANG, F.; ZHANG, M.; CHEN, Y. J.; LI, Q.; WU, A. Z. Psychological Stress Induces Temporary Masticatory Muscle Mechanical Sensitivity in Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 720603 p. 1-8, 2011.

HUANG, Q.M.; YE, G.; ZHAO, Z.Y.; LV, J.J.; TANG, L. Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis. **Acupunct Med**, v. 31, n. 1, p. 65-73, 2013.

ISHIKAWA, M.; HARA, C.; OHDO, S.; OGAWA, N. Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box. **Physiol Behav**, v. 52, n. 3, p. 475-80, 1992.

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**, v. 57, n 1, p. 41-7, 1995.

JANAL, M.N.; RAPHAEL, K.G.; KLAUSNER, J.; TEAFORD, M. The role of tooth-grinding in the maintenance of myofascial face pain: a test of alternate models. **Pain Med**, v. 8, n. 6, p. 486-96, 2007.

JORUM, E. Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats. **Pain**, v. 32, n. 3, p. 341-348, 1988.

KANEYUKI, H.; YOKOO, H.; TSUDA, A.; YOSHIDA, M.; MIZUKI, Y.; YAMADA, M.; TANAKA, M. Psychological stress increases dopamine turnover selectively in mesoprefrontal dopamine neurons of rats: reversal by diazepam. **Brain Res**, v. 557, p. 154-61, 1991.

KARST, M.; WIPPERMANN, S.; AHRENS, J. Role of cannabinoids in the treatment of pain and (painful) spasticity. **Drugs**, v. 70, n. 18, p. 2409-38, 2010.

KATO, T.; MASUDA, Y.; YOSHIDA, A.; MORIMOTO, T. Masseter EMG activity during sleep and sleep bruxism. **Arch Ital Biol**, v. 149, n. 4, p. 478-91, 2011.

KINSEY, S.G.; MAHADEVAN, A.; ZHAO, B.; SUN, H.; NAIDU, P.S.; RAZDAN, R.K.; SELLEY, D.E.; IMAD DAMAJ, M.; LICHTMAN, A.H. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. **Neuropharmacology**, n. 60, v. 2-3, p. 244-51, 2011.

KOKO, V.; DJORDJEVIAE, J.; CVIJIJE, G.; DAVIDOVIAE, V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. **J Exp Biol**, v. 207, n. 24, p. 4225-30, 2004.

KOSHIKAWA, N.; KIKUCHI de BELTRÁN, K.; TOMIYAMA, K.; KOBAYASHI, M. COOLS, A.R. Functional interaction between dopamine D1 and D2 receptors in rat jaw movements. **Eur J Pharmacol**, v. 201, n. 1, p. 47-51, 1991.

KUBO, K.Y.; IINUMA, M.; CHEN, H. Mastication as a Stress-Coping Behavior. **Biomed Res Int**, v. 2015, n. 876409, p. 1-11, 2015.

KURRIKOFF, K.; INNO, J.; MATSUI, T.; VASAR, E. Stress-induced analgesia in mice: evidence for interaction between endocannabinoids and cholecystokinin. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 2147-55, 2008.

LASKIN, D.M. Etiology of the pain-dysfunction syndrome. **J Am Dent Assoc**, v. 79, p. 147-153, 1969.

LAVIGNE, G.J.; ROMPRE, P.H.; MONTPLAISIR, J.Y.; LOBBEZOO, F. Motor activity in sleep bruxism with concomitant jaw muscle pain. A retrospective pilot study. **Eur J Oral Sci**, v. 105, p. 92-5, 1997.

LAVIGNE, G.J.; KHOURY, S.; ABE, S.; YAMAGUCHI, T.; RAPHAEL, K. Bruxism physiology and pathology: an overview for clinicians. **J Oral Rehabil**, v. 35, n. 7, p. 476-94, 2008.

LI, Q.;ZHANG, M.; CHEN, Y.J.; WANG, Y.J.; HUANG, F.; LIU, J. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. **Physiol Behav**, v. 104, n. 3, p. 365-72, 2011.

LI, Q.;ZHANG, M.; CHEN, Y.J.; ZHOU, Q.; WANG, Y.J.; LIU, J. Psychological stress alters microstructure of the mandibular condyle in rats. **Physiol Behav**, v. 110-111, p. 129-39, 2013.

LIANG, Y.C.; HUANG, C.C.; HSU, K.S. The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 1, p. 169-77, 2007.

- LIPTON, J.A.; SHIP, J.A; LARACH-ROBINSON, D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. **J Am Dent Assoc**, v. 124, p. 115-121, 1993.
- LOBBEZOO, F.;LAVIGNE, G.J.; TANGUAY, R.; MONTPLAISIR, J.Y. The effect of catecholamine precursor L-dopa on sleep bruxism: a controlled clinical trial. **Mov Disord**, v. 12, n. 1, p. 73-8, 1997.
- LOBBEZOO, F.; NAEIJE, M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. **J Oral Rehabil**, v. 28, n. 12, p. 1085-91, 2001.
- LOBBEZOO, F.; ROMPRÉ, P.H.; SOUCY, J.P.; IAFRANCESCO, C.; TURKEWICZ, J.; MONTPLAISIR, J.Y.; LAVIGNE, G.J. Lack of associations between occlusal and cephalometric measures, side imbalance in striatal D2 receptor binding, and sleep-related oromotor activities. **J Orofac Pain**, v. 15, n. 1, p. 64-71, 2001a.
- LOBBEZOO, F.; VAN DENDEREN, R.J.A.; VERHEIJ, J.G.C.; NAEIJE, M. Reports of SSRI-associated bruxism in the Family physician's office. **J Orofac Pain**, v. 15, n. 4, p. 340-6, 2001b.
- LOBBEZOO, F.;AHLBERG, J.; MANFREDINI, D.; WINOCUR, E. Are bruxism and the bite causally related? **J Oral Rehabil**, v. 39, n. 7, p. 489-501, 2012.
- LOBBEZOO, F.; AHLBERG, J.; GLAROS, A.G.; KATO, T.; KOYANO, K.; LAVIGNE, G.J.; DE LEEUW, R.; MANFREDINI, D.; SVENSSON, P.; WINOCUR, E. Bruxism defined and graded: an international consensus. **J Oral Rehabil**, v.40, n.1, p. 2-4, 2013.
- LUND, J.P.; DONGA, R.; WIDMER, C.G.; STOHLER, C.S. The pain-adaptation model: A discussion of the relationship between chronic musculoskeletal pain and motor activity. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 69, p. 683-94, 1991.
- MACALUSO, G.M.; GUERRA, P.; DI GIOVANNI, G.; BOSELLI, M.; PARRINO, L.; TERZANO, M.G. Sleep bruxism is a disorder related to periodic arousals during sleep. **J Dent Res**, v. 77, n. 4, p. 565-73, 1998.
- MACHADO, E.; DAL-FABBRO, C.; CUNALI, P.A.; KAIZER, O.B. Prevalence of sleep bruxism in children: A systematic review. **Dental Press J Orthod**, v. 19, n. 6, p. 54-61, 2014.
- MAGEE, K.R. Bruxism related to levodopa therapy. **Journal of the American Medical Association**, n. 214, p. 147, 1970.
- MANFREDINI, D.; LANDI, N.; FANTONI, F.; SEGÙ, M.; BOSCO, M. Anxiety symptoms in clinically diagnosed bruxers. **J Oral Rehabil**, v, 32, n. 8, p. 584-8, 2005.
- MANFREDINI, D.; LOBBEZOO, F. Relationship between bruxism and temporomandibular disorders: a systematic review of literature from 1998 to 2008. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 6, p. e26-50, 2010.

- MARKLUND, S.; WÄNMAN, A. Incidence and prevalence of miofascial pain in the jaw-face region. A one-year prospective study on dental students. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 2, p. 113-21, 2008.
- MARSH, J.T.; RASMUSSEN, A.F. Jr. Response of adrenals, thymus, spleen and leucocytes to shuttle box and confinement stress. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 104, p. 180-3, 1960.
- MASCARO, M.B.; BITTENCOURT, J.C.; CASATTI, C.A.; ELIAS, C.F. Alternative pathways for catecholamine action in oral motor control. **Neurosci Lett**, v. 386, n. 1, p. 34-9, 2005.
- MASCARO, M. B.; SOUZA, M. R.; PICOLI, L. C.; PROSDÓCIMI, F. C. O complexo trigeminal e as desordens da motricidade mandibular. **ConScientiae Saúde**, v. 7, n. 4, p. 449-456, 2008.
- MASCARO, M. B.; PROSDÓCIMI, F. C.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Forebrain projections to brainstem nuclei involved in the control of mandibular movements in rats. **Eur J Oral Sci**, v. 117, p. 676–684, 2009.
- MCPARTLAND, J.M. Expression of the endocannabinoid system in fibroblasts and myofascial tissues. **J Bodyw Mov Ther**, v. 12, n. 2, p. 169-82, 2008.
- MECHOULAM R. Marihuana chemistry. **Science**, v. 168, n. 936, p. 1159-66, 1970.
- MICHELOTTI, A.; CIOFFI, I.; FESTA, P.; SCALA, G.; FARELLA, M. Oral parafunctions as risk factors for diagnostic TMD subgroups. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 37, p. 157-162, 2010.
- MOLINA, O.F.; DOS SANTOS, J.; MAZZETTO, M.; NELSON, S.; NOWLIN, T.; MAINIERI, E.T. Oral jaw behaviors in TMD and bruxism: a comparison study by severity of bruxism. **Cranio**, v. 19, n. 2, p. 114-122, 2001.
- MOLINA, O.F.; SOBREIRA, M.A.; TAVARES, P.G.; DIB, J.E.; AQUILINO, R.N. Anxiety in craniomandibular disorders and bruxing behavior patients: The role of pain in single and multiple sites and severity of bruxing behavior. Part I: Inclusion of the extreme behavior group and report of preliminary psychological data on anxiety. **Revista Neurociências**, v. 14 n. 1, p. 23-30, 2006.
- MOLINA, O.F.; SANTOS, Z.C.; RANK, R.C.L.; SIMIÃO, B.R.H.; EID, N.L.M.; CORREA, M.B.; GAMA, K.R. Antidepressant use, pain severity and pain at multiple sites in patients with bruxism. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 2, n. 3, p. 11-17, 2011.
- MOLINA, O.F.; SANTOS, Z.C.; SIMIÃO, B.R.H.; MARCHEZAN, R. F.; SILVA, N.P.; GAMA, K.R. A comprehensive method to classify subgroups of bruxers in temporomandibular disorders (TMDs) individuals: frequency, clinical and psychological implications. **RSBO**, v. 10, n.1, p. 11-19, 2013.
- MURALI, R. V.; RANGARAJAN, P.; MOUNISSAMY, A. Bruxism: Conceptual Discussion and Review. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, Suppl 1, p. S265–S270, 2015.

NADAL, X.; LA PORTA, C.; ANDREEA BURA, S.; MALDONADO, R. Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. **Eur J Pharmacol**, v. 716, n. 1-3, p. 142-57, 2013.

NAHÁS-SCOCATE, A.C.R.; COELHO, F.V.; DE ALMEIDA, V.C. Bruxism in children and transverse plane of occlusion: Is there a relationship or not? **Dental Press J Orthod**, v. 19, n. 5, p. 67-73, 2014.

NEWMAN, Z.; MALIK, P.; WU, T.Y.; OCHOA, C.; WATSA, N.; LINDGREN, C. Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 1619–1630, 2007.

NICHOLSON, R.A.; TOWNSEND, D.R.; GRAMLING, S.E. Influence of a scheduled-waiting task on EMG reactivity and oral habits among facial pain patients and no-pain controls. **Appl Psychophysiol Biofeedback**, v. 25, n. 4, p. 203-19, 2000.

NIU, K.Y.; ZHANG, Y.; RO, J.Y. Effects of gonadal hormones on the peripheral cannabinoid receptor 1 (CB1R) system under a myositis condition in rats. **Pain**, v. 153, n. 11, p. 2283-91, 2012.

NUSSDORFER, G.G. Cytophysiology of the adrenal cortex. **Int Rev Cytol**, v. 98, p. 1-405, 1986.

OGAWA, N.; HARA, C.; ISHIKAWA, M. **Characteristics of socio-psychological stress induced by the communication box method in mice and rats**. In: Manninen O (ed.) Environmental stress. ACES Publishing Ltd, Tampele, pp. 417–427, 1990.

OHRBACH, R.; BLASCOVICH, J.; GALE, E.N.; MCCALL WD, J.R.; DWORKIN, S.F. Psychophysiological assessment of stress in chronic pain: comparisons of stressful stimuli and of response systems. **J Dent Res**, v. 77, n. 10, p. 1840-50, 1998.

OKAMOTO, K.; TASHIRO, A.; CHANG, Z.; THOMPSON, R.; BEREITER, D.A. Temporomandibular joint-evoked responses by spinomedullary neurons and masseter muscle are enhanced after repeated psychophysical stress. **Eur J Neurosci**, v. 36, n. 1, p. 2025-34, 2012.

OKESON, J.P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PANKAJ, S.; FATIMA, B.; DILIP, S.; MRIDUL, T.; ZUNAIRA, I.U.I.H.; MISHKAAT, H. Myofascial Pain-Dysfunction Syndrome. **IJMRD**, v. 2, n. 2, p. 649-652, 2015.

PATEL, S.; HILLARD, C.J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 318, p. 304-11, 2006.

PATEL, S. B.; KUMAR, S. K. S. Myofascial pain secondary to medication-induced bruxism. **JADA**, v. 143, n. 10, p. e67-69, 2012.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PERTWEE, R.G. Cannabinoid receptors and pain. **Prog Neurobiol**, v. 63, n. 5, p. 569-611, 2001.

PERTWEE, R.G.; ROSS, R.A. Cannabinoid receptors and their ligands. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 66, n. 2-3, p. 101-21, 2002.

PIERCE, C.J.;CHRISMAN, K.; BENNETT, M.E.;CLOSE, J.M. Stress, anticipatory stress, and psychologic measures related to sleep bruxism. **J Orofac Pain**, v. 9, n. 1, p. 51-6, 1995.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-84, 2003.

PRICE, T.J.; HELESIC, G.; PARGHI, D.; HARGREAVES, K.M.; FLORES, C.M. The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. **Neuroscience**, v. 120, n. 1, p. 155-62, 2003.

QUINTERO, L.; CUESTA, M.C.; SILVA, J.A.; ARCAYA, J.L.; PINERUA-SUHAIBAR, L.; MAIXNER, W.;SUAREZ-ROCA, H. Repeated swim stress increases pain induced expression of c-Fos in the rat lumbar cord. **Brain Res**, v. 965, p. 259-268, 2003.

RAO, S.M.; GLAROS, A.G. Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals. **J Dent Res**, v. 58, n. 9, p. 1872-8, 1979.

RINTAKOSKI, K.; AHLBERG, J.; HUBLIN, C.; LOBBEZOO, F.; ROSE, R.J.; MURTOMAA, H.; KAPRIO, J. Tobacco use and reported bruxism in young adults: A nationwide Finnish Twin Cohort Study. **Nicotine Tob Res**, v. 12, n. 6, p. 679-83, 2010.

ROSALES, V. P.; 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**, v. 24, p. 107-17, 2002.

SAGAR, D.R.; GAW, A.G.; OKINE, B.N.; WOODHAMS, S.G.; WONG, A.; KENDALL, D.A.; CHAPMAN, V. Dynamic regulation of the endocannabinoid system: implications for analgesia. **Mol Pain**, v. 5, n. 59, p. 1-13, 2009.

SÁNCHEZ-PASTOR, E.; TRUJILLO, X.; HUERTA, M.; ANDRADE, F. Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, p. 439-445, 2007.

SÁNCHEZ-ROBLES, E.M.; BAGÜES, A.A., MARTÍN, F.M.I. Cannabinoids and muscular pain. Effectiveness of the local administration in rat. **Eur J Pain**, v. 16, n. 8, p. 1116-27, 2012.

SANTOS SILVA, R.S.; CONTI, P.C.; LAURIS, J.R. DA SILVA, R.O.; PEGORARO, L.F. Pressure pain threshold in the detection of masticatory myofascial pain: an algometer-based study. **J Orofac Pain**, v. 19, n. 4, p. 318-24, 2005.

SATO, C.; SATO, S.; TAKASHINA, H.; ISHII, H.; ONOZUKA, M.; SASAGURI, K. Bruxism affects stress responses in stressed rats. **Clin Oral Investig**, v. 14, n. 2, p. 153-60, 2010.

SEO, K.; HU, J. W.; CAIRNS, B. E.; SOMEYA, G. Involvement of GABA<sub>A</sub> receptor in modulation of jaw muscle activity evoked by mustard oil application to the rat temporomandibular joint. **Brain Research**, v. 892, n. 1, p. 198-202, 2001.

SHAH, J.P.; PHILLIPS, T.M.; DANOFF, J.V.; GERBER, L.H. An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. **J Appl Physio**, v. 99, p. 1977-1984, 2005.

SHETTY, S.; PITTI, V.; SATISH BABU, C. L.; SURENDRA KUMAR, G. P.; DEEPTHI, B. C.Bruxism: A Literature Review. **J Indian Prosthodont Soc**, v. 10, n. 3, p. 141-8, 2010.

SHIMIZU, K.; ASANO, M.; KITAGAWA, J.; OGISO, B.; REN, K.; OKI, H.; MATSUMOTO, M.; IWATA, K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. **Brain Res**, v. 1072, n. 1, p. 99-109, 2006.

SIDEBOTTOM, A.J.; PATEL, A.A.; AMIN, J. Botulinum injection for the management of myofascial pain in the masticatory muscles. A prospective outcome study. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 3, p. 199-205, 2013.

SVENSSON, P.; JADIDI, F.; ARIM, T.; BAAD-HANSEN, L.; SESSLE, B.J. Relationships between craniofacial pain and bruxism. **J Oral Rehabil**, v. 35, n. 7, p. 524-47, 2008.

TAHARA, Y.; SAKURAI, K.; ANDO, T. Influence of chewing and clenching on salivary cortisol levels as an indicator of stress. **J Prosthodont**, v. 16, n. 2, p. 129-25, 2007.

TAMBELI, C. H.; SEO, K.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Central  $\mu$  opioid receptor mechanisms modulate mustard oil-evoked jaw muscle activity. **Brain Research**, v. 913, p. 90-94, 2001.

TSAI, C.M.; CHOU, S.L.; GALE, E.N.; MCCALL WD, J.R. Human masticatory muscle activity and jaw position under experimental stress. **J Oral Rehabil**, v. 29, n. 1, p. 44-51, 2002.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.

VAN DER MEULEN, M. J.; LOBBEZOO, F.; AARTMAN, I. H.; NAEIJE, M. Selfreported oral parafunctions and pain intensity in temporomandibular disorder patients. **J Orofac Pain**, v. 20, p. 31-35, 2006.

VANDERAS, A.P.; MENENAKOU, M.; KOUIMTZIS, T.; PAPAGIANNIOLIS, L. Urinarycatecholaminelevels and bruxism in children. **J Oral Rehabil**, v. 26, n. 2, p. 103-10, 1999.

WALKER, J.M.; STRANGMAN, N.M.; HUANG, S.M. Cannabinoids and pain. **Pain Res Manag**, v. 6, p. 74-79, 2001.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M. Cannabinoid analgesia. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, n. 2, p.127- 35, 2002.

WANG, K.; ARIMA, T.; ARENDT-NIELSEN, L.; SVENSSON, P. EMG-force relationships are influenced by experimental jaw-muscle pain. **J Oral Rehabil**, v. 27, n. 5, p. 394-402, 2000.

WARE, M.A.; DOYLE, C.R.; WOODS, R.; LYNCH, M.E.; CLARK, A.J. Cannabis use for chronic non-cancer pain: results of a prospective survey. **Pain**, v. 102, n. 1-2, p. 211-6, 2003.

WARE, M.A.; WANG, T.; SHAPIRO, S.; ROBINSON, A.; DUCRUET, T.; HUYNH, T.; GAMS, A.; BENNETT, G.J.; COLLET, J.P. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. **Canadian Medical Association Journal**, v. 182, n. 14, p. E694-701, 2010.

WATANABE, T.; ICHIKAWA, K.; CLARK, G.T. Bruxism levels and daily behaviors: 3 weeks of measurement and correlation. **J Orofac Pain**, v. 17, n. 1, p. 65-73, 2003.

WATANABE, T.; TSUBOI, Y.; SESSLE, J. B.; IWATA, K.; HU, J. W. P2X and NMDA receptor involvement in temporomandibular joint-evoked reflex activity in rat jaw muscles. **Brain Research**, v. 1346, p. 83-91, 2010.

WIECKIEWICZ, M.; PARADOWSKA-STOLARZ, A.; WIECKIEWICZ, W. Psychosocial aspects of bruxism: the most paramount factor influencing teeth grinding. **Biomed Res Int**, v. 2014, n. 469187, p. 1-7, 2014.

WINOCUR, E.; LITTNER, D.; ADAMS, I.; GAVISH, A. Oral habits and their association with signs and symptoms of temporomandibular disorders in adolescents: a gender comparison. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p. 482-487, 2006.

WINOCUR, E.; HERMESH, H.; LITTNER, D.; SHILOH, R.; PELEG, L.; ELI, I. Signs of bruxism and temporomandibular disorders among psychiatric patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 1, p. 60-63, 2007.

WRUBLE, M.K.; LUMLEY, M.A.; MCGLYNN, F.D. Sleep-related bruxism and sleep variables: a critical review. **J Craniomandib Disord**, v. 3, n. 3, p. 152-8, 1989.

WU, G.; CHEN, L.; FEI, H.; SU, Y.; ZHU, G.; CHEN, Y. Psychological stress may contribute to temporomandibular joint disorder in rats. **J Surg Res**, v. 183, n. 1, p. 233-9, 2013.

YACHIDA, W.; CASTRILLON, E. E.; BAAD-HANSEN, L.; JENSEN, R.; ARIMA, T.; TOMONAGA, A.; OHATA, N.; SVENSSON, P. Craniofacial Pain and Jaw-muscle Activity during Sleep. **J Dent Res**, v. 91, n. 6, p. 562-567, 2012.

YADAV, S.A Study on Prevalence of Dental Attrition and its Relation to Factors of Age, Gender and to the Signs of TMJ Dysfunction. **J Indian Prosthodont Soc**, v. 11, n. 2, p. 98-105, 2011.

YENG, L.T.; KAZIYAMA, H.H.; TEIXEIRA, M.J. Síndrome dolorosa miofascial. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 3, n. 9, p. 27-43, 2003.

ZHAO, Y.J.; LIU, Y.; LI, Q.; ZHAO, Y.H.; WANG, J.; ZHANG, M.; CHEN, Y.J. Involvement of trigeminal astrocyte activation in masseter hyperalgesia under stress. **Physiol Behav**, v.241, p. 57-64, 2015.

ZOGOPOULOS, P.; VASILEIOU, I.; PATSOURIS, E.; THEOCHARIS, S. E. The role of endocannabinoids in pain modulation. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, p. 64-80, 2013.

## ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



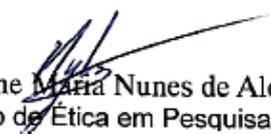
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 35/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA E NOCICEPÇÃO NO BUXISMO EXPERIMENTAL EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE.”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Mariana Lima Vale e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 24 de julho de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPADFF/FAMED/UFCE  
MAT. SIAPE 2166369

## ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DA FIGURA 28A

Two-way RM ANOVA		Matching by cols				
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	16,36	< 0.0001				
DRUG	5,76	0,0034				
Time	45,91	< 0.0001				
Subjects (matching)	6,4197	0,3347				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	***	Yes				
DRUG	**	Yes				
Time	***	Yes				
Subjects (matching)	ns	No				
Source of Variation	Df	Sum-of- squares	Mean square	F		
Interaction	12	6589	549,1	4,124		
DRUG	4	2322	580,6	4,361		
Time	3	18494	6165	40,52		
Subjects (matching)	17	2586	152,1	1,143		
Residual	68	9053	133,1			
Number of missing values	0					
Bonferroni posttests						
CONT vs CONT + AM 251						
Time	CONT	CONT + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	132,1	146,4	14,29	-11.20 to 39.78	P > 0.05	ns
4	142,3	151,3	8,97	-16.52 to 34.46	P > 0.05	ns
8	138,9	139,3	0,385	-25.11 to 25.88	P > 0.05	ns
11	142,1	141	-1,08	-26.57 to 24.41	P > 0.05	ns
14	138,3	150,4	12,03	-13.46 to 37.52	P > 0.05	ns
CONT vs ES + VEÍCULO						
Time	CONT	ES + VEÍCULO	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	132,1	128,6	-3,44	-27.48 to 20.60	P > 0.05	ns

4	142,3	124,5	-17,78	-41.82 to 6.256	P > 0.05	ns
8	138,9	117,7	-21,24	-45.28 to 2.796	P < 0.05	*
11	142,1	112,1	-29,96	-54.00 to - 5.924	P < 0.001	***
14	138,3	121,9	-16,42	-40.46 to 7.616	P > 0.05	ns

## CONT vs ES + AM 251

Time	CONT	ES + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	132,1	143,6	11,55	-10.70 to 33.81	P > 0.05	ns
4	142,3	105	-37,25	-59.50 to - 15.00	P < 0.001	***
8	138,9	101,6	-37,33	-59.58 to - 15.07	P < 0.001	***
11	142,1	104,6	-37,49	-59.75 to - 15.24	P < 0.001	***
14	138,3	108,5	-29,79	-52.04 to - 7.539	P < 0.001	***

## CONT + AM 251 vs ES + VEÍCULO

Time	CONT + AM 251	ES + VEÍCULO	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	146,4	128,6	-17,73	-43.22 to 7.764	P > 0.05	ns
4	151,3	124,5	-26,75	-52.24 to - 1.256	P < 0.01	**
8	139,3	117,7	-21,63	-47.12 to 3.869	P < 0.05	*
11	141	112,1	-28,88	-54.37 to - 3.386	P < 0.01	**
14	150,4	121,9	-28,45	-53.94 to - 2.956	P < 0.01	**

## CONT + AM 251 vs ES + AM 251

Time	CONT + AM 251	ES + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	146,4	143,6	-2,736	-26.56 to 21.08	P > 0.05	ns
4	151,3	105	-46,22	-70.04 to - 22.40	P < 0.001	***
8	139,3	101,6	-37,71	-61.53 to - 13.89	P < 0.001	***
11	141	104,6	-36,41	-60.23 to - 12.59	P < 0.001	***
14	150,4	108,5	-41,82	-65.64 to - 18.00	P < 0.001	***

## ES + VEÍCULO vs ES + AM 251

Time	ES +	ES + AM 251	Difference	95% CI of	P value	Summary
------	------	-------------	------------	-----------	---------	---------

	VEÍCULO			diff.		
0	128,6	143,6	14,99	-7.259 to 37.25	P > 0.05	ns
4	124,5	105	-19,47	-41.72 to 2.781	P < 0.05	*
8	117,7	101,6	-16,09	-38.34 to 6.167	P > 0.05	ns
11	112,1	104,6	-7,534	-29.79 to 14.72	P > 0.05	ns
14	121,9	108,5	-13,37	-35.62 to 8.881	P > 0.05	ns

### ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA TWO-WAY ANOVA DA FIGURA 28B

Two-way RM ANOVA		Matching by cols				
Source of Variation	% of total variation	P value				
Interaction	18,74	P<0.0001				
DRUG	9,69	P<0.0001				
TIME	46,25	P<0.0001				
Subjects (matching)	4,2979	0,4814				
Source of Variation	P value summary	Significant?				
Interaction	***	Yes				
DRUG	***	Yes				
TIME	***	Yes				
Subjects (matching)	ns	No				
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F		
Interaction	12	6318	526,5	5,005		
DRUG	4	3267	816,8	7,765		
TIME	3	15590	5197	50,21		
Subjects (matching)	14	1449	103,5	0,9838		
Residual	56	5891	105,2			
Number of missing values		0				
Bonferroni posttests						
CONT vs CONT + AM 251						
TIME	CONT	CONT + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	130	134,7	4,775	-18.91 to 28.46	P > 0.05	ns
4	135,3	140	4,725	-18.96 to 28.41	P > 0.05	ns
8	132,7	128,8	-3,85	-27.53 to 19.83	P > 0.05	ns
11	138,2	124,5	-13,7	-37.38 to 9.982	P > 0.05	ns
14	144,9	131,6	-13,35	-37.03 to 10.33	P > 0.05	ns
CONT vs ES + AM 251						
TIME	CONT	ES + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	130	134,1	4,136	-16.86 to 25.13	P > 0.05	ns
4	135,3	92,59	-42,66	-63.66 to -	P<0.0	***

				21.67	01	
8	132,7	106,8	-25,86	-46.86 to - 4.873	P<0.0 01	***
11	138,2	100,7	-37,54	-58.53 to - 16.55	P<0.0 01	***
14	144,9	100,7	-44,2	-65.19 to - 23.20	P<0.0 01	***

## CONT vs ES + VEÍCULO

TIME	CONT	ES + VEÍCULO	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	130	131,2	1,217	-24.36 to 26.80	P > 0.05	ns
4	135,3	100,1	-35,12	-60.70 to - 9.538	P<0.0 01	***
8	132,7	96,23	-36,42	-62.00 to - 10.84	P<0.0 01	***
11	138,2	102,9	-35,3	-60.88 to - 9.721	P<0.0 01	***
14	144,9	118,1	-26,79	-52.37 to - 1.213	P<0.0 1	**

## CONT + AM 251 vs ES + AM 251

TIME	CONT + AM 251	ES + AM 251	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	134,7	134,1	-0,6393	-21.63 to 20.35	P > 0.05	ns
4	140	92,59	-47,39	-68.38 to - 26.40	P<0.0 01	***
8	128,8	106,8	-22,01	-43.01 to - 1.023	P<0.0 1	**
11	124,5	100,7	-23,84	-44.83 to - 2.851	P<0.0 1	**
14	131,6	100,7	-30,85	-51.84 to - 9.855	P<0.0 01	***

## CONT + AM 251 vs ES + VEÍCULO

TIME	CONT + AM 251	ES + VEÍCULO	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
0	134,7	131,2	-3,558	-29.14 to 22.02	P > 0.05	ns
4	140	100,1	-39,84	-65.42 to - 14.26	P<0.0 01	***
8	128,8	96,23	-32,57	-58.15 to - 6.988	P<0.0 01	***
11	124,5	102,9	-21,6	-47.18 to 3.979	P < 0.05	*
14	131,6	118,1	-13,44	-39.02 to 12.14	P > 0.05	ns

## ES + AM 251 vs ES + VEÍCULO

TIME	ES + AM 251	ES + VEÍCULO	Difference	95% CI of diff.	P value	Summary
------	-------------	-----------------	------------	--------------------	------------	---------

0	134,1	131,2	-2,919	-26.03 to 20.19	P > 0.05	ns
4	92,59	100,1	7,548	-15.56 to 30.66	P > 0.05	ns
8	106,8	96,23	-10,55	-33.66 to 12.56	P > 0.05	ns
11	100,7	102,9	2,243	-20.87 to 25.35	P > 0.05	ns
14	100,7	118,1	17,4	-5.706 to 40.52	P > 0.05	ns