



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

BRUNA ELAINE CABRAL AZEVEDO PONTE

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
MUSCULAR MASTIGATÓRIA EM UM MODELO DE BRUXISMO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E DAS DIFERENÇAS ENTRE OS SEXOS**

FORTALEZA

2017

BRUNA ELAINE CABRAL AZEVEDO PONTE

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
MUSCULAR MASTIGATÓRIA EM UM MODELO DE BRUXISMO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E DAS DIFERENÇAS ENTRE OS SEXOS**

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: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P857c Ponte, Bruna Elaine Cabral Azevedo.

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA EM UM MODELO DE BRUXISMO EM RATOS: AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E DAS DIFERENÇAS ENTRE OS SEXOS / Bruna Elaine Cabral Azevedo Ponte. – 2017.

91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale..

1. Bruxismo. 2. Estresse emocional/ Nocicepção. 3. Eletromiografia. 4. Gênero. 5. Receptor D2.. I. Título.

CDD 615.1

BRUNA ELAINE CABRAL AZEVEDO PONTE

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA EM UM MODELO DE BRUXISMO EM RATOS: AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E DAS DIFERENÇAS ENTRE OS SEXOS

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.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Delane Viana Gondim
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora pelas graças alcançadas, por todo livramento, proteção e por sempre me guiarem pelo caminho certo em toda a minha vida.

Aos meus pais, Benedito e Eliane, meus exemplos, meu porto-seguro, pelo amor, dedicação, educação, proteção, apoio e pela fé inabalável.

Ao meu marido, François, o amor da minha vida, minha fortaleza e orgulho, pela parceria, paciência, amor, cuidado e perseverança.

A Profa. Dra. Mariana Lima Vale, minha orientadora, por todo orientação, confiança, apoio, paciência e compreensão nas horas mais difíceis, sendo uma grande responsável pelo feito.

A Profa. Dra. Delane Viana Gondim, minha co-orientadora, pelas suas orientações, sugestões, conhecimento e apoio.

A Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar e ao Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima por toda ajuda e colaborações enriquecedoras.

Aos professores, Dr. Ronaldo Albuquerque, (*in memoriam*), Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Sousa e Dr. Maximilliano Loiola Ponte de Sousa, pela confiança, orientações e apoio.

Aos meus sogros, Dr. Marcus Vinícius (*in memoriam*) e Norma Ponte, pelo amor, compreensão, ensinamentos e pensamentos positivos.

A todos da minha família, pelas orações, força e o acolhimento.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Farmacologia por toda ajuda e contribuições científicas divididas.

Aos alunos de iniciação científica, Jéssica Jamile, Diego Bernade, Paulo Henrique e Bruno Freitas pelo companheirismo e dedicação essenciais a essa pesquisa.

Aos amigos, Kalina, Wesley, Denilde, Laura, Marcos, Helson, Mário, AnaMaria e Sarah por toda ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do Biotério, pela ajuda física, pelas risadas e o apoio durante os experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), por toda força, carinho e pensamentos positivos.

Ao Laboratório de Patologia e Morfologia, pelas contribuições físicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram pela realização desse trabalho.

“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a
minha fortaleza e nele confiarei.
Nenhum mal te sucederá, nem praga
alguma chegará à tua tenda.
Porque aos seus anjos dará ordem a teu
respeito, para te guardarem em todos os
teus caminhos.” (Salmos 91:2,10,11)

RESUMO

O bruxismo é o hábito de apertar e ranger os dentes. Apresentando uma maior incidência em mulheres quando comparado a homens na proporção de 5:1, possivelmente devido à suscetibilidade a fatores emocionais ou anatômicos, mas não deixando de afetar o sexo masculino. O objetivo do trabalho foi avaliar um novo método de eletromiografia (EMG) da atividade muscular mastigatória, a nocicepção associada e as diferenças entre os sexos em um modelo de bruxismo induzido por estresse em ratos. O bruxismo experimental foi induzido por estresse emocional através da caixa de comunicação durante quatorze dias (D1 a D14). A atividade muscular mastigatória (AMM) foi avaliada a cada 2 dias antes e após a indução de estresse por EMG utilizando um dispositivo móvel de confecção própria, que foi posicionado na região dos músculos masseter e temporal. A nocicepção foi avaliada pelo teste de hiperalgesia mecânica nos referidos músculos. Também foram avaliadas as fases do ciclo estral, os parâmetros de comportamento de ansiedade, peso corporal, peso bruto das glândulas adrenais e a expressão de c-Fos em gânglio trigeminal (GT) e dos receptores de dopamina D2 (D2R) no corpo estriado (CE). Os resultados demonstraram que não houve diferença entre o registro basal feito com o dispositivo móvel e eletrodos implantados subcutâneos, validando o novo método. Houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da AMM no D7 e D10 para as fêmeas e nos machos ocorreu no D3 e D7. Nos D10 e D14, nos ratos houve uma diminuição das frequências, o que só aconteceu no D14 para as fêmeas. A comparação entre machos e fêmeas mostra uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos D7 e 14. Fêmeas ovariectomizadas (FO) foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) das fêmeas normais dos D7 a 14. Com relação a diferenças de limiar nociceptivo entre machos e fêmeas, observamos que as fêmeas atingem o pico de nocicepção de forma mais precoce do que os machos, ocorrendo no D4 enquanto que nos machos o pico aparece no D14 (m.temporal) e a partir do D11 (m.masseter). FO, após o D11 começaram a apresentar um aumento na nocicepção, de forma semelhante aos machos que também aumentaram seu comportamento nociceptivo nesse mesmo período. Houve correlação positiva entre a AMM e a nocicepção de fêmeas, mas não dos machos. As fases do ciclo estral tiveram correlação com a AMM. Tantos os animais estressados machos como as fêmeas apresentaram comportamento de ansiedade. Os resultados demonstraram ainda que os animais

estressados machos e fêmeas apresentaram acúmulo de vacúolos citoplasmáticos no córtex das glândulas adrenais, não havendo diferenças entre os sexos. Houve uma maior expressão de c-Fos em GT de ratos machos e fêmeas estressadas. A ovariectomia inibe esse aumento de expressão nas fêmeas estressadas. Nas ratas estressadas houve um aumento da expressão do receptor D2 no CE o que foi inibido pela ovariectomia. Os dados sugerem que o dispositivo móvel usado para registro de EMG funcionou de forma semelhante ao eletrodo implantado, evidenciando uma maior AMM em animais estressados. Houve diferenças entre machos e fêmeas no que diz respeito ao bruxismo e a nocicepção. A ovariectomia modificou estas respostas. A nocicepção parece estar associada ao bruxismo nas fêmeas, mas não depende do ciclo estral, enquanto que o bruxismo parece estar relacionado aos hormônios femininos dependendo do ciclo estral. O D2R parece ter associação com o estresse emocional/bruxismo em fêmeas, o que pode ser influenciado pelos hormônios gonadais.

Palavras-chave: Bruxismo. Estresse emocional. Eletromiografia. Nocicepção. Gênero. Receptor D2.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF A NEW METHOD OF EVALUATION OF MUSCULAR MASTIGATING ACTIVITY IN A MODEL OF BRUXISM IN RATS: EVALUATION OF NOCICEPTION AND DIFFERENCES BETWEEN SEX

Bruxism is the habit of squeezing and grinding the teeth. The incidence of this pathology has increased progressively in the population, prevailing in females in the proportion of 5:1, possibly due to the susceptibility to emotional or anatomical factors, but not affecting males. The aim of this study was to evaluate a new method of electromyography (EMG) of the masticatory muscular activity, associated nociception and differences between sexes in a model of bruxism in rats. Experimental bruxism was induced by emotional stress through the communication box for fourteen days (D1 to D14). The masticatory muscle activity (MMA) was evaluated every 2 days before and after induction of stress using a mobile device for EMG made by over one, which was positioned in the region of the masseter and temporal muscles. Nociception was evaluated by the mechanical hyperalgesia test in these muscles. Stages of the estrous cycle, anxiety behavior, body weight, adrenal gland weight, and expression of c-Fos in trigeminal ganglion (TG) and dopamine D2 (D2R) receptors were also evaluated in the striatum. The results showed that there was no differences between the basal register made with the mobile device and the subcutaneous implanted electrodes, validating the new method. There was a significant ($p < 0.001$) increase in MMA in D7 and D10 for females and in males that occurred in D3 and D7. In D10 and D14, in male there was a decrease in the frequencies, which only occurred in D14 for females. Comparison between males and females showed a significant difference ($p < 0.001$) in D7 and 14. Ovariectomized females (OF) were significantly different ($p < 0.001$) from normal females from D7 to 14. In relation to nociceptive threshold, there were differences between males and females. We observed that females reached the peak of nociception more early than males, occurring in D4 (females) whereas in males the peak appears in D14 (m.temporal) and from D11 (m.masseter). OF, after D11 began to show an increase in nociception, similar to males that also increased their nociceptive behavior in the same period. There was a positive correlation between MMA and nociception for the females, but not for the males. The phases of the estrous cycle had a correlation with

MMA. Both males and females showed anxiety behavior. The results also showed that the male and female stressed animals presented accumulation of cytoplasmic vacuoles in the adrenal gland cortex, with no differences between the sexes. There was a greater expression of c-Fos in TG of male and female stressed rats. Ovariectomy inhibited this increased expression in stressed females. In the stressed rats there was an increase in D2R expression in the striatum which was inhibited by ovariectomy. The data suggest that the mobile device used for EMG recording worked in a similar way to the implanted electrode, evidencing an increased MMA in stressed animals. There were differences between males and females with regard to bruxism and nociception. Ovariectomy modified these responses. Nociception seems to be associated with bruxism in females, but it does not depend on the estrous cycle, whereas bruxism seems to be related to female hormones depending on the estrous cycle. D2R appears to be associated with emotional stress / bruxism in females, which may be influenced by gonadal hormones.

Keywords: Bruxism. Emotional stress. Electromyography Nociception. Genre. D2 receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Músculos responsáveis pela mastigação	15
Figura 2 – Posicionamento dos núcleos do complexo trigeminal	22
Figura 3 – Eletromiografia não invasiva nos músculos masseter e temporal	28
Figura 4 – Esquema ilustrativo do protocolo experimental	34
Figura 5 – Caixa de comunicação.	35
Figura 6 – Dispositivo móvel para aquisição de dados eletromiográfico de músculos mastigatórios	36
Figura 7 – Registro eletromiográfico.....	38
Figura 8 – Fotomicrografias evidenciando as fases Proestro e Diestro do ciclo estro de ratas fêmeas.....	41
Figura 9 – Cirurgia de ovariectomia em ratas.....	42
Figura 10 – Avaliação comparativa entre o registro eletromiográfico através de eletrodos implantados e o dispositivo móvel em ratos não estressados.....	46
Figura 11 – Efeito do estresse emocional sobre a atividade muscular mastigatória entre ratos e ratas (normais e ovariectomizadas).....	48
Figura 12 – Efeito do estresse emocional no limiar nociceptivo da região dos músculos masseter e temporal.....	51
Figura 13 – Análise do comportamento de ansiedade de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional.....	53
Figura 14 – Análise do comportamento de ansiedade de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional.....	54
Figura 15 – Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e limiar nociceptivo de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional	55
Figura 16 – Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estro em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional	56
Figura 17 – Análise do ganho de peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional.....	57
Figura 18 – Peso bruto das glândulas adrenais de ratos e ratas submetidas ao modelo de estresse emocional.....	58

Figura 19 – Fotomicrografias do córtex glândulas adrenais (zona fasciculada) de ratos submetidos a estresse emocional	59
Figura 20 – Avaliação da área de vacúolos citoplasmáticos na zona fasciculada da glândula adrenal de ratos submetidos a estresse emocional	60
Figura 21 – Fotomicrografia da imunexpressão c-Fos em gânglio trigeminal de ratos emocionalmente estressados (aumento 200x)	61
Figura 22 – Fotomicrografia da imunexpressão de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas emocionalmente estressadas (aumento 100x)	63
Figura 23 – Fotomicrografia da imunexpressão de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas emocionalmente estressadas (Aumento 200x)	64
Figura 24 – Quantificação da percentagem de área marcada da imunofluorescência de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas submetidas ao estresse emocional.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOP	Academia Americana de Dor Orofacial
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
ANOVA	Análise de Variância
ATMs	Articulações temporomandibulares
C	Corpo estriado de ratas controle
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CF	Ratas controle
cm	centímetros
CM	Fotomicrografia confocal de gânglio trigeminal de ratos controle
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Controle ovariectomizadas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Controle; C	Não estressados emocionalmente
C-ova	Controle ovariectomizadas
CP	Emissores de estresse através do choque elétrico da pata
CPu	Corpo estriado
CRF	Corticortrofinas
D1	Primeiro dia
E	Estressadas
ECG	Eletrocardiograma
EF	Estressadas
EM	Estressados
EMG	Eletromiografia
EO	Estressadas ovariectomizadas
Eova	Estressadas ovairectomizadas
EPM	Erro padrão da média
Estressada; E	Estressada emocionalmente
g	gramas
HeE	Hematoxilina e Eosina
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
Hz	hertz

i.p	Via intraperitoneal
kg	quilogramas
kHz	quilohertz
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer da UFC
MD	Masseter direito
ME	Masseter esquerdo
Me5	Núcleo mesencefálico
mg	miligramas
min	minutos
Mo5	Núcleo motor
NA	Noradrenalina
NeuN	Núcleo Neuronal
O	Não estressadas ovariectomizadas
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Periodo Ativo
PBS	Tampão fosfato-salina
PFA	Paraformaldeído
PI	Periodo Inativo
Pr5	Núcleo principal
REM	Movimento rápido dos olhos
SE	Sistema estomatognático
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
Sp5	Núcleo espinal
Sp5C	Caudal
Sp5I	Interpolar
Sp5O	Oral
Su5	Núcleo supratrigeminal
TD	Temporal direito
TE	Temporal esquerdo
TN	Teste nociceptivo
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Bruxismo	17
1.2	Fisiopatologia do bruxismo	20
1.2.1	<i>Ansiedade e estresse como fatores desencadeantes de bruxismo</i>	20
1.3	Dor orofacial relacionada ao bruxismo	23
1.4	Dor orofacial e gênero	25
1.5	Métodos de avaliação do bruxismo e modelos experimentais	28
1.6	Eletromiografia	29
1.7	Justificativa	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Geral	33
2.2	Específicos	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Animais	34
3.2	Grupos experimentais	34
3.3	Protocolo experimental	35
3.4	Modelo de indução de bruxismo através do estresse emocional	36
3.5	Dispositivo móvel para a realização da EMG	37
3.6	Eletromiografia	39
3.6.1	<i>Registro</i>	39
3.6.2	<i>Análise</i>	40
3.7	Teste Nociceptivo – Hiperalgisia mecânica dos músculos masseter e temporal	41
3.8	Teste do campo aberto	41
3.9	Determinação do ciclo estral das ratas	42
3.10	Castração	43
3.11	Remoção do gânglio trigeminal e o corpo estriado	44
3.11.1	<i>Remoção das glândulas adrenais</i>	44
3.11.2	<i>Preparação de lâminas histológicas</i>	45
3.12	Imunofluorescência para c-Fos e receptor D2 da dopamina	45
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	48

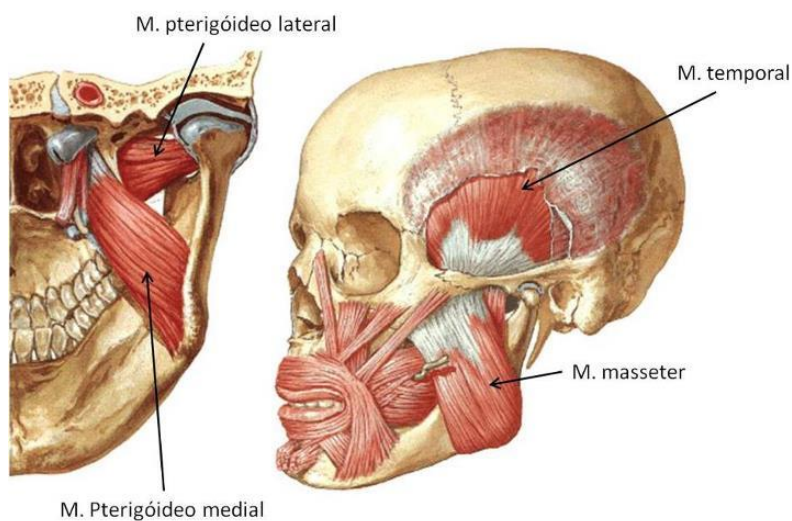
5.1	Análise eletromiográfica comparativa entre o método de dispositivo móvel e a implantação de eletrodos.	48
5.2	Análise da atividade muscular mastigatória dos ratos e ratas submetidos a estresse emocional	49
5.3	Análise do limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal em ratos submetidos ao modelo de estresse emocional	51
5.4	Análise do comportamento de ansiedade em ratos e ratas submetidas ao modelo de estresse emocional.....	54
5.5	Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e limiar nociceptivo de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional....	57
5.6	Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estral em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional.....	58
5.7	Análise do ganho de peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional	59
5.8	Análise do peso bruto das glândulas adrenais de ratos e ratas submetidos emocional	60
5.9	Análise histológica das glândulas adrenais de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional.....	61
5.10	Análise da expressão de c-Fos em gânglio trigeminal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional	62
5.11	Análise da expressão dos receptores D2 da dopamina em corpo estriado em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional	64
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bruxismo

O sistema estomatognático é constituído pela coluna cervical, mandíbula, o osso hióide, as articulações temporomandibulares (ATMs), os dentes, a mucosa oral, os ligamentos, tendões, aponeuroses, representando as estruturas estáticas. Tendo os músculos como um componente ativo (DOUGLAS, 2002). Integra uma das mais complexas unidades anatômicas e funcionais do corpo humano, sendo responsável por executar várias funções como: fonação, deglutição, respiração, expressão das emoções e mastigação (DOUGLAS, 2002; PASTANA; COSTA; CHIAPPETTA, 2007).

Figura 1 – Músculos responsáveis pela mastigação



Fonte: Netter (2000).

Os movimentos mandibulares rítmicos existentes durante a mastigação é ocasionado por uma rede de neurônios, principalmente os neurônios do sistema trigeminal, localizados no tronco cerebral. As entradas sensoriais vêm a partir dos proprioceptores periodontais, fusos musculares dos músculos da mastigação, da mucosa e da pele. Outras áreas sub-corticais também influenciam a mastigação e/ou o complexo trigeminal como: hipotálamo, amígdala, núcleo da rafe, o cerebelo, corpo estriado, entre outros (AIRES, 2012). A condição ideal para a harmonia e integração funcional dos componentes do sistema estomatognático é o padrão bilateral da mastigação, realizado pelos músculos da mastigação e as ATMs.

Desequilíbrios neuromusculares podem acarretar várias desordens motoras orofaciais (CARVALHO *et al.*, 2008). Essas desordens podem levar a alterações na atividade dos músculos da mastigação, podendo gerar discenesias e/ou distonias, que ocorrem com maior prevalência durante o sono, podendo gerar o bruxismo (CLARK; RAM, 2007; MASCARO *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2007).

O bruxismo é o hábito de apertar e ranger os dentes. Essa denominação é derivada do termo grego “brychein”, também descrito como bruxomania, briquismo, neuralgia traumática e parafunção oral (PIZZOL *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007). É definida pela Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP) como uma atividade parafuncional noturna ou diurna, incluindo fricção, deslizamento ou ranger dos dentes e/ou por órtese ou tração da mandíbula, de forma consciente, subconsciente ou involuntária, que ocorre com maior frequência durante o sono, tanto em crianças quanto em adultos, podendo ocasionar ruptura no sistema estomatognático, como o resultado da persistência, intensidade e duração dos períodos de apertamento ou deslizamento (AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, 2005; ALVES-REZENDE *et al.*, 2009).

Para Rodrigues *et al.* (2006), o bruxismo pode ser classificado como agudo, onde há um processo agressivo e vai além da capacidade biológica de adaptação e defesa do organismo, gerando os sinais clínicos, ou crônico, onde há uma adequação funcional e biológica do organismo. Além da relação à contração muscular: concêntrica ou excêntrica. A forma cêntrica ocorre quando há movimentos isométricos maxilo-mandibular e sem movimentos de deslizamento dentário, ocorrendo principalmente na posição de máxima intercuspidação habitual ou cêntrica, caracterizados por uma maior contração muscular, acumulando maior quantidade de ácido láctico e acético. Já na forma excêntrica, apresenta uma contração isotônica, onde há deslizamento, que ocorre nas posições excêntricas e apertamento dos dentes, levando ao desgaste dos dentes posteriores e anteriores (RAMFJORD, 1961).

O bruxismo pode ser classificado também como: primário, sem causa sistêmica ou psiquiátrica evidente, e secundário, relacionado a fatores iatrogênicos ou a transtornos do sono, associado a um transtorno clínico, neurológico ou psíquico (ALÓE *et al.*, 2003). O indivíduo pode ranger apertar ou deslizar os dentes ou podendo ser associado com micro despertares, parafunção orofacial, tique ou

automatismo sem objetivo aparente (GONÇALVES; TOLEDO; OTERO, 2010; MOLINA *et al.*, 2002; MOLINA *et al.*, 2008). Para Insana *et al.* (2013), Serra-Negra *et al.* (2010) e Coelho *et al.* (2009), tanto pode ocorrer durante o sono, na fase REM (Movimento rápido dos olhos) e não REM (durante o sono leve e profundo).

Quanto ao período do dia que ocorre o apertamento dentário, o bruxismo pode ser classificado em diurno ou noturno. O bruxismo diurno, associados com influências fisiológicas excitatórias orais motoras, caracterizando-se por um hábito ou tiques e pela atividade semi-voluntária da mandíbula, entretanto, o bruxismo do sono emite sons durante o estado de sonolência (HERRERA *et al.*, 2006).

Quadro 1 – Classificação do bruxismo

Duração	Aguda: processo agressivo, ocasionando os sinais clínicos. Crônica: adequação funcional e biológica do organismo.
Contração Muscular	Cêntrica: movimentos isométricos maxilo-mandibular e sem deslizamento. Excêntrica: contração isotônica, onde há deslizamento.
Causas	Primária: sem causa sistêmica ou psiquiátrica evidente. Secundária: relacionados a outros fatores (estresse, fatores iatrogênicos, transtornos do sono, transtorno clínico, neurológico ou psíquico).
Período de acometimento	Diurno: hábito ou tiques e pela atividade semi-voluntária da mandíbula. Noturno: está associados a emissão de sons durante o estado de sonolência, tanto na fase REM como na não-REM.

Fonte: Herrera *et al.* (2006), Rodrigues *et al.* (2006), Coelho *et al.* (2009), Serra-Negra *et al.* (2010) e Insana *et al.* (2013).

A incidência dessa patologia vem aumentando progressivamente na população, prevalecendo no sexo feminino na proporção de 5:1 provavelmente à suscetibilidade a fatores emocionais ou anatômicos, mas não deixando de afetar o sexo masculino (PARK *et al.*, 2012; PIERSON, 2011; YADAV, 2011).

Segundo Okeson (2013), 85% a 90% da população rangem os dentes, mas apenas 5% apresentam o bruxismo em condições clínicas. Em crianças, essa porcentagem varia de 7 a 20%. Alguns autores relatam que essa patologia apresenta relação inversa com a idade, mostrando diminuição significativa na adolescência e na velhice (LOBBEZOO *et al.*, 2014; GOMES; BIANCHINI, 2009; SERRA-NEGRA *et al.*, 2013; THOMAZ; CANGUSSU; ASSIS, 2013). Em contrapartida com Piquero e Sakurai (2000), Petit *et al.* (2007) e Manfredini *et al.* (2013) afirmam que podem acontecer durante toda uma vida, em qualquer faixa

etária, mostrando a sua prevalência relacionada significativamente com o aumento da idade.

Os fatores psicológicos como, estresse, ansiedade, dor e medo, podem provocar um aumento da tensão muscular no sistema estomatognático (CARVALHO *et al.*, 2008; FISMER *et al.*, 2008; MAYER; HEINZER; LAVIGNE, 2015). Além desses, distúrbios neuronais, patofisiológicos (causados pelo uso de medicamentos, drogas, fumo, álcool e, também, fatores genéticos) e causas centrais (distúrbios SNC), demonstram que essa patologia é uma disfunção multifatorial, sem uma etiologia definida (ALAJBEG; ZUVELA; TARLE, 2012; PAESANI, 2010; CARVALHO *et al.*, 2008; MAYER; HEINZER; LAVIGNE, 2015; ALVES-REZENDE *et al.*, 2009).

1.2 Fisiopatologia do bruxismo

1.2.1 Ansiedade e estresse como fatores desencadeantes de bruxismo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 90% da população sofre de estresse, muitas vezes sendo relacionado ao ritmo acelerado do nosso dia a dia (MENZANI; BIANCHI, 2009). As mudanças ambientais e adaptativas que ocorrem no nosso organismo desencadeiam emoções com sinais e sintomas característicos de ansiedade, afetando de forma negativa a saúde física e psicológica (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014; KUBO; IINUMA; CHEN, 2015).

Segundo Hook e Valentiner (2002), a ansiedade pode ser útil quando relacionada a um recurso adaptativo que incentiva a busca pelas soluções positivas. Quando ela é muito intensa, e apresenta um caráter sistêmico, classifica-se como patológica.

Reações adaptativas no indivíduo podem ser estimuladas por fatores estressantes. O sistema neuroendócrino via sistema nervoso autônomo (SNA) libera as catecolaminas, responsáveis pelo aumento da frequência cardíaca e pressão arterial. Essas alterações ocorrem através ativação do braço simpático adrenomedular, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o hipotálamo, responsável pelo controle da homeostasia (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) produzido pelas corticotrofinas (CRF), que é secretado pelo neurônio da região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo, é responsável pela síntese e secreção dos glicocorticoides no córtex das glândulas adrenais. Durante o estresse, há o aumento da excitabilidade do eixo HHA, levando a uma maior liberação de ACTH e conseqüentemente, de cortisol, que frequentemente se eleva 20 vezes, além da noradrenalina (NA), pela ativação do sistema adrenomedular (WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014).

Segundo Guyton e Hall (2002), o cortisol apresenta dois mecanismos de feedback negativo: no hipotálamo, levando a diminuição do CRF e na hipófise, reduzindo o ACTH. Através desses mecanismos, há a regulação da concentração sérica de cortisol. Entretanto, os estímulos de estresse são mais importantes, podendo inibir o feedback do cortisol, causando aumento esporádico de secreção durante o dia ou sua liberação persistente durante o estresse crônico.

O estresse crônico provoca um aumento da estabilidade do sistema adrenomedular e do eixo HHA, levando a uma maior liberação de noradrenalina, ACTH e cortisol. Existem também modificações na função e na estrutura das regiões cerebrais que participam do controle neuroendócrino, como, por exemplo, diminuição da expressão de receptores de glicocorticoides no hipotálamo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O estresse físico causado por estímulos dolorosos tem início através de transmissão central para o tronco cerebral e depois para o hipotálamo, onde o CRF é secretado para o sistema porta hipofisário. Entretanto, o estresse mental causa um aumento igualmente rápido do ACTH, devido uma maior ativação do sistema límbico, principalmente da amígdala e do hipocampo, transmitindo sinais para o hipotálamo póstero-medial, influenciando a ativação do eixo HHA (GUYTON; HALL, 2002; WIECKIEWICZ; PARADOWSKA-STOLARZ; WIECKIEWICZ, 2014).

Vanderas *et al.* (1999) também relacionaram o bruxismo com a tensão emocional através de análises de 314 exames de urina em crianças de 6 a 8 anos, em que foi confirmado a presença e o envolvimento de catecolaminas, além do nível elevado de dopamina e epinefrina nessas amostras.

Julgamos ser interessante ressaltar os estudos como os de Mikami (1977), Pohto (1978), Kampe *et al.* (1997) e Attanasio (1997), quando estabeleceram uma relação entre bruxismo, alterações emocionais e a dopamina. Assim, essas

poderiam estar relacionadas ao fato de que as projeções dopaminérgicas fazem sinapse no córtex associativo límbico no lobo frontal medial, na amígdala e formação hipocampal. Desta maneira, uma vez que os neurônios dopaminérgicos teriam como alvos o estriado e as zonas límbicas, assim como as projeções serotoninérgicas fariam sinapse nos neurônios da amígdala, formação hipocampal, estriatum e córtex cerebral (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 1995).

O bruxismo pode se manifestar em duas situações: um estado hipodopaminérgico do sistema extrapiramidal, modulado pela serotonina no trato mesocortical; ou em outra situação, decorrente de um estado hiperdopaminérgico, induzido por substâncias tais como anfetamina e L-dopa, ou hipofunção colinérgica e exposição crônica a neurolépticos, que promoveriam altos níveis de dopamina no estriado, acarretando movimentos não funcionais dos músculos tais como o ranger dos dentes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 1995).

Nesse contexto a dopamina central tem sido tradicionalmente associada a comportamentos estereotipados e bruxismo (LAVIGNE *et al.*, 2008). Estudos neurofarmacológicos em roedores tem mostrado que o corpo estriado é a área dopaminérgica cerebral mais envolvida no aparecimento do comportamento de morder/ranger, particularmente na região ventrolateral (KELLEY; LANG; GAUTHIER, 1988). Gómez *et al.* (2010), utilizando um modelo de bruxismo em ratos por estresse, também mostraram um aumento dos níveis de dopamina no corpo estriado e córtex pré-frontal.

As projeções dopaminérgicas, localizadas no mesencéfalo, originam-se da área tegmental ventral e da parte compacta da substância negra do sistema nervoso, como núcleos intrínsecos nos núcleos da base, responsáveis por conexões aferentes e eferentes, contendo neurônios dopaminérgicos que se projetam ao estriatum, sendo classificado como um núcleo da base aferente e constitui-se em uma região de subdivisão do corpo estriado. O corpo estriado é um importante centro do sistema extrapiramidal que, por sua vez, tem por função básica a realização de movimentos automáticos, a regulação do tônus e da postura e ainda a coordenação de movimentos. Assim sendo, o corpo estriado relaciona-se com a motricidade somática, especialmente no controle dos movimentos involuntários e automáticos. (SERAIDARIAN; JACOB; SERAIDAIRAN, 2002, p. 242)

De uma maneira geral, o bruxismo é associado às influências psicossociais como estresse e ansiedade, e a interferências oclusais relacionadas aos fatores periféricos e relacionados a fatores centrais relacionado a

neurotransmissão central. Não está explícita a ligação dos mecanismos neurológicos ao bruxismo, devendo haver mais estudos que abordam esses temas para gerar uma base mais fidedigna (LAVIGNE; MANZINI, 2000).

1.3 Dor orofacial relacionada ao bruxismo

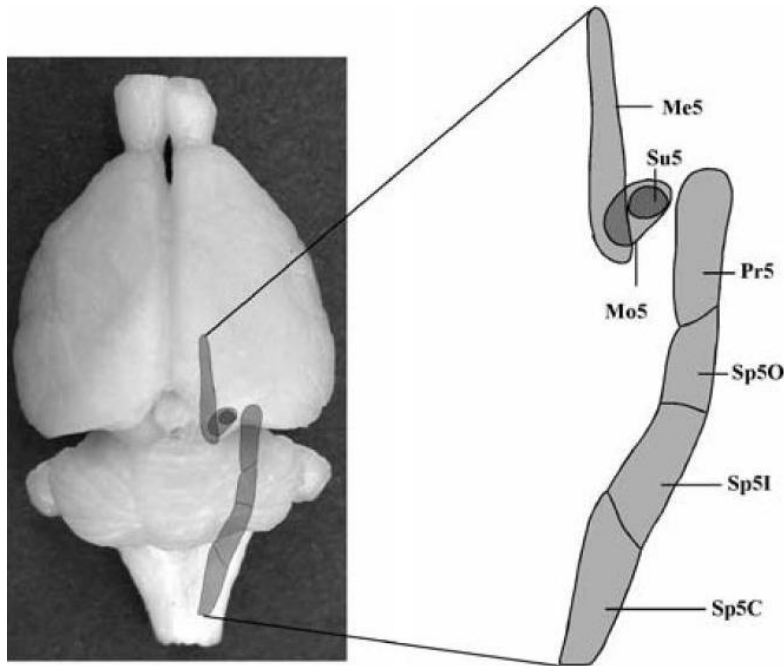
A dor orofacial apresenta uma classificação ampla, incluindo muitas condições prevalentes na população em geral, tais como processos periodontais, neuralgia trigeminal, dor nos músculos da mastigação e na ATM (CONTI *et al.*, 2012).

É uma dor altamente complexa e gerada a partir da ativação do complexo trigeminal. Os tecidos orofaciais são inervados principalmente pelo nervo trigêmeo (V par craniano), que é um nervo misto, responsável pelas sensações da face e também por funções motoras mandibulares. Este nervo emite três ramos principais que irão formar os nervos oftálmicos (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3). Todos estes ramos possuem funções sensoriais, sendo que o nervo mandibular possui também funções motoras (DANTAS, 2005).

Na via trigeminal, os aferentes primários trigeminais emitem projeções através do gânglio trigeminal para os neurônios de segunda ordem que se encontram no complexo trigeminal (no tronco encefálico) e em seguida ativam os núcleos trigeminais talâmicos e as regiões do tronco como formação reticular e núcleo motores dos nervos cranianos (TEIXEIRA, 2001; MASCARO *et al.*, 2008).

O complexo trigeminal é formado pelo núcleo mesencefálico (Me5), núcleo principal (Pr5), núcleo supratrigeminal (Su5), núcleo espinal (Sp5), o qual é dividido em três subnúcleos: oral (Sp5O), interpolar (Sp5I) e caudal (Sp5C); e, finalmente, pelo núcleo motor (Mo5) (Figura 3). Dessa forma, dores faciais e intra-articulares da ATM e músculos mastigatórios como temporal e masseter são transmitidas ao Sp5I e, principalmente, ao Sp5C. Tais sensações são conduzidas até os núcleos ventro-pósteromedial e posterior do tálamo e, em seguida, ao córtex sensitivo (TEIXEIRA, 2001; MASCARO *et al.*, 2008). O Me5 é formado por neurônios em que os receptores estão nos músculos da mastigação e ligamento periodontal. Esse núcleo relaciona-se com o reflexo de abrir a boca quando há algo duro na mastigação que levaria a uma fratura dentária. O Mo5 controla o tônus dos músculos mastigatórios e os movimentos mandibulares (MASCARO *et al.*, 2008).

Figura 2 – Posicionamento dos núcleos do complexo trigeminal



Fonte: Mascaro *et al.* (2008).

A dor orofacial mais comumente associada ao bruxismo é a do tipo miofascial. A dor miofascial mastigatória é uma das dores musculoesqueléticas mais frequentes, caracterizado pela presença de pontos gatilhos (*trigger points*) nos músculos esqueléticos, onde são bastante dolorosos à palpação, e que inclusive pode levar a dor irradiada nos músculos mastigatórios, podendo ser associado com disfunção mandibular (bruxismo), que geralmente apresenta trismo (PANKAJ *et al.*, 2015; ALVAREZ; ROCKWELL, 2002).

A dor miofascial acomete principalmente em adultos, sendo mais prevelente no sexo feminino. A dor é profunda e intensa, associada à fadiga, rigidez, tensão, espasmo e restrição do movimento. Os pacientes geralmente adotam uma posição antálgica, que pode piorar a contração muscular (GAZI *et al.*, 2011). É uma doença de alta prevalência e com repercussões em nível do SE. Nesse contexto, a dor associada ao bruxismo na região orofacial parece ser diferente entre homens e mulheres. Marklund e Wänman (2008) ao analisarem a dor miofascial e hábitos parafuncionais com o gênero feminino observaram que as mulheres são mais propensas a desenvolver dor miofascial frequente e localizá-la do que os homens. Os autores também relataram que o bruxismo mostrou associação com os sinais e sintomas miofasciais.

Em contrapartida, há estudos controversos que relatam que a dor nem sempre está associada à queixa principal no bruxismo. Além da dor que não necessariamente está presente, os principais sinais e sintomas característicos do bruxismo seria o desgaste nas bordas incisais nos dentes anteriores, facetas dentais polidas, dentições na borda lateral da língua, formação de trincas, erosão cervical, fraturas coronárias ou de restaurações associado às queixas familiares devido aos ruídos durante o sono do paciente, decorrente da atrição, que é muitas vezes, despercebido pelo paciente (GIMENES, 2008; DEKON *et al.*, 2003; DINIZ; SILVA; ZUANON, 2009).

1.4 Dor orofacial e gênero

Por ser uma experiência multidimensional, a dor sofre influências de vários tipos de fatores de caráter biológico, tendo relações e diferenças marcantes entre os sexos sobre a resposta dolorosa experimental e clínica. Sugere-se que os hormônios sexuais possam ser considerados como os principais moduladores da dor quando compara-se o sexo masculino e feminino (FILLINGIM; EDWARDS; POWELL, 1999; RILEY; GILBERT, 2001; FROT; FEINE; BUSHNELL, 2004; CAIRNS; SESSLE, 2001; GAUMOND; ARSENAULT; MARCHAND, 2002; CLEMENTE *et al.*, 2004).

Foi evidenciado que as mulheres apresentam maior predisposição à dor quando comparado com o sexo masculino. Esse achado foi baseado na diferenciação do sistema de analgesia endógena dos homens e das mulheres, além do processamento central de estímulos nociceptivos (GONÇALVES; TOLEDO; OTERO, 2010; WIESENFELD-HALLIN, 2005).

Estudos demonstraram que as mulheres apresentaram maior sensibilidade à dor do que os homens, sendo corroborado através de experimentos envolvendo a avaliação da dor induzida por pressão, estímulo elétrico, isquemia e estímulos térmicos (FILLINGIM *et al.*, 2009). Estas diferenças sexuais na inflamação, dor e sensibilidade poderiam ser conduzidas por mecanismos subjacentes comuns, tais como a influência de hormônios sexuais.

Os estudos referentes ao gênero e dor tiveram seu início em 1990 e cresceu significativamente nos últimos 25 a 30 anos (FILLINGIM *et al.*, 2009).

Vários estudos tem-se buscado compreender a sintomatologia complexa envolvida no bruxismo e na DTM, com ênfase na relação entre o gênero e a idade dos pacientes e os sinais e sintomas correlacionados (LERESCHE *et al.*, 2005; WIESENFELD-HALLIN, 2005; GONÇALVES; TOLEDO; OTERO, 2010). As mulheres apresentam maior sensação dolorosa, incluindo bruxismo, DMT e dor orofacial (BENDER, 2014; LUZ; MARAGNO; MARTIN, 1997; ROCHA; NARDELLI; RODRIGUES, 2002; WARREN; FRIED, 2001; SCHMID-SCHWAP *et al.*, 2013).

Um estudo efetuado na Nova Zelândia, com indivíduos na faixa etária entre 45 a 64 anos, que apresentavam dor em quatro ou mais partes do corpo necessitavam de avaliações médicas e uso de medicações, foi observado que em 21,4% dos homens e 33% nas mulheres. Mostrando assim a menor tolerância e a maior percepção de dor nas mulheres (JAMES *et al.*, 1991).

A maior prevalência e severidade no bruxismo e outras condições dolorosas no sexo feminino tem sido classicamente associada a um papel pró-nociceptivo dos hormônios ovarianos (LERESCHE *et al.*, 1997; WARREN; FRIED, 2001; CRAFT; MOGIL; ALOISI, 2004).

Outro tipo de dor como a neuralgia trigeminal, que é uma dor neuropática que afeta a região orofacial, tem uma incidência 3:1, prevalecendo no gênero feminino. Outras neuralgias acometem de formas semelhantes ambos os sexos (PETERSON *et al.*, 2000; QUESADA *et al.*, 2005).

Em relação à dor musculoesquelética e crônica, vários estudos em diversos países investigaram a predominância entre homens e mulheres. Na maioria dos resultados das pesquisas, a prevalência entre as mulheres foi nítida (SENNA *et al.*, 2004).

Um exemplo de dor que acomete mulheres é a síndrome fibromiálgica, segunda doença reumatológica mais frequente, atrás da osteoartrite e apresentando também um componente emocional. É a segunda condição mais comum nos consultórios de reumatologia. Apresenta-se como uma condição dolorosa crônica, difusa, músculo-esquelética, com presença de pontos dolorosos e aumento da sensibilidade geral à dor. Foi realizado um estudo no Brasil, em Montes Claros, onde foi evidenciada a prevalência de 40,8% dos casos no sexo feminino, entre 35 e 44 anos de idade. O número apresentando nos homens foi de baixa relevância (SENNA *et al.*, 2004).

Gui (2011) relata existência de grande comprometimento do sistema estomatognático em mulheres com a síndrome fibromiálgica, principalmente no que se refere à função muscular, onde essa incapacidade está significativamente relacionada à dor facial. Em seu estudo, 87,09% das mulheres com fibromialgia apresentaram também diagnóstico do bruxismo, o que demonstra uma alta associação destas desordens na síndrome fibromiálgica.

A cefaleia também é uma queixa comum em pacientes com bruxismo, podendo estar associada à dor nos músculos mastigatórios e na ATM, sendo mais frequente em mulheres (BENDER, 2014; BERNHARDT *et al.*, 2005). Outro aspecto interessante é que mulheres com enxaqueca têm maior probabilidade de relatar queixas álgicas quando comparadas com mulheres que não sofrem de cefaleia (GONÇALVES, 2013).

De uma forma geral, os hormônios sexuais, principalmente o estrógeno demonstram uma maior resposta nociceptiva, tanto em humanos (FILLINGIM; EDWARDS; POWELL, 1999; RILEY; GILBERT, 2001; CAIRNS *et al.*, 2002; ALOISI, 2003), quanto em animais (CAIRNS; SESSLE; HU, 2001; GAUMOND; ARSENAULT; MARCHAND, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2003; CLEMENTE *et al.*, 2004; FISCHER; CLEMENTE; TAMBELI, 2007). Mas essas afirmações são duvidosas quando relacionadas ao papel dos hormônios ovarianos sobre os mecanismos nociceptivos, devido à escassez de pesquisas que envolvem ratas para demonstrar de forma fidedigna essa comprovação.

O complexo trigeminal, no que diz respeito aos trajetos anatômicos e a forma organizacional, parece ser semelhante entre machos e fêmeas, entretanto estudos envolvendo receptores mostram diferenças populacionais de receptores para esteroides sexuais no sexo feminino, principalmente no gânglio trigeminal e nas porções caudais do complexo espinhal trigeminal (BEREITER; OKAMOTO, 2011).

As ativações das áreas corticais e subcorticais, junto com a ativação de áreas gênero-específicas em resposta cerebral a estímulos dolorosos comumente entre homens e mulheres foram reveladas em estudos que utilizaram a neuroimagem. Geralmente, as mulheres apresentam uma elevada ativação da região afetiva e nas regiões autonômicas, diferente dos homens, que demonstram grande ativação das áreas cognitivas, área simpática central e de inibição da região límbica (FILLINGIM *et al.*, 2009; NALIBOFF *et al.*, 2003).

Na maioria das pesquisas que envolvem estudos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais as fêmeas são excluídas, devido às diversas alterações hormonais que podem alterar os resultados da pesquisa dificultando assim a utilização do protocolo experimental voltado aos estudos em humanos (ADAMS *et al.*, 2008; SIMPSON; KELLY, 2012), mas mesmo assim, nas pesquisas realizadas há uma clara associação entre a percepção de dor orofacial e o bruxismo, principalmente no sexo feminino (AHLBERG *et al.*, 2002), além de associações com fatores tensionais e emocionais.

1.5 Métodos de avaliação do bruxismo e modelos experimentais

Através do exame clínico, podemos observar os desgastes dentários, marcas de dentes na língua e bochecha, assimetria facial com hipertrofia e/ou hipertonia dos músculos mastigatórios e desgastes das estruturas dos componentes ósseos e articulares da ATM são observados nos exames de imagem (KATO *et al.*, 2011).

Para Duncan *et al.* (2005), a análise do raio-x do paciente e a avaliação do desgaste no exame clínico são umas das várias técnicas para diagnosticar o bruxismo em humanos.

Além dos relatos e queixas características das pessoas que sofrem com o bruxismo, a eletromiografia também é um importante recurso que registra de forma quantitativa que auxilia no diagnóstico dessa patologia, já que possibilita a análise da atividade elétrica dos músculos envolvidos (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Neste trabalho, avaliou-se a hiperalgesia mecânica na região dos músculos masseter e temporal do lado esquerdo através da aplicação de uma pressão crescente com o analgesímetro digital (Von Frey eletrônico), e também a hiperatividade muscular mastigatória desses músculos em ratos acordados através da eletromiografia. Esse último é um método padrão ouro para análise da atividade mioelétrica. O método de diagnóstico mais fidedigno dessa patologia é através da averiguação quantitativa, indolor e não invasiva da hiperatividade da musculatura mastigatória pela análise de sinais elétricos através da eletromiografia. Além de determinar qual o músculo envolvido, a intensidade e duração da contração muscular, também oferece informações sobre os índices de estresse muscular, tanto nos humanos como nos animais. Em humanos, é indicado associar a EMG com o

exame de polissonografia para diagnosticar o bruxismo do sono (SANTOS; SILVA, 2016).

O bruxismo experimental em ratos é induzido através de modelos de estresse. O estresse provoca uma série de modificações fisiológicas e comportamentais. A avaliação do estresse é feita através de diversos parâmetros como: análise das glândulas adrenais, análise do ganho ponderal, dosagem de glicocorticoides, dentre outros. O comportamento também é avaliado por modelos como o campo aberto, labirinto em cruz e o teste de interação social, tentando associar as manifestações de estresse o mais próximo dos seres humanos (BALI; JAGGI, 2015). Neste trabalho avaliamos o estresse através do ganho ponderal, mudanças na glândula adrenal e o comportamento ansioso através do teste do campo aberto.

Como indução de estresse psicológico, há os modelos de: caixa de comunicação, de alterações no ritmo circadiano e de isolamento neonatal. Como estresse físico, os principais modelos são o de imobilização, choque elétrico na pata e variação de temperatura. Há também os modelos de alterações comportamentais orais dos ratos, onde mostram atividades musculares mastigatórias não funcionais, como o modelo de contenção e o aperto na cauda. Autores atestam que a caixa de comunicação é o modelo de estresse emocional mais fidedigno comparado à situação de estresse sofrida pelos humanos, além de não ocasionar sequelas físicas nos animais (ROSALES *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2013; BALI; JAGGI, 2015). Sendo por isso, o método escolhido para o nosso projeto.

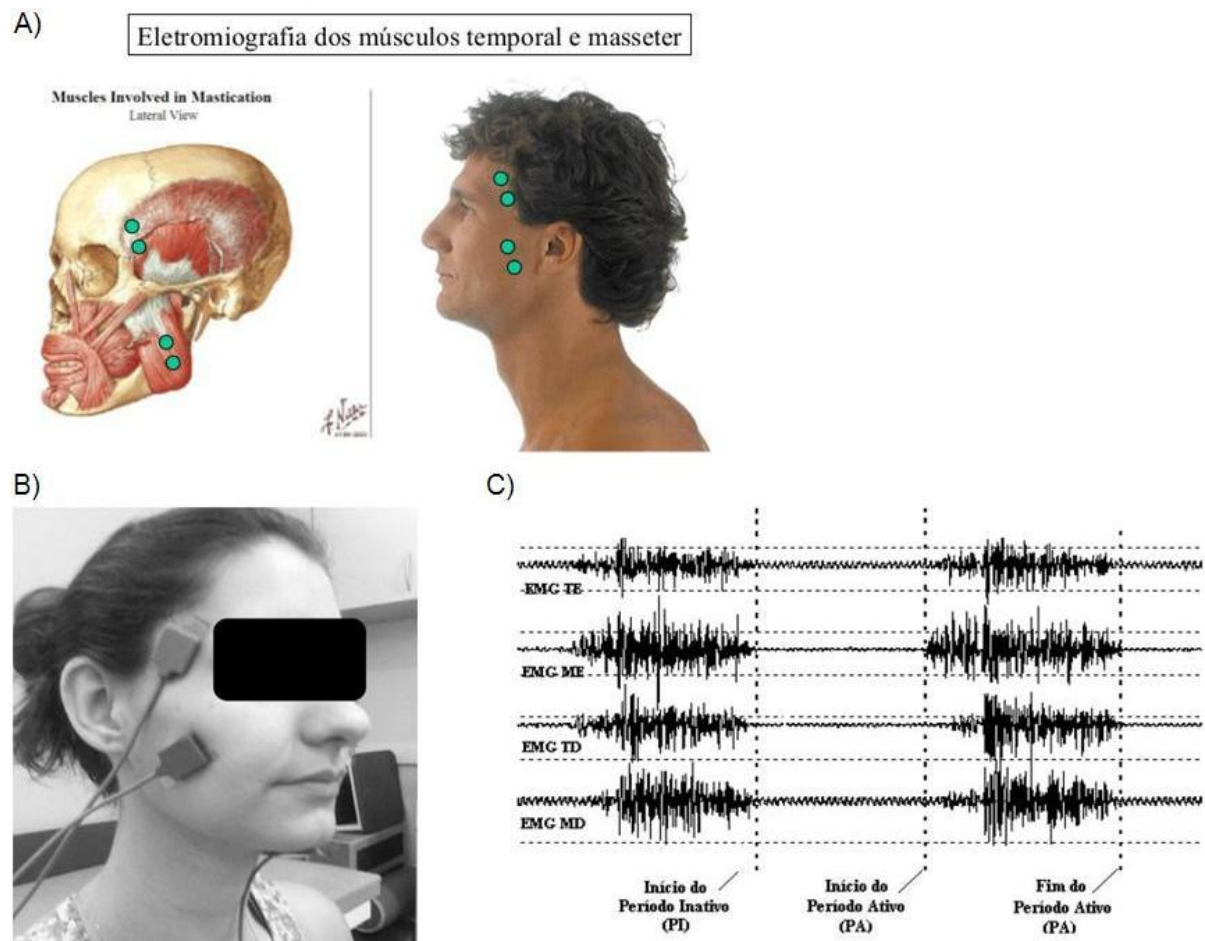
1.6 Eletromiografia

A eletromiografia (EMG) é utilizada como exame diagnóstico ou prognóstico além de avaliar as características fisiológicas de doenças que acometem: nervos periféricos (p. ex. síndrome de Guillan-Barré), doenças do corno anterior da medula (amiotrofia espinhal), doenças da junção neuromuscular (miastenias graves), músculos (bruxismo, miopatias e distrofias musculares) (AMORIM, 2013).

É um exame que avalia os potenciais elétricos do músculo esquelético. Apresenta três principais métodos: o primeiro (invasivo) tem por objetivo a captação de sinais que envolvem grupos restritos de unidades motoras que são mais

profundas, por isso, para a sua obtenção é necessário à inserção de agulhas no ventre muscular. O segundo método (não invasivo) é mais superficial, pois o seu objetivo é reduzir os ruídos de origem do sinal adquirido, sendo assim, utiliza-se um eletrodo sobre a pele na região correspondente ao ventre muscular, de forma superficial podendo avaliar o diagnóstico e funções terapêuticas para distúrbios motores orofaciais (Figura 3). O último método permite a captação de uma maior área do ventre muscular, possibilitando a análise das modificações locais quanto á origem e deslocamento de potencial de ação. Esse método é realizado através da fixação de uma matriz de eletrodos sobre a pele, possibilitando estimar a velocidade de condução dos potenciais de ação (CHAPMAN *et al.*, 2008; MERLETTI *et al.*, 2009; AMORIM, 2013).

Figura 3 – Eletromiografia não invasiva nos músculos masseter e temporal



A) Anatomia e local de posicionamento dos eletrodos para EMG nos músculos masseter e temporal. B) paciente com eletrodos posicionados e C) Sinal EMG dos músculos temporal esquerdo (TE), Masseter Esquerdo (ME), Temporal Direito (TD) e Masseter Direito (MD) durante um ciclo mastigatório (Período Inativo – PI e período Ativo-PA).

Fonte: Netter (2000), Ries *et al.* (2013) e Nitsch *et al.* (2015).

A eletromiografia, através da sua biomecânica, mensura a captação e o registro da atividade muscular através de eletrodos posicionados de forma correta para captar os potenciais elétricos nas fibras musculares. Através desse método, é possível captar e identificar o início da atividade muscular, além de situações de hiperatividade muscular e qual o músculo é ativado durante a contração. É muito utilizado, tanto na clínica quanto em pesquisa para diagnóstico do comportamento neuromuscular e a reabilitação através do biofeedback eletromiográficos, de forma objetiva e precisa, permitindo um diagnóstico mais fidedigno (BOTELHO, 2012).

O seu sinal é medido através da voltagem em relação ao tempo, consequentemente. O seu resultado é a soma algébrica desses sinais elétricos captados. Para esses sinais elétricos serem captados de forma fidedigna, é de extrema importância o uso do eletrodo de superfície posicionado correto no ventre do músculo a ser avaliado e no sentido da fibra muscular (MARCHETTI *et al.*, 2011). Para evitar ruído, utiliza-se o eletrodo de referência, também chamado de fio terra, posicionado sempre em regiões sem sinais elétricos como ossos e tendões (KONRAD *et al.*, 2005).

Após a captação, o sinal analógico captado deve ser convertido para o modo digital para que possamos defini-lo apenas em intervalos determinados de tempo. Faz-se necessário também o ajuste de alguns parâmetros como: filtros, frequência, amplitude, conversores analógicos/ digital, de acordo com o objetivo estudado, para evitar ruídos oriundos das musculaturas vizinhas (*crosstalk*) ou ruídos do ambiente (ENOKA *et al.*, 2011).

Nesse sentido, no nosso trabalho, foi utilizado como método de avaliação da atividade muscular mastigatória a eletromiografia em ratos acordados que foi realizada por um método não invasivo, através de um dispositivo de superfície.

1.7 Justificativa

O bruxismo é uma desordem motora orofacial prevalente e tem uma associação positiva com a dor orofacial. Tem uma incidência 5:1, prevalecendo no gênero feminino. Possui etiologia multifatorial e traz sofrimento, prejuízos funcionais e estéticos, influenciando de forma negativa na qualidade de vida dos pacientes. Essa desordem motora pode ser avaliada através da eletromiografia dos músculos

mastigatórios, que permitirá, dentre outros, a observação de hiperatividade desses músculos.

O estudo da atividade muscular mastigatória em ratos é dificultado pela complexidade dos registros eletromiográficos nesses animais. Os métodos comumente utilizados para a realização de EMG em animais experimentais são do tipo invasivo com os animais anestesiados ou então em animais acordados com a implantação de eletrodos. A experiência com a implantação de eletrodos mostra uma perda significativa das medidas de EMG durante períodos de avaliação prolongados, devido à remoção acidental do eletrodo pelo próprio animal, tornando o método não adequado para a avaliação em modelos crônicos. Assim, nosso estudo propõe uma nova metodologia de avaliação da atividade muscular mastigatória através de um dispositivo removível e de fácil aplicação para a realização de eletromiografia em ratos acordados.

As evidências clínicas e experimentais apontam para a associação entre o bruxismo e a dor na região dos músculos, apesar de descrito na literatura, os relatos são escassos e pouco significativos. Há também muitas controvérsias sobre o verdadeiro papel dos hormônios gonadais nas diferenças de limiar nociceptivo entre machos e fêmeas na dor orofacial.

Ademais, até onde nós sabemos, não há trabalhos relacionando a diferença entre sexo, a nocicepção e a atividade muscular mastigatória associada ao bruxismo. Dessa forma, esse seria o primeiro estudo a integrar essas variáveis.

O desenvolvimento de trabalhos experimentais, nessa área, abre caminho para a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos e dá subsídios para propostas de tratamento diferenciado entre homens e mulheres.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar em ratos submetidos a um modelo de bruxismo um novo método de registro eletromiográfico da atividade mastigatória, bem como a nocicepção associada a este modelo e a influência do gênero.

2.2 Específicos

- Desenvolver e aplicar o uso de um dispositivo removível para eletromiografia de músculos da mastigação em ratos;
- Comparar o registro eletromiográfico feito com o dispositivo removível como o de implantação de eletrodos em ratos;
- Avaliar a diferença da atividade muscular mastigatória entre ratos e ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas;
- Avaliar a diferença de limiar nociceptivo associado ao bruxismo entre ratos e ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas;
- Avaliar as diferenças de comportamento de ansiedade entre ratos e ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas;
- Avaliar as alterações da glândula adrenal, o seu peso bruto e aspectos histomorfológicos, entre ratos e ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas;
- Identificar a influência do ciclo estral na atividade muscular mastigatória e nocicepção de ratas;
- Avaliar a expressão de c-Fos em gânglio trigeminal e dos receptores D2 no corpo estriado de ratas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram utilizados 56 ratos Wistar machos e fêmeas, pesando em média de 180 a 250 g. Os machos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis a nove animais, já as fêmeas foram divididas em quatro grupos distintos, com seis a nove animais cada.

Desses seis animais foram utilizados apenas como emissores de estresse, não sendo utilizado nas análises dos resultados. Os animais foram acondicionados em gaiolas confeccionadas em polisulfona medindo 44x31x21 cm, com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para bebedouro. As tampas continham filtros microisoladores e a sala de experimentação possuía sistema de exaustão individualizado. Os animais foram mantidos em cama com maravalha irradiada.

A higienização e desinfecção das gaiolas foram realizadas uma vez por semana em estação de troca/cabine de biossegurança. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e umidade relativa de 60%. Os mesmos tiveram acesso à água potável da rede pública e alimentação com ração comercial (Nuvilab®) *ad libitum*. Todos os critérios de alimentação e ambiência atenderam às recomendações do *National Research Council* e do *National Institute of Health*.

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos de uso de animais experimentais, obtidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), da UFC, sob protocolo de número 48/2014 (ANEXO A).

3.2 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em três grupos experimentais:

- Estressados emocionalmente (Estressado; E);
- Não estressados emocionalmente (Controle; C);

- Emissores de estresse através do choque elétrico da pata (CP).
- As ratas foram divididas em quatro grupos experimentais:
- Estressadas emocionalmente (Estressada; E);
 - Estressadas ovariectomizadas (EO);
 - Não estressadas emocionalmente (Controle; C);
 - Não estressadas ovariectomizadas (O);
 - Emissores de estresse através do choque elétrico da pata (CP).

3.3 Protocolo experimental

Inicialmente, durante cinco dias, os animais foram adaptados na caixa de comunicação, no teste nociceptivo e com o dispositivo removível para eletromiografia de músculos da mastigação.

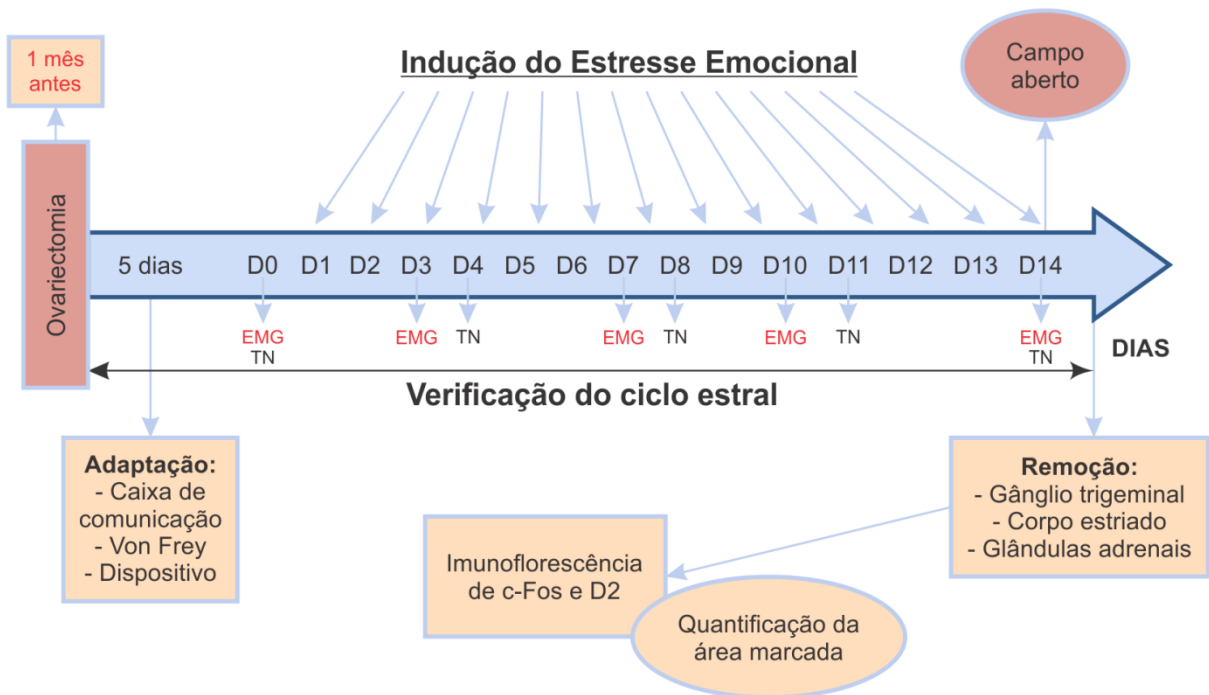
O registro da EMG basal e o registro basal do teste nociceptivo foram realizados antes do estímulo, no primeiro dia do estresse emocional (D0).

No caso dos grupos das fêmeas ovariectomizadas, a cirurgia foi realizada em ratas de três semanas de idade, um mês antes de começar a indução do estresse, além de todo dia pela manhã e tarde tenha sido realizado o esfregaço vaginal para identificar qual a fase do ciclo.

Durante quatorze dias consecutivos foi induzido o estresse emocional, com coletas periódicas dos registros eletromiográficos e do teste nociceptivo. Em seguida, os animais foram sacrificados e os determinados tecidos, descritos anteriormente, foram coletados para análise para ambos os grupos, exceto os CP (Figura 4).

Durante o período de indução de estresse emocional, entre o dia primeiro dia (D1), no sétimo dia (D7) e no décimo quarto dia (D14) foi observado o ganho de peso corporal dos animais através de uma balança semianalítica (Marte BL3200H).

Figura 4 – Esquema ilustrativo do protocolo experimental



Nota: EMG: Eletromiografia; TN: Teste nociceptivo.
 Fonte: Elaboração da autora.

3.4 Modelo de indução de bruxismo através do estresse emocional

Foi utilizado como instrumento de estresse emocional para induzir o bruxismo à caixa de comunicação (ROSALES *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2011). Consiste de 16 compartimentos (16x16 cm), separados por placas de plástico transparente com vários orifícios pequenos que impedem o contato físico entre os animais, mas permite o contato visual, auditivo e sensações olfativas dos animais vizinhos. Cada compartimento foi equipado com piso de aço inoxidável vazado (1,3 cm e 5 mm de diâmetro).

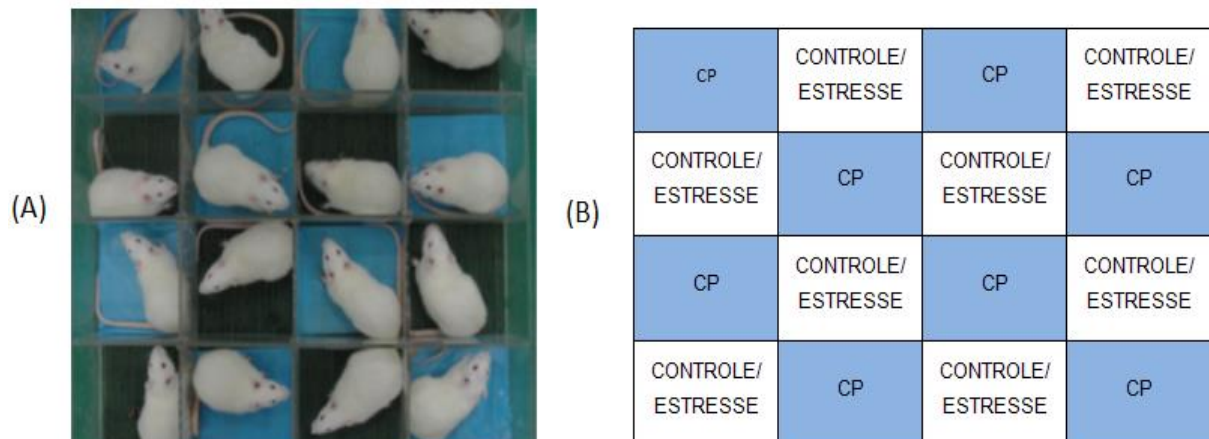
Um eletroestimulador (LE 12406, Panlab Harvard Apparatus) de corrente contínua (1 Hz), foi ligado aos pavimentos das hastas de aço para produzir um pulso quadrado de 40 V, gerando um choque elétrico na pata do animal, com trem de 10 segundos com um intervalo de 60 segundos, onde tomamos bastante cautela para não gerar nenhum dano ao animal. Os pisos de oito compartimentos foram cobertos por placas de plástico para evitar choque elétrico na pata dos ratos e ratas E, EO, C e O (Figura 5).

Antes do dia da estimulação do estresse (Dia 0), os ratos foram confinados nos compartimentos da caixa durante uma hora, sem qualquer choque

elétrico, durante cinco dias, a fim de adapta-los ao ambiente. Durante 14 dias, período do estresse emocional, os ratos emissores de estresse receberam choque elétrico na pata no período de 1 hora por dia no período da manhã, com trem de 10 segundos com intervalo de 60 segundos (de acordo com a sequência descrita acima). Os ratos estressados emocionalmente foram confinados nos compartimentos isolados do choque elétrico e foram expostos a estímulos emocionais dos ratos vizinhos, sendo considerados em um estado de medo e/ou de ansiedade, tendo como prova maior quantidade de defecção e urina, além de roerem os plásticos de proteção onde estavam em cima.

Os ratos controle foram colocados nos compartimentos isolados do choque, sem qualquer presença de ratos emissores de estresse, antes da realização do estresse dos grupos estressados emocionalmente, para ter a garantia de não ocorrer viés. Os ratos emissores de estresse através do choque elétrico da pata só foram utilizados para a emissão do estresse, não sendo avaliados em nenhum parâmetro.

Figura 5 – Caixa de comunicação. (a) Foto da caixa de comunicação utilizada por Huang *et al.* (2011). (b) Diagrama esquemático da caixa de comunicação (ESTRESSE: grupos estressados e estressadas emocionalmente, além das estressadas ovariectomizadas, CONTROLE: grupos não estressados emocionalmente CP: grupo choque elétrico na pata).



Fonte: Elaboração da autora.

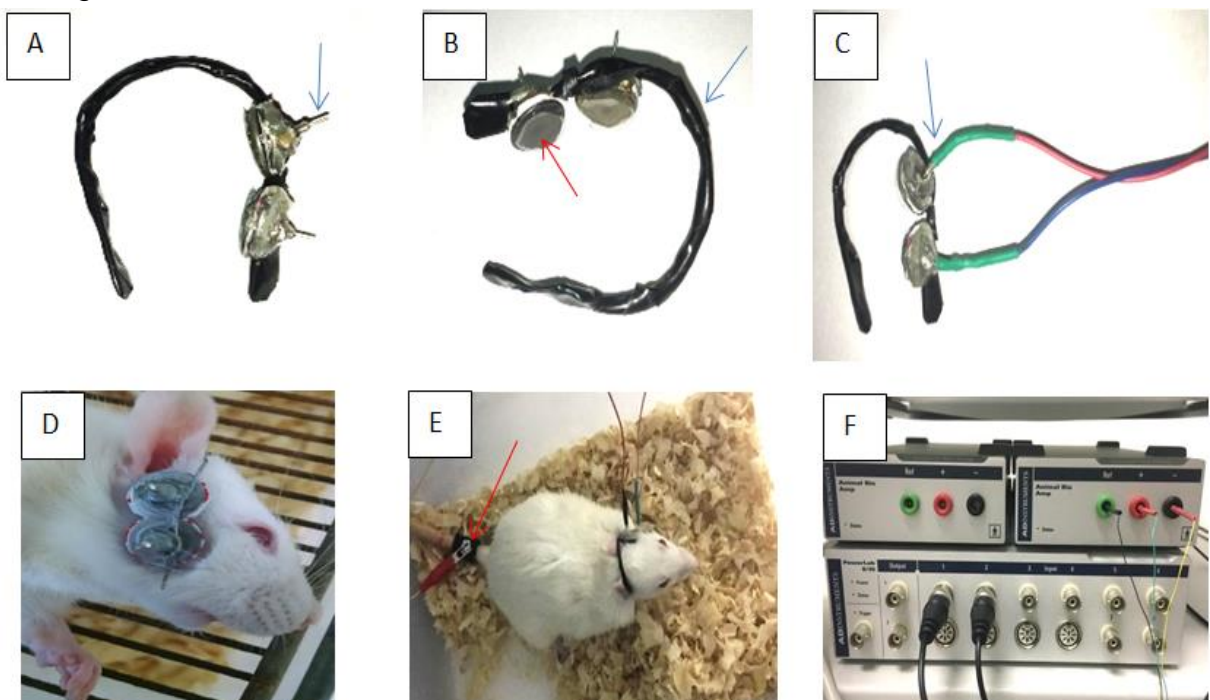
3.5 Dispositivo móvel para a realização da EMG

Foi desenvolvido um dispositivo extrabucal, portátil, móvel, de baixo custo para ser utilizado na EMG. O dispositivo foi feito através de um fio ortodôntico de

aço inoxidável 0.08 mm de espessura, cola quente, fita isolante, solda metálica (liga de estanho e chumbo) e associado com dois eletrodos para monitorização cardíaca (ECG) da marca 3M, de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl); dorso transparente, recoberto por adesivo condutivo reposicionável, dispensando o uso de gel. O fio ortodôntico foi modelado utilizando alicate ortodôntico e os eletrodos foram encaixados ao fio utilizado cola quente, que serviu como material isolante entre os eletrodos e o fio de aço.

Foi soldado aos eletrodos de ECG, eletrodos “de encaixe macho” de 1mm de diâmetro, os quais se encaixam em eletrodos “de encaixe fêmea” soldados a fios de cobre revestidos por polietileno, de confecção própria, medindo 30 cm de comprimento, com a outra extremidade composta de conector de encaixe no aparelho de EMG. O fio terra foi feito pelo mesmo eletrodo, sendo posicionado no rabo do animal e isolado com fita isolante.

Figura 6 – Dispositivo móvel para aquisição de dados eletromiográfico de músculos mastigatórios



As fotos mostram detalhes do dispositivo. A: visão frontal mostrando o eletrodo de “encaixe macho” (seta azul); B: visão dorsal mostrando os eletrodos de ECG cortados e adaptados (seta vermelha) e o arco feito de fio ortodôntico coberto com fita isolante (seta azul); C: visão frontal do dispositivo acoplado aos fios de cobre com “encaixes do tipo fêmea” (seta azul); D: rato com o dispositivo posicionado no lado esquerdo; E: rato com dispositivo em posição de registro com o fio terra posicionado na cauda (seta vermelha); aparelho de registro de EMG (PowerLab).

Fonte: Elaboração da autora.

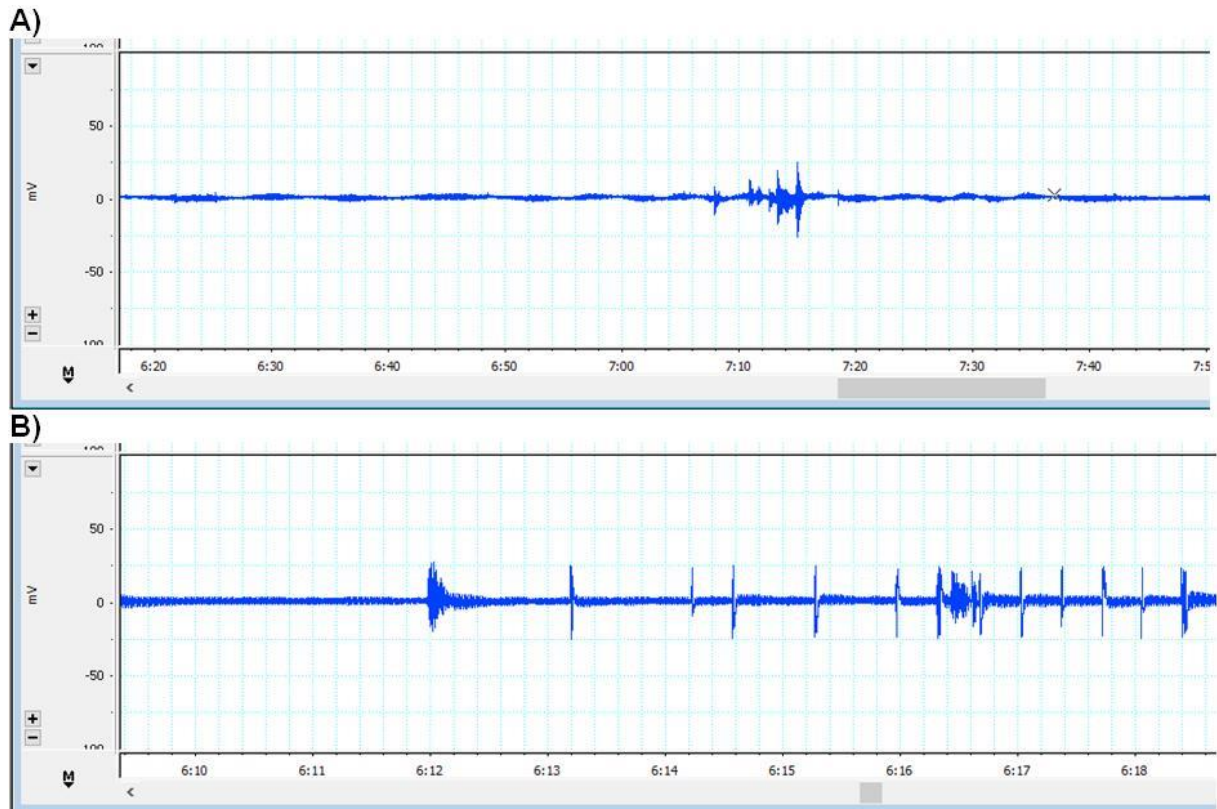
3.6 Eletromiografia

3.6.1 Registro

A eletromiografia (EMG) foi utilizada para avaliação da atividade mioelétrica dos músculos masseter e temporal dos ratos estressados e dos controles. A captação dos sinais mioelétricos foi feita pelo aparelho PowerLab 8/35 (ADInstruments), com o ranger de 100 mV, Low pass 100Hz, High pass 0,3 Hz, com duração no mínimo de 5 minutos. Tais sinais captados através de eletrodos passaram por um amplificador e filtro, possibilitando a apresentação na tela de um computador às imagens do registro (Figura 4). Os três eletrodos foram ligados ao amplificador por um fio de cobre. O eletrodo ativo (negativo) foi posicionado no músculo temporal e o outro no masseter (positivos), e um eletrodo terra no rabo do rato (Figura 6).

O método utilizado foi baseado no trabalho de Rosales *et al.* (2002) e Silveira (2015) e modificado para o uso do dispositivo móvel como condutor do sinal mioelétrico. 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 a indução do estresse de acordo com o protocolo experimental. Os animais permaneceram nas suas gaiolas individuais, onde se movimentavam livremente durante a eletromiografia.

Figura 7 – Registro eletromiográfico



Imagens de registros eletromiográfico em ratos (A) e ratas (B) estressados, realizados com o dispositivo móvel evidenciando picos de hiperatividade muscular.

Fonte: Elaboração da autora.

3.6.2 Análise

A análise da atividade eletromiográfica foi através do software pCLAMP 10, quantificando o número de picos no registros, correspondente ao número de disparos da musculatura, onde a relação de sinal e ruído era adequada para a análise. 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 pelo primeiro registro (frequência basal), realizado antes da indução do estresse emocional, correspondendo à frequência relativa ao basal.

Os valores basais que deram 0 foram substituídos por 0,1, pois não existe resultado real para a divisão de qualquer número por 0, o que inviabilizaria os resultados da frequência relativa ao basal, assim padronizando um valor de correção para essas EMGs.

3.7 Teste Nociceptivo – Hiperalgisia mecânica dos músculos masseter e temporal

O limiar nociceptivo do animal foi obtido através do registro da intensidade de força aplicada na região do músculo temporal e do músculo masseter (lado esquerdo), necessária para obtenção de uma resposta reflexa (movimento de retirada da cabeça). Para isso foi utilizado o aparelho Von Frey eletrônico (Analgésímetro Digital, Insight, São Paulo, Brasil), que é um transdutor de força, que registra, em gramas, a pressão aplicada perpendicularmente na região dos músculos masseter e temporal suficiente para promover o comportamento de retirada da cabeça, sendo considerado limiar de retirada da cabeça em gramas (g) (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009; SILVEIRA, 2015).

Os animais do grupo controle e estressado foram submetidos a sessões de condicionamento ao teste de hiperalgisia mecânica antes da indução do estresse emocional (durante cinco dias). Os animais foram mantidos durante 10 min em caixas plásticas e submetidos à aplicação do aparelho Von Frey na região dos músculos temporal e masseter esquerdo. O limiar foi registrado no primeiro dia do protocolo experimental, antes de iniciar o período de estresse (limiar basal, D0) e depois sucessivamente, a cada dois dias, meia hora depois da indução de estresse na caixa de comunicação (D4, D8, D11, D14; Figura 4). Foi calculada a variação do limiar nociceptivo, delta (Δ) do limiar de retirada da cabeça em gramas (g), para cada animal, o que equivale à intensidade de hiperalgisia. Quanto maior a variação (delta), maior é a intensidade de hiperalgisia.

3.8 Teste do campo aberto

O teste de caracterização de apatia e ansiedade “Novel Open Field” (CATHOMAS *et al.*, 2015; KAZLAUCKAS *et al.*, 2005; THIEL *et al.*, 1999), foi feito após a indução do estresse (D14). Foi realizado em sala ambientalmente isolada de odores, livre de ruídos e com temperatura de 22°C. Durante 15 minutos, os animais ficaram em ambientação no espaço de realização do experimento. Em seguida, foram submetidos a 5 minutos de análise comportamental computadorizada (Smart®) individual em cubos de acrílico dimensionados em 50x50x50cm.

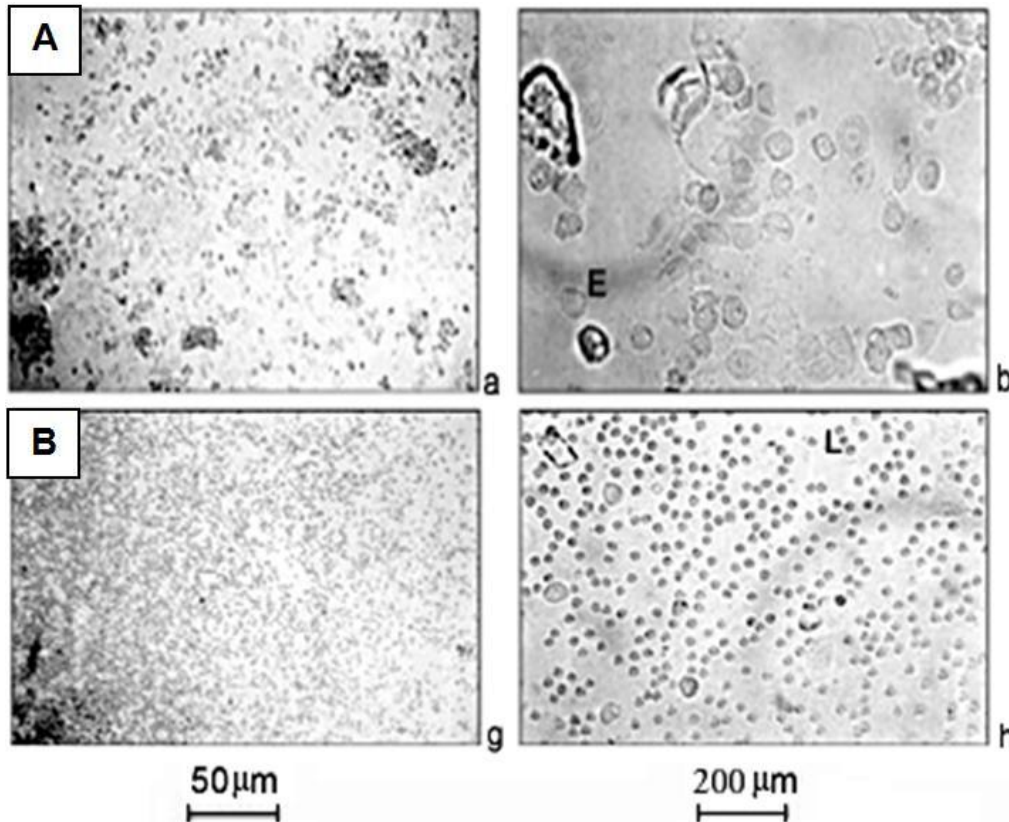
Virtualmente, a arena fora dividida em quatro zonas quadradas periféricas e uma zona circular central.

Durante 1 minuto, os animais permaneceram isolados na arena, a fim de se habituarem ao ambiente. Após esse período, foram analisados os parâmetros, self-grooming, número de entradas em zona e tempo de permanência, perímetro percorrido, trajetória e detecção de movimentação foram quantificados pelo software com 100% de precisão.

3.9 Determinação do ciclo estral das ratas

A vagina da rata foi lavada duas vezes por dia às 08:00 h e às 15:00 h usando 250 mL de solução salina 0,9% estéril e em seguida, transferida para uma lâmina de vidro. As morfologias celulares foram observadas em um microscópio ótico para detectar a fase do ciclo estral. A fase proestro consiste de uma predominância de células epiteliais nucleadas, a fase estro consiste de células cornificadas anucleadas, ambas com o pico de estrógeno aumentado. Já a fase metaestro consiste de células cornificadas anucleadas na presença de leucócitos e a fase diestro é caracterizada pela predominância de leucócitos, onde se encontram a diminuição do estrógeno (LONG; EVANS, 1922; MANDL, 1951) (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografias evidenciando as fases Proestro e Diestro do ciclo estro de ratas



A: a fase proestro consiste de uma predominância de células epiteliais nucleadas. Essa fase é onde ocorre o pico de produção de estrógenos e B: a fase diestro é caracterizada pela predominância de leucócitos. Essa fase é onde ocorre a diminuição da produção de estrógenos.

Fonte: Long e Evans (1922) e Mandl (1951).

3.10 Castração

As ratas de três semanas de idade foram avaliadas antes da cirurgia de ovariectomia, para verificar a ausência de ciclos através do esfregaço vaginal. A cirurgia foi feita através incisões bilaterais no flanco superior. Os feixes ovarianos (Figura 9) foram amarrados com fio seda 4.0, e os ovários foram removidos. A fásia e a pele foram suturadas com fio de seda 5.0. Os procedimentos foram realizados sob anestesia induzida por uma injeção intramuscular de uma mistura de ketamina (100mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). As ratas foram utilizadas nos experimentos 5 a 6 semanas após a cirurgia. Foi administrado tramadol 5mg/kg por via subcutânea de 8/8h e a enrofloxacina 2,71mg/kg por via intra muscular após a cirurgia, durante sete dias. Verificamos eficácia da castração através da observação de esfregaços vaginais durante sete dias (FISCHER; CLEMENTE; TAMBELI, 2007).

Figura 9 – Cirurgia de ovariectomia em ratas



Ratas foram ovariectomizadas através incisões bilaterais no flanco superior. Os feixes ovarianos foram amarrados com fio seda 4.0, e os ovários foram removidos. A fásia e a pele foram suturadas com fio de seda 5.0.

Fonte: Elaboração da autora.

3.11 Remoção do gânglio trigeminal e o corpo estriado

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) e em seguida foi realizada perfusão intracardíaca com 40 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 corpo estriado (CPu) foram removidos e pós-fixados por duas horas em solução de PFA 4% e depois foi feita a crioproteção com solução de sacarose a 30% durante 72 horas com 3 trocas. Os tecidos coletados foram congelados em meio Tissue-Tek OTC (-70°C), para posterior realização de cortes histológicos (10µM de espessura) em criostato (Leica CM1850) a -24°C. Os cortes foram fixados em lâminas silanizadas para a realização de imunofluorescência.

3.11.1 Remoção das glândulas adrenais

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).

3.11.2 Preparação de lâminas histológicas

As glândulas adrenais foram fixadas em formol a 10% por 24h. Em seguida, foram colocadas em álcool a 70% por mais 24h e processados para a inclusão em parafina. Foram realizados cortes seriados de 4µm de espessura. Os cortes das glândulas adrenais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HeE) para análise histopatológica.

As lâminas foram visualizadas e fotografadas no microscópio (Leica DM 2000), com aumento de 100x e 400x. Nas glândulas adrenais, foi observada a região da zona fasciculada no córtex, quantificando a área dos vacúolos citoplasmáticos, através do programa Image J.

3.12 Imunofluorescência para c-Fos e receptor D2 da dopamina

A imunofluorescência para c-Fos e receptores D2 foi realizada em cortes de gânglio trigeminal e corpo estriado (CPu) e amígdala.

As lâminas obtidas no processo descrito acima foram utilizadas para o ensaio de imunofluorescência. Os cortes foram fixados com metanol por 2 minutos depois lavados em PBS (tampão fosfato-salina) e em seguida foi feita a recuperação antigênica com tampão de citrato (pH 6,0, tempo: 15 min.) a 95°C. Depois disso as secções foram permeabilizadas com tritonX100 (0,1%) e depois foi feito o bloqueio com BSA5% com Glicina. Após a lavagem foram incubadas durante a noite (4°C) com anticorpo anti-c-Fos de coelho (Santacruz Biotechnology, 1:200) ou anti-D2 de coelho (Abcam; 1:400). Depois da lavagem para remoção do anticorpo primário, foram incubados por 1 hora e 30 min com o anticorpo secundário fluorescente feito em burro anti IgG de coelho marcado com fluoroforo Alexa flúor 568 (Invitrogen, 1:400). Depois foram incubados por 2h com o anticorpo anti-NeuN (marcador de corpo neuronal; Millipore, Estados Unidos; 1:100) conjugado com alexafluor 488, todos diluídos em albumina sérica bovina (BSA 5%). Após a lavagem com PBS e depois com água destilada, as lâminas foram montadas em fluoromont e fotografadas em um microscópio confocal (Zeiss LSM 710).

A quantificação da área marcada nas fotos foi feita diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelha ou verde). Para isso foi utilizado o programa Image J - NIH. 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.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

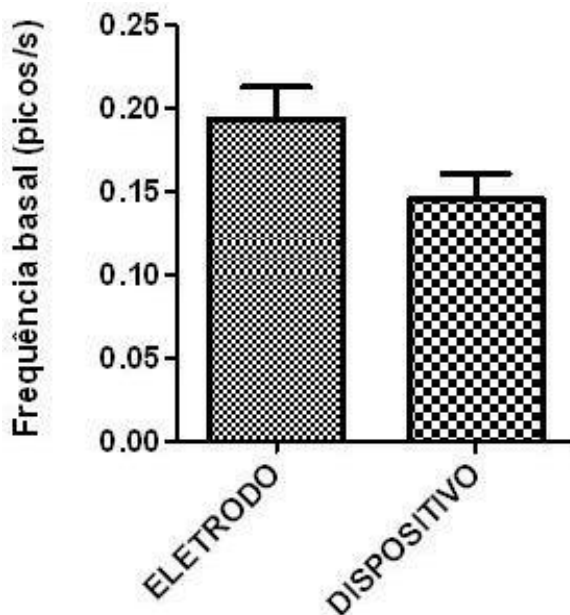
Os dados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita usando o teste t de Student, análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls para comparação de medidas repetidas e ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Significância estatística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

5 RESULTADOS

5.1 Análise eletromiográfica comparativa entre o método de dispositivo móvel e a implantação de eletrodos.

A análise comparativa entre os registros eletromiográficos realizados com os eletrodos implantados e o dispositivo móvel foi feita em ratos antes da indução de estresse emocional. Os dados mostram que não há diferenças entre o registro basal feito com o dispositivo móvel e com os eletrodos implantados (Figura 10). A mesma comparação entre os ratos não foi realizada por não haver um número suficiente de animais após a indução do estresse.

Figura 10 – Avaliação comparativa entre o registro eletromiográfico através de eletrodos implantados e o dispositivo móvel em ratos não estressados



O registro eletromiográfico de músculos mastigatórios foi avaliada através da frequência basal (picos/s) de ratos com eletrodos internos implantados na região dos músculos masseter e temporal (ELETRODO) e eletrodos externos dispostos em um dispositivo móvel também na região dos músculos masseter e temporal (DISPOSITIVO). As barras representam a média + EPM de 10 animais por grupo. (Teste *t* Student)

Fonte: Elaboração da autora.

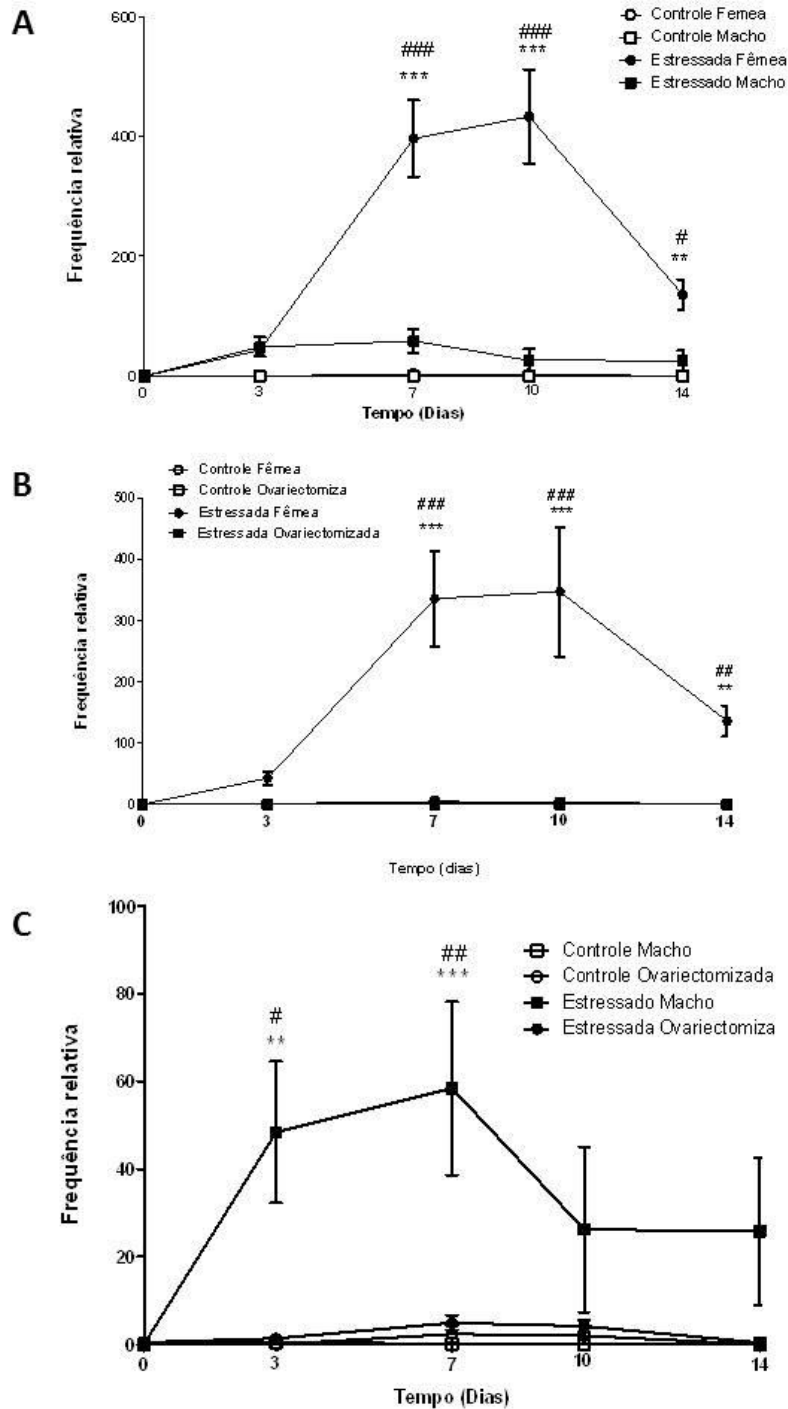
5.2 Análise da atividade muscular mastigatória dos ratos e ratas submetidos a estresse emocional

A análise do registro eletromiográfico mostrou uma diferença entre animais controles e estressados tanto nos ratos como nas ratas. Observou-se que as frequências relativas das ratas foram bem maiores do que nos ratos. As frequências relativas aumentaram a partir do dia 3 e permaneceram aumentadas até o dia 14 nos grupos estressados quando comparado aos controles. No dia 3 não houve diferenças entre os ratos estressados e as ratas estressadas, entretanto a partir do dia 7 as ratas demonstraram uma frequência relativa muito mais alta que os ratos ($396,27 \pm 63,39$ para as fêmeas versus $58,39 \pm 19,77$ para os machos, $p < 0,001$). O pico de aumento da frequência relativa aconteceu no dia 10 para as fêmeas, com valores bem mais elevados que os machos ($433,22 \pm 78,25$ para as fêmeas versus $26,23 \pm 18,74$ para os machos; $p < 0,001$) e para os machos aconteceu no dia 7. Nos dias 10 e 14, nos ratos houve uma diminuição das frequências, o que só aconteceu no dia 14 para as fêmeas (Figura 11).

Quando comparamos os grupos das fêmeas controles e controles ovariectomizadas não observamos diferenças nas frequências relativas entre esses dois grupos. Entretanto fêmeas ovariectomizadas estressadas apresentaram uma redução significativa das frequências relativas quando comparada ao grupo estressada em todos os dias.

A análise por ANOVA de duas vias mostra que existe uma interação significativa entre o tempo (dias de avaliação de 0 a 14 dias) e os grupos avaliados [$F(12,80)=12,03$, $p < 0,0001$] quando compara-se machos e fêmeas (Figura 11 A), [$F(12,64)=10,17$; $p < 0,0001$] quando compara-se fêmeas normais e fêmeas ovariectomizadas (Figura 11 B) e [$F(12,72)=2,81$; $p < 0,01$] quando compara-se machos e fêmeas ovariectomizadas (Figura 11 C).

Figura 11 – Efeito do estresse emocional sobre a atividade muscular mastigatória entre ratos e ratas (normais e ovariectomizadas)



A figura representa o gráfico da frequência de picos do registro eletromiográfico dos músculos masseter e temporal de animais controles e animais submetidos ao modelo de estresse emocional que foi avaliado antes da indução do estresse (Dia 0), 3º dia, 7º dia, 10º dia e 14º dia pós-indução, juntamente com as ratas controles ovariectomizadas e estressadas ovariectomizadas. Os resultados são apresentados como média \pm EPM da frequência de picos relativos ao basal de 7 animais por grupo. A: comparação entre machos e fêmeas e B: comparação entre fêmeas e ovariectomizadas e C: comparação entre machos e fêmeas ovariectomizadas. O asterisco indica a diferença significativa comparada ao seu grupo controle nos dias específicos (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) # representa a diferença significativa na frequência entre os animais estressados (Two Way ANOVA, seguido de Bonferroni).

Fonte: Elaboração da autora.

5.3 Análise do limiar nociceptivo na região dos músculos masseter e temporal em ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

Devido ao estresse emocional provocado pela caixa de comunicação, houve alterações no limiar nociceptivo no músculo masseter e temporal, tendo como resposta a retirada da cabeça do animal após um estímulo mecânico, obtido através do aparelho de Von Frey eletrônico e expresso como força em grama. Todos os animais submetidos ao estresse tiveram em algum dia ou em vários dias o aumento da intensidade de hiperalgesia (Figura 12) que foi calculado pela diferença entre o limiar basal (dia 0) e o limiar aferido nos dias consecutivos (D4 ao D14), sendo denominado de delta (Δ) do limiar de retirada da cabeça em gramas de força (g).

Quando compara-se machos e fêmeas estressados no músculo masseter (figura 12 A), os dois tiveram diferenças significativas ($p < 0,001$) com relação aos respectivos controles nos dias D11 e D14, entretanto o grupo dos machos estressados não apresentou diferenças nos dias D4 e D8. No músculo temporal (figura 12 B) observa-se que os machos não apresentaram diferenças apenas no D4 e as fêmeas no D14. Quando avaliou-se os grupos estressados machos e fêmeas entre si, observou-se que apenas no músculo temporal houveram diferenças nos D11 e D14.

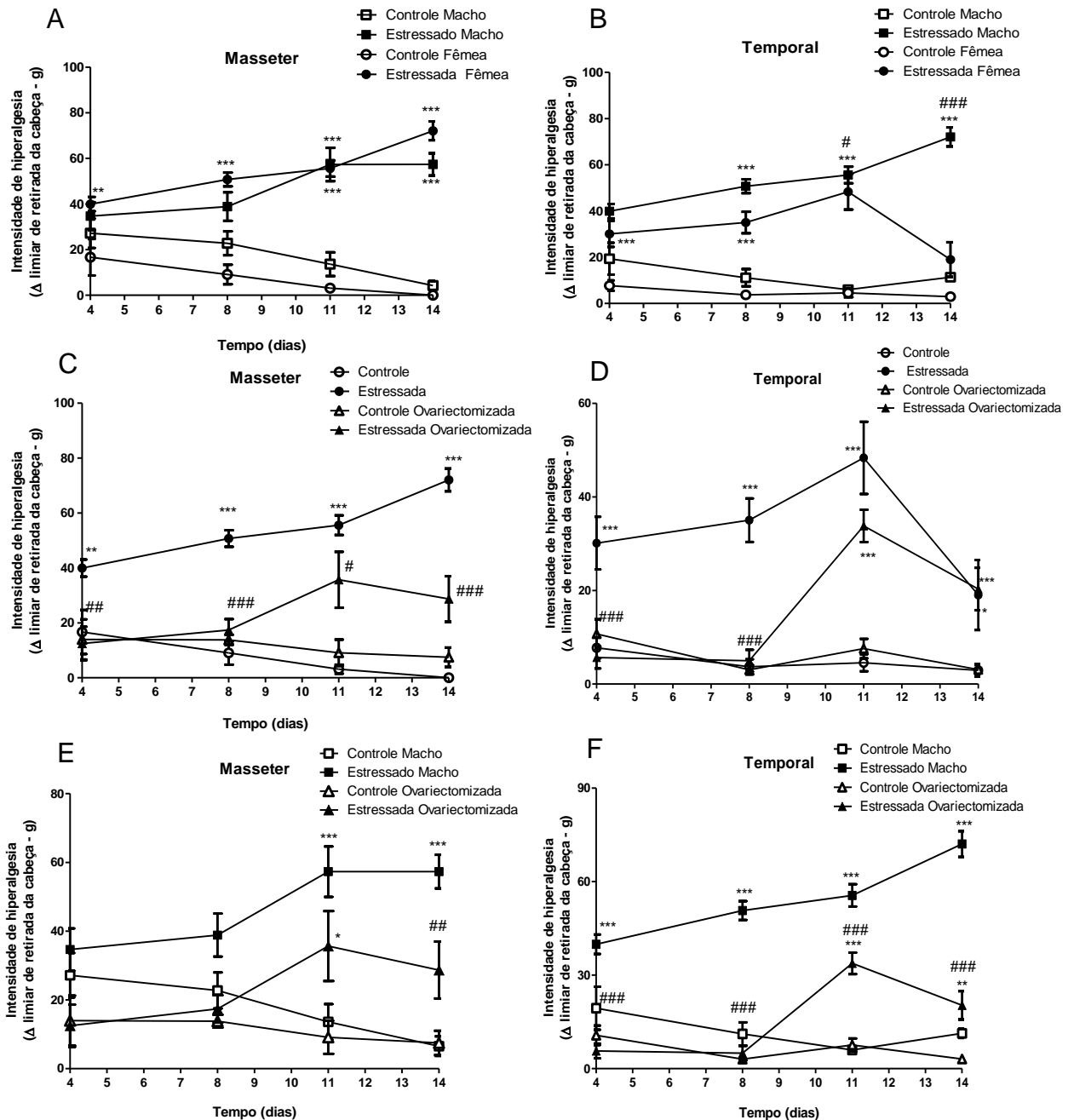
A avaliação das diferenças entre fêmeas normais e ovariectomizadas mostrou que as ovariectomizadas tiveram o mesmo padrão de intensidade de hiperalgesia das fêmeas controles nos D4 e D8, não apresentando diferenças estatísticas tanto no músculo masseter como no temporal (figura 12 C e D). Nos D11 e D14 observou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre as fêmeas ovariectomizadas e seus controles. A avaliação das diferenças entre as estressadas e estressadas ovariectomizadas mostrou que, no músculo masseter, todos os dias tiveram diferenças significativas ($p < 0,001$) e no músculo temporal, apenas os D4 e D8 foram diferentes ($p < 0,001$).

Quando comparou-se machos estressados e fêmeas estressadas ovariectomizadas, no músculo masseter (figura 12 E), observou-se que estas se comportaram de forma semelhante aos machos, sem diferenças significativas, com exceção do D14 onde os machos obtiveram uma maior intensidade de hiperalgesia ($p < 0,01$). No músculo temporal (figura 12 F), observou-se uma diferença significativa

entre a intensidade de hiperalgesia dos machos e fêmeas ovariectomizadas estressados em todos os dias avaliados ($p < 0,001$).

A análise por two way ANOVA mostra que existe uma interação significativa entre o tempo (dias de avaliação de 0 a 14 dias) e os grupos avaliados [$F(9,72)=8,83$, $p < 0,0001$] quando compara-se machos e fêmeas no músculo masseter (Figura 12 A) e [$F(9,63)=7,51$; $p < 0,0001$] para o músculo temporal (figura 12 B), [$F(9,60)=4,85$, $p < 0,0001$] quando compara-se fêmeas normais e fêmeas ovariectomizadas no músculo masseter (Figura 12 C) e [$F(9,51)=5,20$, $p < 0,0001$] no músculo temporal (figura 12 D), [$F(9,60)=4,37$; $p < 0,0001$] quando compara-se machos e fêmeas ovariectomizadas no músculo masseter (figura 12 E) e [$F(9,60)=9,51$, $p < 0,0001$] no músculo temporal (Figura 12 F).

Figura 12 – Efeito do estresse emocional no limiar nociceptivo da região dos músculos masseter e temporal



A figura representa os gráficos da intensidade de hiperalgesia nos músculos masseter e temporal de animais controles e animais submetidos ao modelo de estresse emocional que foi avaliado antes da indução do estresse e no 4º dia, 8º dia, 11º dia e 14º dia pós-indução, juntamente com as ratas controles ovariectomizadas e estressadas ovariectomizadas. Os resultados são apresentados como média \pm EPM do Delta (Δ) do limiar de retirada da cabeça em gramas (g) de 7 animais por grupo que representa a intensidade de hiperalgesia. A: comparação entre machos e fêmeas no músculo masseter, B: comparação entre machos e fêmeas no músculo temporal, C: comparação entre fêmeas e ovariectomizadas no músculo masseter, D: comparação entre fêmeas e ovariectomizadas no músculo temporal, E: comparação entre machos e fêmeas ovariectomizadas no músculo masseter e F: comparação entre machos e fêmeas ovariectomizadas no músculo temporal. Os asteriscos indicam a diferença significativa comparada ao seu respectivo grupo controle nos dias específicos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) # representa a diferença significativa entre os animais estressados (Two Way ANOVA, seguido de Bonferroni).

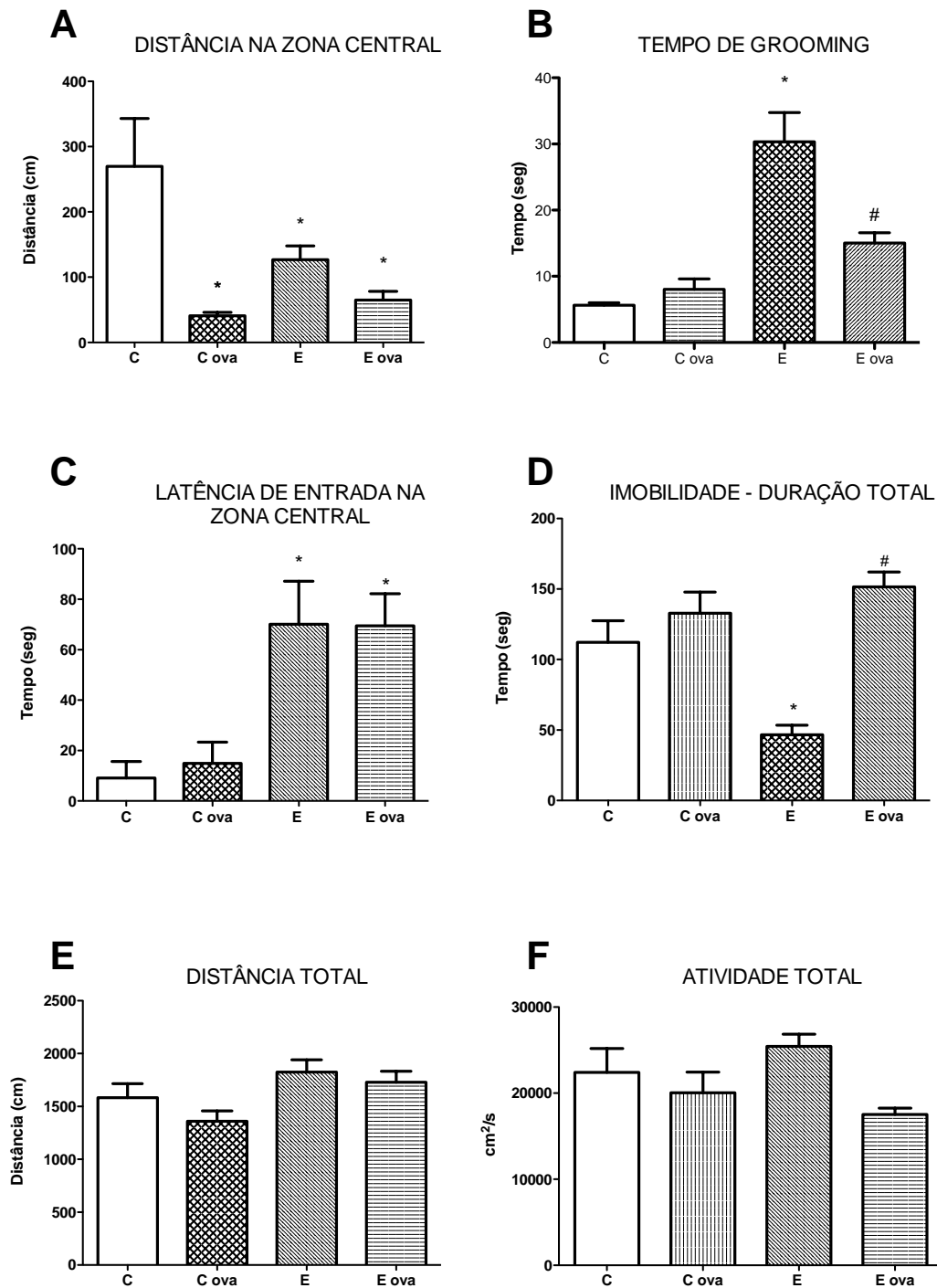
Fonte: Elaboração da autora.

5.4 Análise do comportamento de ansiedade em ratos e ratas submetidas ao modelo de estresse emocional

A análise do comportamento no teste do campo aberto pode fornecer dados a respeito do nível de ansiedade do animal mediante a indução de estresse emocional. Foi feito no dia D0 E D14. Onde foram avaliados os seguintes parâmetros: distância na zona central, tempo de *grooming*, tempo de latência da 1ª entrada na zona central, duração total da imobilidade, distância total. O parâmetro distância na zona central indica que todos os grupos de ratas mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$), quando comparados ao controle (Figura 13 A). A avaliação do tempo de *grooming* mostra que as fêmeas estressadas (E) têm um tempo aumentado de forma significativa ($p < 0,05$) comparada ao com o grupo controle (Figura 13 B). O grupo estressada com ovariectomia (EO) apresentou um tempo menor de *self grooming* quando comparada ao grupo estressada (E) ($p < 0,05$; Figura 13 B). Com relação ao parâmetro latência da 1ª entrada na zona central, foi observado que os grupos estressados (E e EO) apresentam uma maior latência de tempo para a 1ª entrada na zona central (Figura 13 C). A avaliação da imobilidade total mostra que somente os animais estressados (grupo E) tem uma diminuição dessa variável sendo diferente estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 13 D). Os parâmetros distância total e atividade total não tiveram diferenças entre os grupos de fêmeas analisadas (Figura 13 E e F).

Nos ratos foram analisados os mesmos parâmetros, entretanto houve diferenças estatísticas somente na avaliação do *self groomig*, duração da imobilidade e na atividade total. Nesse sentido os ratos estressados mostraram uma diminuição da atividade total com aumento da imobilidade (Figura 14 D e F), assim como um aumento do *self grooming* (Figura 14 B).

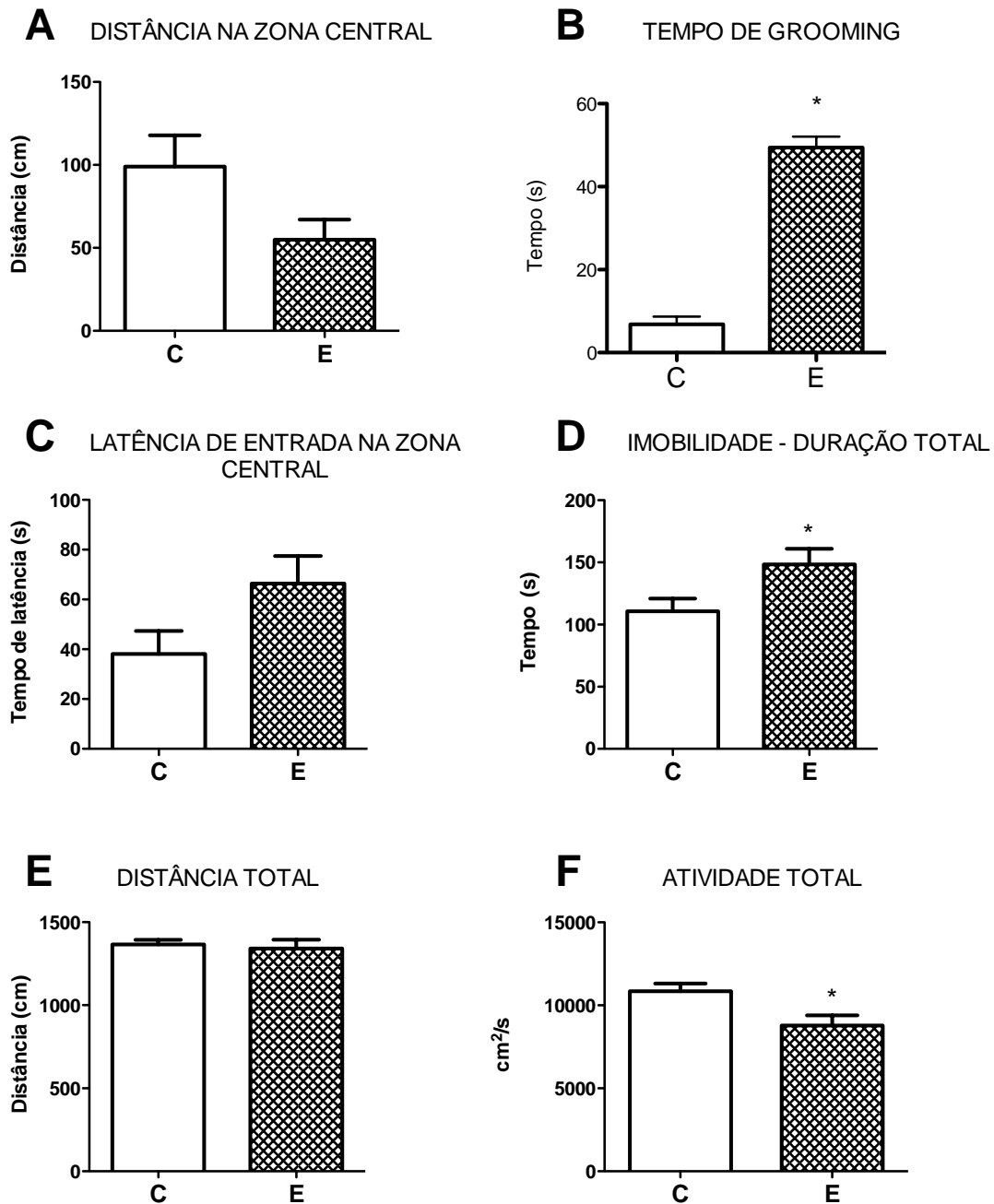
Figura 13 – Análise do comportamento de ansiedade de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional



Animais submetidos ao estresse emocional foram analisados através do teste do campo aberto onde foram computados A: distância (cm) na zona central; B: Tempo de *grooming* (s); C: tempo de latência da 1ª entrada na zona central (s); D: Duração total da imobilidade (s); E: distância total (cm) e F: Atividade total (cm²/s) de ratas controles (C), Controles ovariectomizadas (CO), Estressadas (E) e Estressadas ovariectomizadas (EO). As barras representam a média \pm EPM de grupos de 4 a 6 animais (ANOVA seguido de teste de Newman Keuls; * $p < 0,05$ comparado ao grupo C e # $p < 0,05$ comparado ao grupo E).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 14 – Análise do comportamento de ansiedade de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional



Animais submetidos ao estresse emocional foram analisados através do teste do campo aberto onde foram computados A: distância (cm) na zona central; B: Tempo de grooming; C: tempo de latência da 1ª entrada na zona central (s); D: Duração total da imobilidade (s); E: distância total (cm) e F: Atividade total (cm²/s) de ratos controles (C) ou estressados (E). As barras representam a média \pm EPM de grupos de 6 a 7 animais (Teste t student; * $p < 0,05$ comparado ao grupo C).

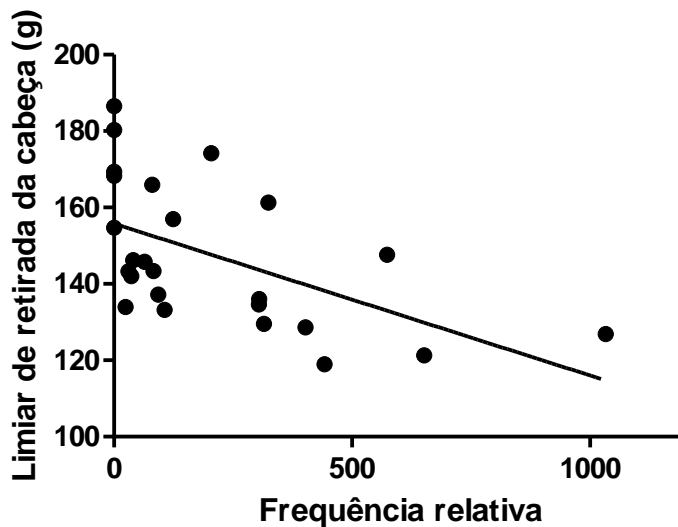
Fonte: Elaboração da autora.

5.5 Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e limiar nociceptivo de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

Avaliamos através do teste de correlação de Pearson, a interligação entre a análise da atividade muscular mastigatória e o limiar nociceptivo dos ratos e das ratas. Com relação aos ratos, os dados mostraram que não ha correlação entre a atividade muscular mastigatória e o limiar nociceptivo, tanto nos músculos masseter como no temporal (dados não mostrados).

Em relação às ratas, os dados mostraram uma correlação entre a atividade muscular mastigatória (frequência relativa) com a diminuição do limiar nociceptivo no músculo masseter. Essa correlação foi estatisticamente significativa no grupo de ratas estressadas, especificamente no musculo masseter ($p < 0,05$; r Pearson = $-0,5443$; $R^2 = 0,2963$), mas não no músculo temporal. Não houve correlação no grupo das ratas ovariectomizadas (Figura 15).

Figura 15 – Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e limiar nociceptivo de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional



A figura representa o gráfico da correlação entre a atividade muscular mastigatória e o limiar nociceptivo de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional. Os pontos representam as amostras tanto na frequência relativa, quanto no limiar de retirada da cabeça do músculo masseter (teste de correlação Pearson $p < 0,05$; r Pearson = $-0,5443$; $R^2 = 0,2963$).

Fonte: Elaboração da autora.

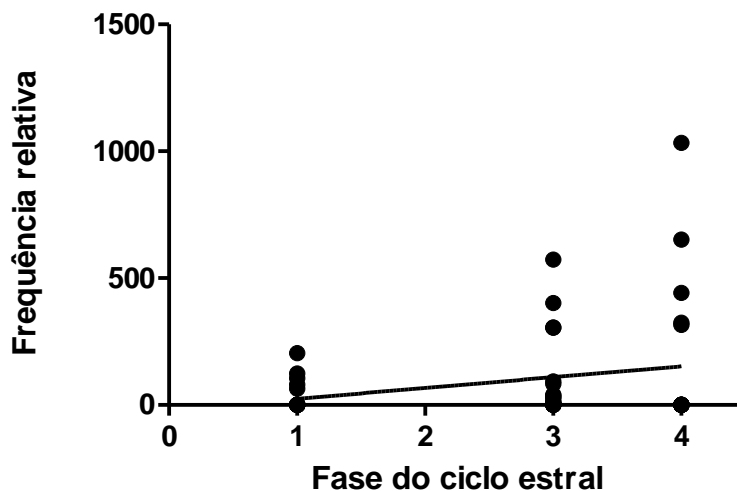
5.6 Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estral em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional.

Para compararmos as correlações entre a atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estral nas ratas enumeraram as fases do ciclo de modo crescente, de acordo com a produção de estrógeno: diestro (1) e metaestro (2), estro (3) e proestro (4).

Os dados mostram uma correlação positiva entre o aumento da atividade muscular mastigatória (frequência relativa) com as fases do ciclo estral ($p < 0,05$; r Spearman = 0,3358; Figura 16).

Não houve correlação entre a diminuição do limiar nociceptivo e as fases do ciclo estral.

Figura 16 – Análise da correlação entre atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estral em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional



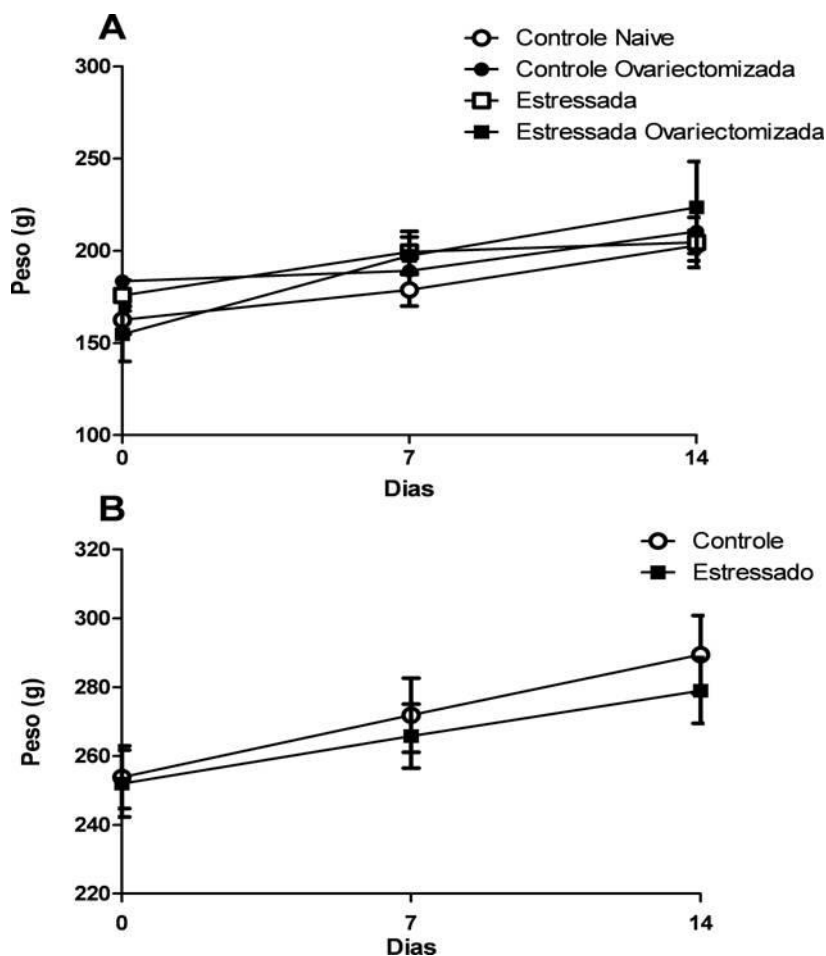
A figura representa o gráfico da correlação entre a atividade muscular mastigatória e as fases do ciclo estral de ratas submetidas ao modelo de estresse emocional (grupo estressadas). Os pontos representam as amostras tanto na frequência relativa, quanto na fase do ciclo: (1) Diestro, (2) Metaestro, (3) Estro e (4) Proestro ($p < 0,05$; r Spearman = 0,3358).

Fonte: Elaboração da autora.

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

Durante o estresse emocional, foi observado o ganho ponderal dos ratos e ratas. Não foram constatadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e estressadas e nem com as ovariectomizadas (Figura 17 A). Nos ratos observou-se um aumento do ganho ponderal no grupo controle desde o início do estímulo estressor, em D7. O grupo controle apresentou ganho ($18 \pm 1,7$), enquanto os estressados não ($13,8 \pm 0,7$), ficando a diferença mais evidente no 14º dia, quando o grupo controle apresentou ganho ponderal ($35,5 \pm 2,2$) e o outro grupo também ($27 \pm 0,15$). Tais achados não possuem significância estatística ($p = 0,085$) (Figura 17 B).

Figura 17 – Análise do ganho de peso corporal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional



O gráfico representa o ganho de peso dos animais controle (C), estressados (E), ovariectomizadas (O) e não ovariectomizadas, avaliados antes da indução do estresse (D0), no 7º dia (D7) e no dia 14º (D14) pós-indução. Os resultados apresentaram média \pm EPM do ganho corporal por 7 animais por grupo (Two way ANOVA seguido de Bonferroni).

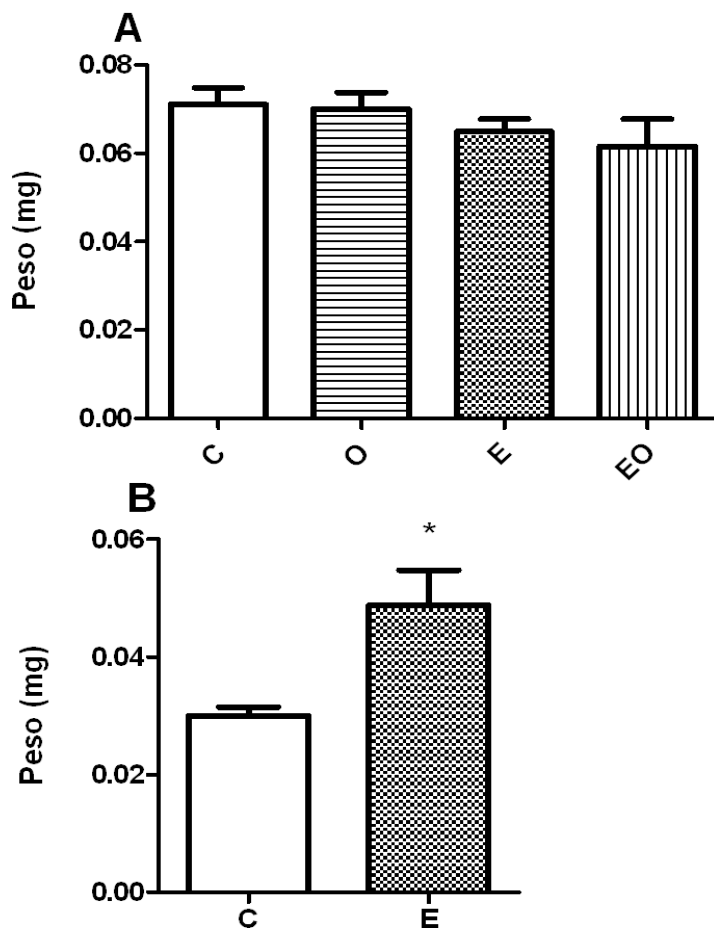
Fonte: Elaboração da autora.

5.8 Análise do peso bruto das glândulas adrenais de ratos e ratas submetidos emocional

Com relação ao peso da adrenal nos 4 grupos das ratas estudada não foi observado diferença entre os grupos. O peso foi medido em gramas (g) e posteriormente transformado para miligramas (mg). No grupo controle naive ($71 \pm 3,8$), grupo controle ovariectomizadas ($70 \pm 3,7$), grupo estressada ($64,8 \pm 2,8$) e grupo estressada ovariectomizadas ($61,5 \pm 6,2$) (Figura 18 A).

Quando comparamos, os machos submetido ao estresse com o grupo controle naive, notamos um aumento significativo no peso da glândula ($p < 0,05$), nos ratos estressado ($48,7\text{mg} \pm 5,9$), enquanto o controle ($29,9 \pm 1,5$) (Figura 18 B).

Figura 18 – Peso bruto das glândulas adrenais de ratos e ratas submetidas ao modelo de estresse emocional



A figura representa o gráfico do peso bruto em gramas (g) das glândulas adrenais. No gráfico (A), as ratas se dividiram em grupos controle(C), estressadas (E),estressadas ovariectomizadas (EO) e ovariectomizadas (O). Os ratos (B) foram divididos em controle (C) e estressados (E). Os resultados apresentaram média \pm EPM do peso das adrenais por sete animais por grupo. (Teste t student; * $p < 0,05$ comparado ao grupo C).

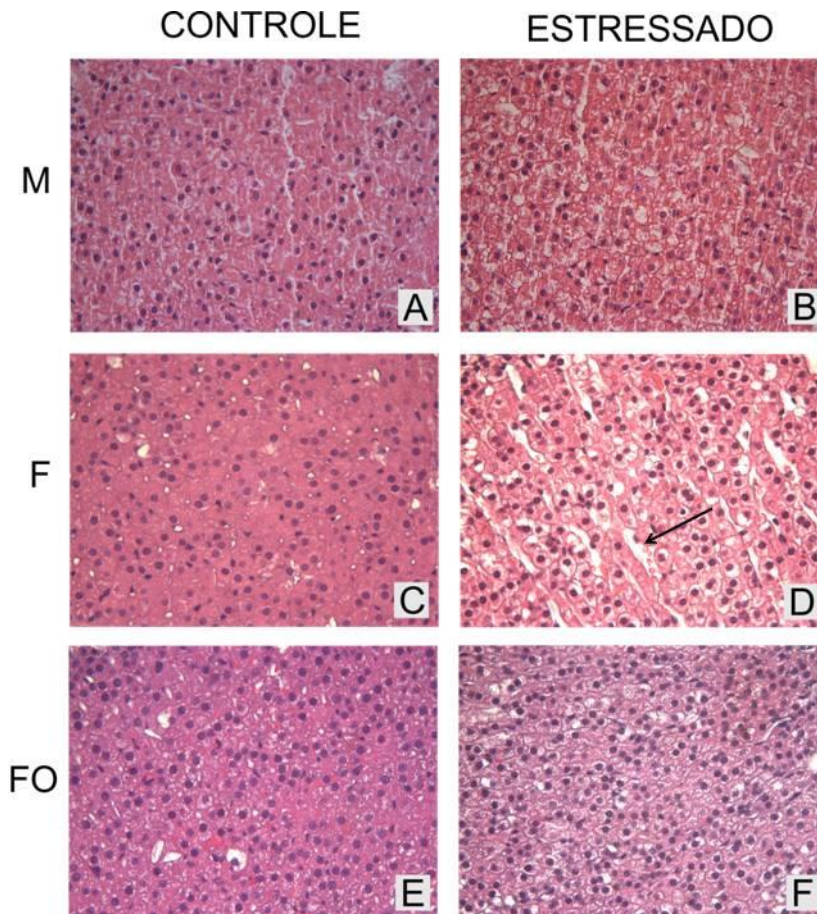
Fonte: Elaboração da autora.

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

Foram demonstrados perfis histológicos diferentes na análise da glândula adrenal entre os grupos controles e os grupos estressados. A zona fasciculada do córtex das adrenais dos animais estressados apresentou uma maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos quando comparado ao grupo controle (Figura 19). A presença dos vacúolos citoplasmáticos ocorreu em todos os grupos estressados (machos fêmeas e fêmeas ovariectomizadas).

Os vacúolos citoplasmáticos, quando quantificados através do cálculo da % de área marcada, mostra uma diferença estatística entre todos os grupos estressados e os respectivos grupos controle (não estressados machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas; Figura 20).

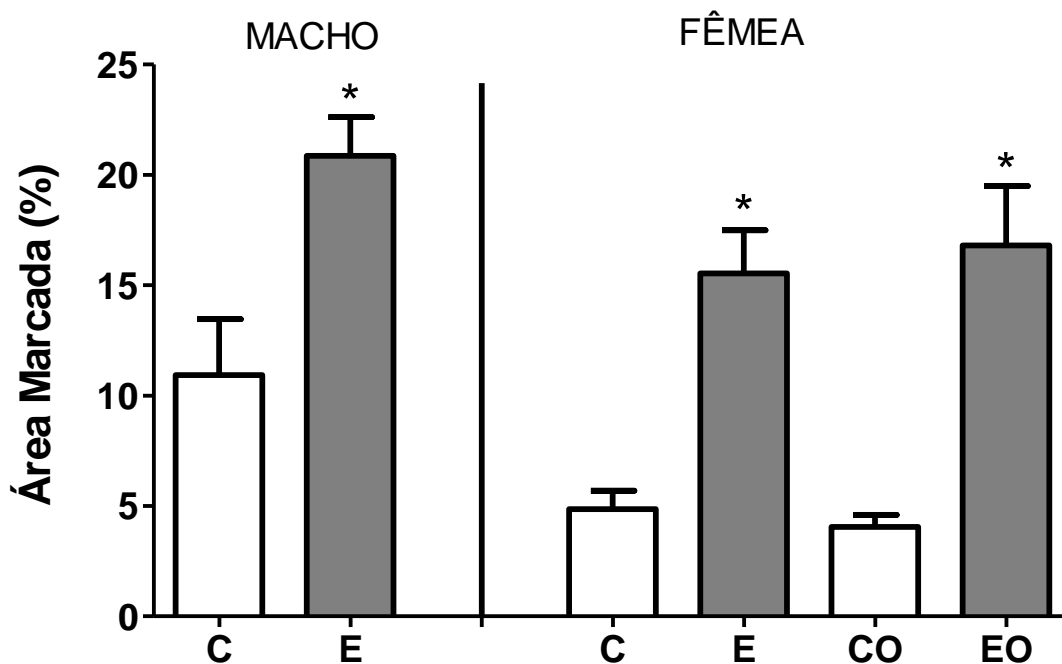
Figura 19 – Fotomicrografias do córtex glândulas adrenais (zona fasciculada) de ratos submetidos a estresse emocional



Os vacúolos citoplasmáticos são indicados pela seta. Tendo o aumento de 400x e 1000x. M (ratos machos); F (ratas fêmeas); FO (ratas fêmeas ovariectomizadas).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 20 – Avaliação da área de vacúolos citoplasmáticos na zona fasciculada da glândula adrenal de ratos submetidos a estresse emocional



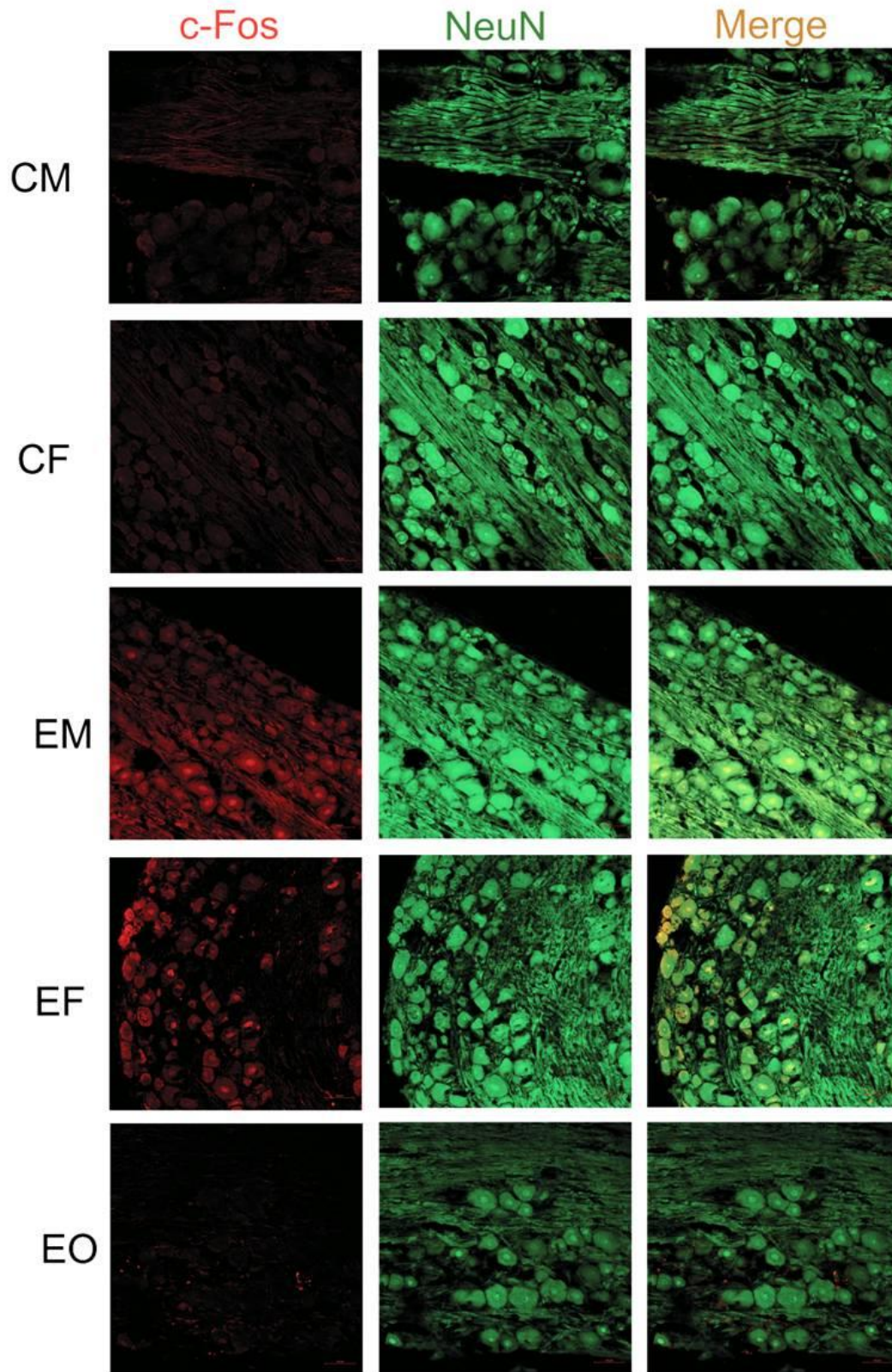
A figura representa em porcentagem da área dos vacúolos citoplasmáticos em na zona fasciculada cortes histológicos da glândula adrenal de animais do grupo controle (C), grupo emocionalmente estressado (E) tanto do sexo masculino quanto do feminino, além do grupo de ratas ovariectomizadas (CO) e estressada ovariectomizada (EO) submetidos ao modelo de estresse emocional. As barras representam a média \pm EPM da % de área de vacúolos citoplasmáticos de 7 animais por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatísticas entre os grupos estressados (E) e seus respectivos controles (C e CO) (ANOVA seguido de Newman Keuls, * $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

5.10 Análise da expressão de c-Fos em gânglio trigeminal de ratos submetidos ao modelo de estresse emocional

A expressão de c-Fos, realizada em cortes de gânglio trigeminal, através de imunofluorescência foi feito em machos e fêmeas normais ou ovariectomizadas submetidas ou não ao modelo de estresse emocional. A análise confocal mostra uma marcação discreta, principalmente em neurônios nos grupos controles machos e fêmeas (Figura 21, CF e CM). O grupo de ratos machos e fêmeas estressadas mostrou um aumento na expressão desse marcador que pode ser visualizada na Figura 21 (EM e EF). No grupo estressada ovariectomizada observamos uma menor expressão, quando comparado ao grupo estressada (Figuras 21 EO e EF). A co-marcação com NeuN evidência a expressão desse receptor principalmente em corpo de neurônios (merge).

Figura 21 – Fotomicrografia da imunoexpressão c-Fos em gânglio trigeminal de ratos emocionalmente estressados (aumento 200x)



Fotomicrografia confocal de gânglio trigeminal de ratos controle (CM), ratas controle (CF), estressados (EM) e estressadas (EF) e estressadas ovariectomizadas (EO), mostrando a intensidade de marcação para c-Fos (Vermelho: Alexa 594); para NeuN (Verde, alexa 488, marcador de neurônio); e a co-marcação em amarelo (merge). Aumento de 200x.

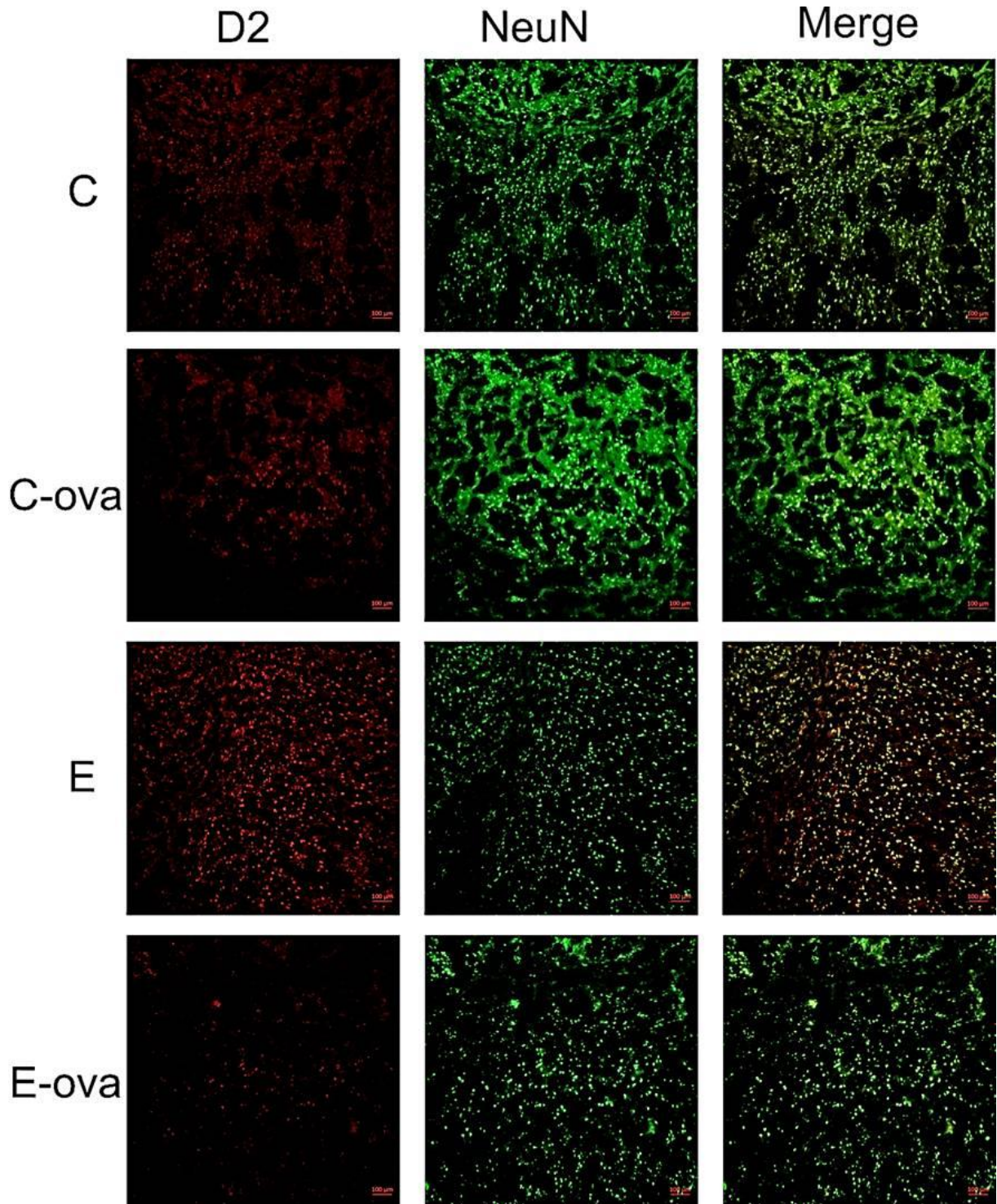
Fonte: Elaboração da autora.

5.11 Análise da expressão dos receptores D2 da dopamina em corpo estriado em ratas submetidas ao modelo de estresse emocional

A expressão de receptores D2 da dopamina, realizada em cortes de corpo estriado, através de imunofluorescência foi feito em ratas normais e ovariectomizadas submetidas ou não ao modelo de estresse emocional. A análise confocal mostra uma marcação discreta, principalmente em neurônios nos grupos controle e controle ovariectomizadas (figuras 22 e 23). O grupo de ratas estressadas mostrou um aumento na expressão desse receptor que pode ser visualizada tanto nas fotos das figuras 22 e 23 como na quantificação da área marcada da Figura 24. O aumento da expressão foi significativa ($p < 0,05$) apenas no grupo estressado, quando comparado ao controle (Figura 24). No grupo estressada ovariectomizada observamos uma menor expressão, quando comparado ao grupo estressada (Figuras 22 e 23), apresentando diferença estatística em relação ao mesmo ($p < 0,05$; Figura 24). A co-marcação com NeuN evidência a expressão desse receptor principalmente em neurônios (merge).

A análise da expressão de receptores D2 em ratos não foi possível por perda de material, mas será realizada em futuros experimentos.

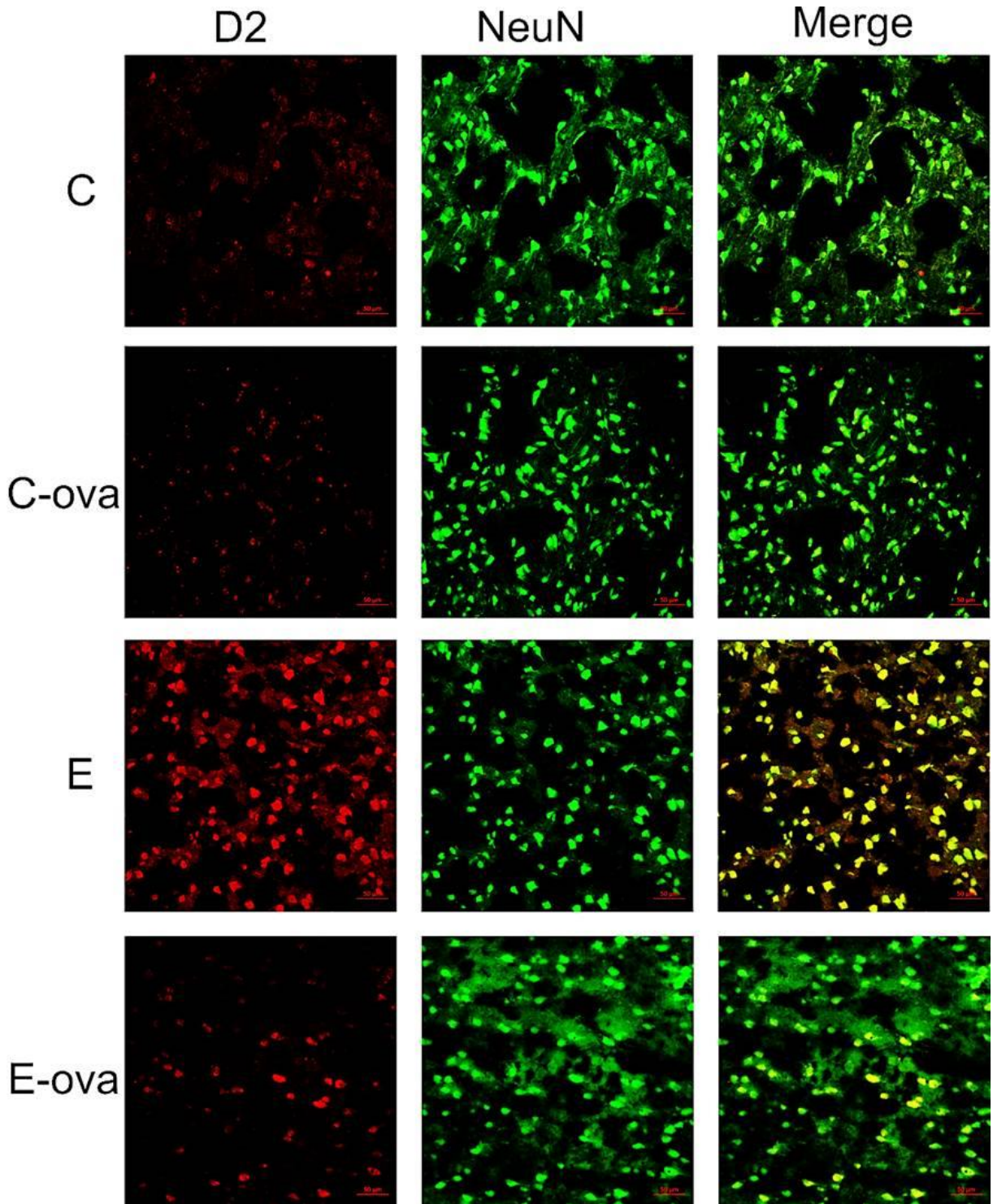
Figura 22 – Fotomicrografia da imunexpressão de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas (Aumento 100x)



Fotomicrografia confocal de corpo estriado de ratas controle (C), controle Ovariectomizadas (C-ova), estressadas (E) e estressadas ovariectomizadas (E-ova) mostrando a intensidade de marcação para o receptor D2 da dopamina (Vermelho: D2 Alexa 594); para NeuN (Verde, alexa 488, marcador de neurônio); e a co-marcação em amarelo (merge). Aumento de 100x.

Fonte: Elaboração da autora.

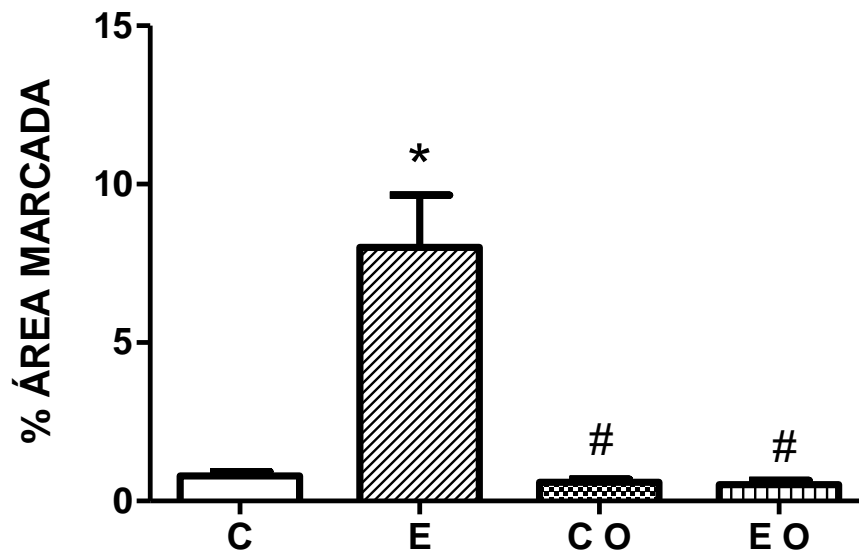
Figura 23 – Fotomicrografia da imunexpressão de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas (Aumento 200x)



Fotomicrografia confocal de Corpo estriado de ratas controle (C), controle ovariectomizadas (C-Ova), estressadas (E) e estressadas ovariectomizadas (E-ova) mostrando a intensidade de marcação para o receptor D2 da dopamina (Vermelho: D2 Alexa 594); para NeuN (Verde, alexa 488, marcador de neurônio); e a co-marcação em amarelo (merge). Aumento de 200x.

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 24 – Quantificação da porcentagem de área marcada da imunofluorescência de receptores D2 da dopamina em corpo estriado de ratas submetidas ao estresse emocional



As barras representam a média \pm EPM da porcentagem (%) da área marcada de vermelho (receptor D2 marcado com alexa flúor 594) em amostras de corpo estriado de ratas fêmeas: C = controle normal; CO= controle ovariectomizadas; E = estressadas; EO = Estressadas ovariectomizadas. Anova seguido de teste de Neuwman Keuls ($p < 0,05$)
Fonte: Elaboração da autora.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo mostrou-se um novo método para a realização de eletromiografia que foi eficaz em detectar alterações da atividade muscular mastigatória em ratos e ratas emocionalmente estressadas. Até onde sabemos, este é o primeiro dispositivo de uso externo, não invasivo, para realizar EMG de músculos mastigatórios em ratos. Com este dispositivo foi possível realizar a avaliação das diferenças entre machos e fêmeas, que mostraram uma maior atividade muscular nas fêmeas e que essa atividade era diminuída em fêmeas ovariectomizadas e parece ter relação com a fase do ciclo estral.

A nocicepção associada ao bruxismo também foi avaliada, evidenciando um aumento nos animais estressados em ambos os sexos, se correlacionando com o aumento da atividade mastigatória no que foi corroborado pela marcação de c-Fos no gânglio trigeminal. Existe um aumento da expressão de receptores D2 da dopamina no corpo estriado das ratas estressadas que pode estar relacionado aos parâmetros analisados.

Nosso protocolo foi dividido em dois grandes grupos, um de ratos e outros de ratas. Esse último ainda foi subdividido em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. O motivo dessa divisão é baseado em vários estudos que tem demonstrado que a diferença de sexo em ratos também pode mimetizar a diferença de gêneros em humanos. Isso pode ser por motivos hormonais ou por outras alterações dependentes do sexo. Por conta disso, a *National Institutes of Health* dos Estados Unidos declarou que o ideal seria utilizar e estudar ambos os sexos em modelos de trabalhos, tanto clínico e experimental.

O presente estudo é o primeiro, dentro do nosso laboratório, a avaliar essas diferenças entre os sexos. Sendo referência para a implantação de outros modelos e protocolos experimentais.

No início da nossa pesquisa, utilizamos o método invasivo de realização de EMG proposto por Rosales *et al.* (2002), através da implantação de eletrodos por via subcutânea, posicionados sobre os músculos masseter e temporal para captar os sinais mioelétricos. Tentamos esse método por mais de um ano, conseguindo realizar algumas avaliações eletromiográficas, entretanto com falhas, pois os animais retiravam os eletrodos antes de completar o protocolo planejado. Segundo Silveira (2015), que utilizou o mesmo método, também não obteve um número

satisfatório de registros eletromiográficos até o final do protocolo, causando prejuízo na análise final dos resultados.

Por conta disso, desenvolvemos um método não invasivo, portátil e de fácil execução para realizar a mesma função. Desse modo, um dispositivo móvel, em formato de capacete, feito com fio ortodôntico de aço inoxidável, acoplado a eletrodos de ECG foi adaptado na cabeça do animal na região correspondente aos músculos masseter e temporal. Após essa criação, conseguimos obter os dados propostos com sucesso, onde procuramos comparar os registros feitos com o dispositivo confeccionado com o método invasivo tradicional. Os registros mostram que o uso do dispositivo reproduz os registros obtidos com o método invasivo quando comparamos animais machos não estressados utilizando o dispositivo. Só foi possível fazer essa comparação durante o registro basal, pois havia um número suficiente de animais com o eletrodo implantado.

Durante o seguimento do experimento com os eletrodos implantados, os mesmos foram sendo perdidos pela retirada pelo próprio animal, não restando animais suficientes para fazer a análise comparativa com grupos estressados. Esse novo método será útil para estudos futuros, pois é um instrumento de baixo custo, de fácil aplicação e de alta fidedignidade, sendo uma contribuição do nosso trabalho para a comunidade científica que deseja trabalhar com a avaliação e diagnóstico através da EMG.

A avaliação da atividade mastigatória em ratos mostrou uma diferença logo nos primeiros dias de avaliação, sendo o pico de atividade no dia 7 após o início do estresse. Esse resultado está similar ao do modelo de Rosales *et al.* (2002) que serviu como referência principal do nosso estudo, o qual mostrou um pico de atividade muscular no dia 8 com diminuição a partir do dia 11. No nosso estudo os dias padronizados foram diferentes, mas observamos um pico no dia 7, com diminuição nos dias 10 e 14.

A atividade muscular mastigatória nas ratas estressadas começou a aumentar a partir do dia 3, com frequência relativa semelhante ao dia 3 nos machos. A partir do dia 7 até o dia 10, observou-se um aumento importante dessa atividade muscular nas ratas estressadas quando comparado ao controle e aos ratos estressados no mesmo período. Essa hiperatividade muscular diminuiu no dia 14, porém, mostra-se significativamente mais elevada do que nos ratos em todos os períodos observados. Foi visto também alteração estatisticamente significativa na

comparação das estressadas ovariectomizadas e não ovariectomizadas, nos dias 7, 10 e 14, mostrando a possível contribuição do hormônio feminino para o aumento da atividade muscular mastigatória, mimetizando processo de bruxismo.

Segundo Lobbezoo e Naeije (2006), na faixa etária pediátrica, existem mais meninas afetadas com o bruxismo do que meninos. Entretanto, tal diferença de gênero não foi constatada em adultos, de acordo com os estudos de Bernhardt *et al.* (2004) e Manfredini *et al.* (2013). Porém, essa diferença é clara, pois existem vários trabalhos que evidenciam uma maior prevalência do bruxismo no gênero feminino (BARBOSA, 2008; BIONDI; CORTESE; OLIVER, 2003; THILANDER *et al.*, 2002).

Os fatores cognitivos e comportamentais, como ansiedade e estresse, geram respostas hormonais, provavelmente devido à estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (REFULIO *et al.*, 2013). Sugere-se que exista uma interligação entre bruxismo, aumento do nível de cortisol salivar e a percepção de estresse como foi descrito por Winocur *et al.* (2011). Entretanto, Nakata *et al.* (2008), mostrou uma fraca associação entre a relação de estresse no local de trabalho e o bruxismo, em uma amostra de operários japoneses.

De uma forma geral, vários autores justificam uma maior resposta a estímulos dolorosos no sexo feminino, tanto em humanos (FILLINGIM; EDWARDS; POWELL, 1999; RILEY; GILBERT, 2001; CAIRNS *et al.*, 2002; ALOISI, 2003) quanto em animais (GAUMOND; ARSENAULT; MARCHAND, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2003; CLEMENTE *et al.*, 2004; FISCHER; CLEMENTE; TAMBELI, 2007). Nesse sentido, uma das perguntas do presente estudo foi se existiam diferenças entre o limiar nociceptivo na região dos músculos mastigatórios entre ratos e ratas submetidos ao modelo de estresse emocional, e se a hiperatividade muscular mastigatória estaria envolvida nesse fenômeno. Os nossos resultados mostram que o aumento da atividade muscular mastigatória, demonstrada através da eletromiografia, tem relação com a diminuição do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico nos músculos mastigatórios. As fêmeas tiveram mais hiperatividade que os machos, bem como houve diferença entre os músculos afetados, no caso dos machos estando mais envolvido o temporal.

Nosso estudo é confirmado pelo trabalho de Ciancaglini, Gherlone e Radaelli (2001) que correlacionaram o bruxismo com a dor orofacial e os sintomas de DTM por meio de questionários. Foi evidenciada uma prevalência de bruxismo

em 31,4% dos envolvidos. Através, de uma análise estatística, o trabalho concluiu uma associação significativa entre bruxismo e dor orofacial, além de dificuldade e dor ao movimentar a mandíbula, sons articulares e sensação de fadiga muscular e cervicalgia.

Com relação a diferenças de limiar nociceptivo entre machos e fêmeas, observamos que as fêmeas atingem o pico de nocicepção de forma mais precoce do que os machos. Esse pico ocorre nas fêmeas no dia 4, enquanto que nos machos o pico aparece no dia 14 para o temporal e a partir do dia 11 no músculo masseter. Isso sugere uma maior sensibilidade nociceptiva das fêmeas ao estresse emocional numa fase aguda, enquanto que o macho tem uma maior sensibilidade nociceptiva na fase tardia do estresse emocional. Podemos observar também que nas fêmeas o pico de hiperatividade muscular mastigatória não coincide com o pico de nocicepção, o que sugere que outros mecanismos associados ao estresse estejam envolvidos com a sensibilização das terminações nociceptivas na região dos músculos testados.

A análise da marcação de c-Fos no gânglio trigeminal corrobora com os achados comportamentais, onde os grupos de animais estressados machos e fêmeas tem uma visível maior expressão de c-Fos do que os respectivos grupos controles. De fato c-Fos vem sendo utilizado por vários autores, durante muito tempo, como um marcador de atividade neuronal e pode ser utilizado como um parâmetro associado à dor (SHIMIZU *et al.*, 2006). Uma maior marcação para c-Fos indica maior atividade neuronal e sendo no gânglio trigeminal, onde encontramos corpo celular de neurônios aferentes sensitivos, pode sugerir que a via nociceptiva trigeminal está mais ativa nesses ratos estressados.

Van Selms *et al.* (2004) avaliaram a associação das parafunções orais com o estresse psicológico. Seus resultados evidenciaram que as variações na atividade muscular durante o sono não estão relacionadas com as variações da dor muscular pela manhã. Tendo como o paradigma de que o estresse pode estar contribuindo para o apertamento dos dentes durante o dia e para a dor muscular que ocorre ao entardecer.

Outra pergunta do presente estudo foi sobre a influência dos hormônios sexuais. As divergências começam quando se inicia uma discussão sobre a influência dos hormônios ovarianos sobre os mecanismos nociceptivos. Para isso buscamos correlacionar fase do ciclo estral com o maior pico de nocicepção e sua

relação com a atividade muscular mastigatória em ratas não ovariectomizadas e também procuramos avaliar esses resultados em fêmeas ovariectomizadas.

Ao realizar a análise de correlação entre a atividade muscular mastigatória e a fase do ciclo estral observa-se que existe uma correlação positiva.. Ou seja, existe uma correlação da fase proestro (fase de maior produção de estrógeno) com os picos eletromiográficos nas fêmeas estressadas. Entretanto a análise de correlação entre limiar nociceptivo dos músculos masseter e temporal com as fases do ciclo estral não foi significativo, sugerindo que não existe uma relação linear entre essas duas variáveis.

Podemos sugerir que as fases do ciclo estral não influenciam na resposta nociceptiva, entretanto se observamos as fêmeas ovariectomizadas, percebe-se uma diminuição da nocicepção nos músculos mastigatórios, indicando que o fato da fêmea estar ciclando ou não, influência no teste nociceptivo. Foi visto também que as fêmeas ovariectomizadas após o 11º dia começam a apresentar um aumento na nocicepção, uma característica que as tornam semelhantes aos machos que também aumentaram seu comportamento nociceptivo nesse mesmo período. A análise da marcação por c-Fos corrobora com esses achados, pois fêmeas ovariectomizadas expressam menos c-Fos em gânglio trigeminal do que as estressadas que estão ciclando.

A literatura é controversa com relação a influência dos hormônios gonadais sobre a nocicepção na região orofacial. Com relação a isso, estudos afirmam que o estrógeno tem um papel pró-nociceptivo na região orofacial e outros afirmam o contrário. Alguns estudos descrevem que na fase proestro, do ciclo estral de ratas, há um maior limiar nociceptivo a formalina e ao glutamato na ATM, quando comparado com a fase diestro do ciclo estral. Fischer *et al.* (2008) demonstram que em ratas ovariectomizadas, o comportamento nociceptivo é maior que em ratas naive, simulando a fase diestro do ciclo.

Em nosso estudo, identificamos os períodos do ciclo estral através do esfregaço vaginal. Foi demonstrado que durante a fase estro e proestro nas ratas estressadas houve uma diminuição do limiar nociceptivo, sendo explicado por ser o momento do pico de estrógeno. Corroborando com nossos resultados outro autor, Leresche *et al.* (1997), mostraram que durante a menopausa há uma redução dos sintomas álgicos na ATM, que são revertidos com a introdução de estrógeno.

Clemente *et al.* (2004) determinaram, em seu trabalho, que os receptores opióides kappa desempenham um papel de modulador da dor inflamatória, através da injeção de formalina na ATM de ratos. Durante a fase diestro, as ratas apresentaram um maior limiar nociceptivo comparado com os ratos. Com isso, puderam concluir que os agonistas do receptor opióide kappa induzem uma mecanismo protetor contra a dor em ratos do sexo feminino quando comparado com os machos.

O que podemos sugerir com nossos resultados é apenas que o aumento da atividade muscular mastigatória aumenta a sensibilidade nociceptiva orofacial, onde esse aumento da atividade muscular está relacionado com a fase do ciclo estral. Mas não foi possível correlacionar a nocicepção com o ciclo. Possivelmente outros fatores possam estar envolvidos na modulação da sensibilidade nociceptiva na região orofacial além de hormônios quando trata-se de bruxismo por estresse emocional. Ou então faz-se necessário um número maior de animais na avaliação.

Existem evidências que relatam que os níveis de estrógeno agem sobre o metabolismo e também sobre o desenvolvimento, tensão e a restituição da ATM e estruturas associadas (ossos, cartilagens e disco articular). Age também causando maior flacidez dos tecidos musculares, podendo influenciar a síntese de colágeno e elastina, além da tensão nesses músculos, e também esta ligado ao estresse emocional (WARREN; FRIED, 2001). O estrógeno pode modular inúmeros processos biológicos na região da ATM, incluindo inflamação, atividade de metaloproteinase e modulação da dor. Porém, nenhum desses processos explica totalmente a prevalência do bruxismo pelo gênero feminino, o que implica que outros mecanismos dependentes estejam envolvidos (KAMIYA *et al.*, 2013).

Mulheres entre 20 e 30 apresentam maior prevalência de bruxismo, sendo explicados devido à suscetibilidade a fatores emocionais ou anatômicos (AGGARWAL *et al.*, 2010; GIANNAKOPOULOS *et al.*, 2010; GONÇALVES; TOLEDO; OTERO, 2010). Nosso trabalho evidenciou um aumento da hiperatividade muscular associado com a diminuição do limiar nociceptivo nas ratas estressadas quando comparadas com as ratas naive. O mesmo achado também foi visto com alteração significativa nos ratos.

Morales *et al.* (2006) demonstraram que níveis de testosterona diminuídos estão associados ao desenvolvimento e a manutenção de algumas condições dolorosas. Aloisi, Ceccarelli e Fiorenzani (2003) mostraram que testosterona induz

um mecanismo de adaptação com redução das respostas nociceptivas em ratos submetidos a estímulos repetitivos. Nosso trabalho evidenciou que o limiar nociceptivo dos ratos diminui principalmente nos dias 11 e 14. Não houve diferenças comparando os dois dias entre o que corrobora com o mecanismo adaptativo descrito na literatura.

Fischer, Clemente e Tambeli (2007) demonstraram que a testosterona pode ter um papel protetor no desenvolvimento da dor orofacial relacionada à inflamação da ATM em ratos. Através da comparação entre ratos gonadotectomizados com os ratos *naïve* foi constatado que os ratos gonadectomizados tinham um menor limiar nociceptivo similar a ratas *naïve*. Níveis suprafisiológicos de testosterona possui efeito analgésico também no teste da formalina na ATM.

A diminuição do limiar nociceptivos dos ratos associados com a hiperatividade muscular também foram avaliados e correlacionados nesse estudo. Foi observada a diminuição do limiar nociceptivo nos ratos estressados a partir do dia 4, permanecendo até o final do protocolo, o que evidencia um papel importante do fator estressor para desencadear a hiperatividade muscular. Tais dados são corroborados com a pesquisa realizada por Nascimento *et al.* (2009). Nesse estudo ficou identificados dois grupos de pacientes: 103 estressados (21%) e 383 não estressados (79%). No grupo estressado foi visto que 46 pacientes (44,7%) apresentaram evidências de bruxismo e 57 pacientes (55,3%) não apresentaram tais alterações. O estresse provoca várias respostas metabólicas que, se for intenso pode causa um desequilíbrio do organismo, tornando-o mais propício a patologias, como sudorese, hiperacidez gástrica, tensão muscular, hipertensão arterial e bruxismo (LUCINDA *et al.*, 2015).

Segundo Maciel (2010), alterações emocionais estão relacionadas com a gênese do distúrbio parafuncional. Os fatores mais implicados são: o estresse, tensão emocional, ansiedade, depressão, medo, frustração, e raiva. Todos esses achados podem contribuir para alterar a estrutura psíquica de um indivíduo.

A ansiedade está bastante relacionada com a dor. O paciente ansioso apresente uma maior percepção algica e está pode ser vista como um mecanismo de defesa do indivíduo. Isto faz com que seu sistema entre em alerta (CAMON, 2012). Na maioria dos casos, a ansiedade se estabelece no contexto das pressões, sendo denominada de estresse da vida diária (CLARK; BECK, 2012).

Para avaliar o fator ansiedade e a sua correlação com a nocicepção e a atividade muscular mastigatória, os animais do estudo foram observados no teste do campo aberto durante 5 minutos. Isso foi feito no final do protocolo experimental no dia 14. Os parâmetros avaliados incluíram “self grooming”, tempo de atividade na área central do campo, tempo total de imobilidade, distância percorrida na arena total e tempo de latência para a 1ª entrada na área central. Animais que exploram menos a área central e que demoram a sair da periferia da arena são considerados com comportamento ansioso aumentado, assim como aqueles que realizam com mais frequência e por um tempo maior o *self grooming*, ou auto limpeza (CATHOMAS, *et al.*, 2015; KAZLAUCKAS, *et al.*, 2005; THIEL *et al.*, 1999).

Nossos resultados mostram que de um modo geral, tanto ratos como ratas do grupo estressado apresentaram comportamento no campo aberto compatível com ansiedade. Quando comparamos machos e fêmeas, observamos que as fêmeas estressadas obtiveram resultados positivos para ansiedade em um maior número de parâmetros avaliados (4 de 6) enquanto que nos machos apenas 3 parâmetros tiveram resultados significativos para ansiedade. A diferença entre o grupo controle e grupo estressados foi bem maior nas fêmeas do que nos machos, apesar de existir diferenças estatísticas em ambos. Quando olhamos o efeito da ovariectomia sobre os parâmetros de ansiedade, observamos que as a exploração da zona central (distância da zona central) e a latência da 1ª entrada foi semelhante aos grupos estressados (E e EO), entretanto quando avaliamos os outros parâmetros como: *self grooming* e imobilidade, observa-se que existem diferenças entre as fêmeas ovariectomizadas dos grupos E e EO, sugerindo que a diminuição dos níveis de estrógeno ou ausência de ciclo estral influencia na ansiedade em resposta ao estresse emocional.

Sabe-se que diversos tipos de estresse levam a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando a um aumento dos níveis de cortisol circulante. A ativação desse eixo é uma importante resposta ao estresse, sendo necessária a sobrevivência. O cortisol é um hormônio que regula o metabolismo, mantendo a glicemia e pressão arterial, assim como é importante para a resposta cardio-vascular e ativação do sistema nervoso central (SNC), além de modular a resposta imune em situações de estresse. A glândula adrenal quando ativada pelo eixo hipotálamo hipófise (por intermédio do hormônio ACTH) passa a produzir mais colesterol, o qual é precursor dos hormônios esteroides. Além disso, o ACTH tem um efeito trófico

sobre a glândula, podendo causar hiperplasia da mesma, principalmente na zona fasciculada (local de maior concentração dos seus receptores e também da produção de glicocorticoides). A hiperplasia pode ser evidenciada tanto pela alteração do peso bruto da glândula adrenal como pela análise histopatológica da mesma por microscopia ótica. Esse aumento da produção ou captação de colesterol, bem como dos próprios hormônios esteroides pode ser evidenciado histologicamente através da presença de vacúolos lipídicos (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Esses são observados no citoplasma das células colunares da zona fasciculada na forma de espaços brancos, em lâminas de tecidos processados em parafina. O processo de desidratação do tecido para a parafinização acaba por dissolver o conteúdo lipídico, evidenciando esses espaços em branco observados ao microscópio ótico em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Em nosso trabalho foi visto aumento do peso da glândula adrenal nos ratos estressados quando comparados com grupo controle ($p < 0,05$).

Li *et al.* (2011) notaram a mesma alteração do nosso estudo, porém percebeu na 3ª e 5ª semana de estresse emocional. Todavia, esses achados não foram encontrados nas ratas, podendo ser por conta da curta duração do nosso modelo (14 dias) ou por não apresentar alteração. Esse achado também foi encontrado nos estudos de Silveira (2015), Ishikawa *et al.* (1992) e Rosales *et al.* (2002). O cortisol também é um hormônio que altera reserva energética, gordura corporal e a massa magra, assim a avaliação do ganho ponderal é um fator a ser considerado quando esse hormônio está em estudo. Quando avaliamos o ganho ponderal não foi possível mostrar diferença entre os grupos. De fato outros autores, trabalhando com modelos de estresse emocional, também não conseguiram observar diferenças entre animais estressados e normais (SILVEIRA, 2015; ROSALES *et al.*, 2002, HUANG *et al.*, 2011).

A observação e quantificação dos vacúolos lipídicos citoplasmáticos na zona fasciculada as adrenais dos ratos submetidos ao estresse emocional evidencia uma maior presença desses espaços nos grupos estressados, quando comparamos com os grupos controles (não estressados).

Não observamos diferenças entre machos e fêmeas estressadas e nem entre as fêmeas EO e E. O parâmetro que mais diferenciou a presença dos vacúolos foi o fator estresse, não importando o gênero e nem a influência dos hormônios

sexuais. Dessa forma, sugere-se que a resposta do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal ao estresse emocional ocorre de forma alheia aos hormônios sexuais.

Neste estudo evidenciamos, ainda, um aumento na expressão dos receptores D2 no corpo estriado nas ratas estressadas. Em contrapartida, as ratas do grupo ovariectomizadas não apresentaram aumento significativo desse receptor, demonstrando a associação da expressão dos receptores de dopamina com os hormônios sexuais femininos. Nos ratos não foi possível realizar essa a marcação dos receptores D2 devido à falta de recursos financeiros e de tempo, sendo alvo de pesquisas futuras.

Em estudo mais recente Novak *et al.* (2012) demonstraram a importância do receptor D2 da dopamina em modelos de estresse emocional e o aumento de sua expressão no estriado de ratos. Nesse estudo ratos foram submetidos ao estresse por separação materna neonatal e depois ao estresse por imobilização na puberdade, mostrando um aumento da expressão desse receptor, além de algumas vias de sinalização dopaminérgicas no corpo estriado. Os autores associam o aumento desses receptores aos efeitos aditivos que são induzidos pelos agentes estressores, os quais são associados à fisiopatogenia da esquizofrenia.

Outros autores também demonstraram um aumento da expressão de receptores D2 em resposta ao estresse emocional. Said *et al.* (2015) mostraram em modelo de estresse pré-natal o aumento de D2R no núcleo accumbens em resposta ao estresse, Lee *et al.* (2016) demonstraram aumento do D2R no núcleo caudal e putâmen do estriado quando comparados ao ventral em modelo de estresse por separação materna. Sendo assim a avaliação da expressão do D2R em corpo estriado constitui uma ferramenta válida na avaliação dos efeitos estresse emocional em animais (NOVAK *et al.*, 2013).

Como este trabalho é um dos pioneiros, até onde sabemos, na diferenciação do sexo no bruxismo experimental usando um dispositivo móvel para avaliar a hiperatividade muscular mastigatória, tivemos certas dificuldades para comparar os nossos dados com dados da literatura, devendo, por isso, ser necessária a realização de novos estudos nessa área. Acreditamos também, que devido à criação desse dispositivo móvel para realizar a EMG e detectar a hiperatividade muscular mastigatória, novos estudos poderão ser realizados devido a uma maior facilidade metodológica.

7 CONCLUSÃO

- O dispositivo móvel usado para registro eletromiográfico funcionou de forma semelhante ao eletrodo implantado evidenciando uma maior atividade muscular mastigatória em animais estressados;
- Houve diferenças na atividade muscular mastigatória entre machos e fêmeas, com uma maior frequência relativa nas fêmeas;
- Houve diferença intensidade de hiperalgesia nos músculos masseter e temporal principalmente no que diz respeito à cinética onde as ratas tiveram um pico nociceptivo mais precoce do que os machos e os machos tiveram uma duração maior da hiperalgesia principalmente no temporal;
- A ovariectomia modifica a cinética do limiar nociceptivo nas ratas, alterando o pico de nocicepção para o dia 11;
- O aumento da atividade muscular mastigatória correlaciona-se com o limiar nociceptivo, principalmente no músculo masseter, somente nas ratas estressadas.
- Houve correlação positiva entre a atividade muscular mastigatória e a fase do ciclo estral de maior produção de estrógeno;
- Tanto ratos quanto nas ratas, demonstraram comportamento ansioso em resposta ao estresse emocional. A ovariectomia reverteu alguns dos parâmetros de ansiedade;
- Não houve alteração do ganho ponderal nos animais submetidos ao estresse emocional;
- Os ratos estressados apresentaram um aumento do peso bruto das adrenais, mas as fêmeas não;
- Observou-se uma maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos na zona fasciculada de ratos e ratas estressadas, não havendo diferenças relacionadas ao sexo ou castração nas fêmeas;
- Houve uma maior expressão de c-Fos entre ratos e ratas estressados. A ovariectomia inibe esse aumento de expressão nas fêmeas estressadas;
- Houve um aumento da expressão de receptores D2 em corpo estriado do cérebro de ratas estressadas, mas não em fêmeas ovariectomizadas estressadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. M. *et al.* Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. **Experimental Neurology**, v. 211, n. 1, p. 141-149, 2008.
- AGGARWAL, V. R. *et al.* Reviewing the evidence: can cognitive behavioral therapy improve outcomes for patients with chronic orofacial pain? **J Orofac Pain**, v. 24, n. 2, p. 164-171, 2010.
- AHLBERG, J. *et al.* Reported bruxism and stress experience. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 30, n. 6, p. 405-408, 2002.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALAJBEG, I. Z.; ZUVELA, A.; TARLE, Z. Risk factors for bruxism among Croatian navy employees. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 39, n. 9, p. 668-676, 2012.
- ALÓE, F. *et al.* Bruxismo durante o sono. **Rev. Neurociencias**, v. 11, n. 1, p. 4-7, 2003.
- ALOISI, A. M. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. **Clin J Pain.**, v. 19, n. 3, p. 168-174, 2003.
- ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I.; FIORENZANI, P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1007, p. 232-237, 2003.
- ALVAREZ, D. J.; ROCKWELL, P. G. Trigger points: diagnosis and management. **Am Fam Physician.**, v. 65, n. 4, p. 653-660, 2002.
- ALVES-REZENDE, M. C. R. *et al.* Frequência de hábitos parafuncionais: estudo transversal em acadêmicos de odontologia. **Rev. Odontológica de Araçatuba**, v. 30, n. 1, p. 59-62, 2009.
- AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. **International classification of sleep disorders**. 2. ed. Westchester, IL: Diagnostic and coding manual, American Academy of Sleep Medicine, 2005.
- AMORIM, C. F. Eletromiografia de superfície (EMG). *In*: SALGADO, A. S. I. **Eletrofisioterapia manual clínico**. São Paulo: Andreoli, 2013. p. 241-250.
- ATTANASIO, R. An overview of bruxism and its management. **Dent Clin North Am.**, v. 41, n. 2, p. 229-241, 1997.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Clinical experimental stress studies: methods and assessment. **Rev Neurosci.**, v. 26, n. 5, p. 555-579, 2015.

BARBOSA, G. A. Bruxism. Masticatory implications and anxiety. **Acta Odontol Latinoam**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2013.

BENDER, S. D. Orofacial pain and headache: a review and look at the commonalities. **Curr Pain Headache Rep.**, v. 18, n. 3, p. 400, 2014.

BEREITER, D. A.; OKAMOTO, K. Neurobiology of estrogen status in deep craniofacial pain. **Int Rev Neurobiol.**, v. 97, p. 251-284, 2011.

BERNHARDT, O. *et al.* Risk factors for headache, including TMD signs and symptoms, and their impact on quality of life. Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Quintessence Int.**, v. 36, n. 1, p. 55-64, 2005.

BERNHARDT, O. *et al.* Risk factors for high occlusal wear scores in a population-based sample: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Int. J. Prosthodont.**, v. 17, n. 3, p. 333-339, 2004.

BIONDI, A. M.; CORTESE, S. G.; OLIVER, L. Factores asociados con bruxismo en niños y su prevalencia. **Bol. Asoc. Argent. Odontol. Niños**, v. 32, n. 2, p. 9-13, 2003.

BOTELHO, A. L. **Avaliação da fadiga neuromuscular por meio da análise de frequência do sinal eletromiográfico de sujeitos controle e pacientes acometidos por disfunção temporomandibular tratados com placa oclusal resiliente e rígida.** 2012. 89 f. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics.** 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

CAIRNS, B. E. *et al.* Influence of sex on reflex jaw muscle activity evoked from the rat temporomandibular joint. **Brain Res.**, v. 957, n. 2, p. 338-344, 2002.

CAIRNS, B. E.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Characteristics of glutamate-evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. **J Neurophysiol.**, v. 85, n. 6, p. 2446-2454, 2001.

CAMON, V. A. A. **Psicossomática e a psicologia da dor.** 2. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2012.

CAMPOS, K. F. C. *et al.* Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behav. Brain Res.**, v. 240, n. 1, p. 160-170, 2013.

CARVALHO, S. C. A. *et al.* Associação entre bruxismo e estresse em policiais militares. **Revista Odonto Ciências**, v. 23, n. 2, p. 125-129, 2008.

CATHOMAS, F. *et al.* The translational study of apathy-an ecological approach. **Front Behav Neurosci.**, v. 9, p. 241, 2015.

- CHAPMAN, A. R. *et al.* Is running less skilled in triathletes than runners matched for running training history? **Med Sci Sports Exerc.**, v. 40, n. 3, p. 557-565, 2008.
- CIANCAGLINI, R.; GHERLONE, E. F.; RADAELLI, G. The relationship of bruxism with craniofacial pain and symptoms from the masticatory system in the adult population. **J Oral Rehabil.**, v. 28, n. 9, p. 842-848, 2001.
- CLARK, D. A.; BECK, A. T. **Terapia cognitiva para os transtornos de ansiedade: ciência e prática.** Porto Alegre: Artmed, 2012.
- CLARK, G. T.; RAM, S. Four oral motor disorders: bruxism, dystonia, dyskinesia and drug-induced dystonic extrapyramidal reactions. **Dent Clin North Am.**, v. 51, n. 1, p. 225-243, 2007.
- CLEMENTE, J. T. *et al.* Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. **Neurosci Lett.**, v. 372, n. 3, p. 250-255, 2004.
- COELHO, J. P. S. *et al.* Bruxismo do sono e sua associação com distúrbios do sono em policiais. **Ciênc Odontol Bras.**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2009.
- CONTI, P. C. R. *et al.* Orofacial pain and temporomandibular disorders – the impact on oral health and quality of life. **Braz Oral Res.**, v. 26, n. esp. 1, p. 120-123, 2012.
- CRAFT, R. M.; MOGIL, J. S.; ALOISI, A. M. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. **Eur J Pain**, v. 8, n. 5, p. 397-411, 2004.
- DANTAS, A. M. **Os nervos cranianos: estudo anatomoclínicos.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005.
- DEKON, S. F. C. *et al.* Reabilitação oral em paciente portador de parafunção severa. **Rev Odonto Araçatuba**, v. 24, n. 1, p. 54-59, 2003.
- DENADAI-SOUZA, A. *et al.* 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.
- DINIZ, M. B.; SILVA, R. C.; ZUANON, A. C. C. Bruxismo na infância: um sinal de alerta para odontopediatras e pediatras. **Rev. Paul. Pediatr.**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 329-334, 2009.
- DOUGLAS, C. R. **Tratados de fisiologia aplicada à saúde.** 5. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2002.
- DUNCAN, P. W. *et al.* Management of adult stroke rehabilitation care: a clinical practice guideline. **Stroke**, v. 36, n. 9, p. e100-e143, 2005.
- ENOKA, R. M. *et al.* Unraveling the neurophysiology of muscle fatigue. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 21, n. 2, p. 208-219, 2011.

FILLINGIM, R. B. *et al.* Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **J Pain.**, v. 10, n. 5, p. 447-485, 2009.

FILLINGIM, R. B.; EDWARDS, R. R.; POWELL, T. The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses. **Pain.**, v. 83, n. 3, p. 419-425, 1999.

FISCHER, C. A. *et al.* Fatores preditores de malignidade em neoplasias de células de Hurthle. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 35, n. 4, p. 221-224, 2008.

FISCHER, L.; CLEMENTE, J. T.; TAMBELI, C. H. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. **J Pain**, n. 8, v. 5, p. 437-442, 2007.

FISSMER, J. F. W. *et al.* Relação entre ansiedade e bruxismo em acadêmicos de odontologia. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 37, n. 1, p. 25-29, 2008.

FROT, M.; FEINE, J. S.; BUSHNELL, M. C. Sex differences in pain perception and anxiety. A psychophysical study with topical capsaicin. **Pain.**, v. 108, n. 3, p. 230-236, 2004.

GAUMOND, I.; ARSENAULT, P.; MARCHAND, S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. **Brain Res.**, v. 958, n. 1, p. 139-145, 2002.

GAZI, M. C. *et al.* Comparison of acupuncture to injection for myofascial trigger point pain. **Pain Pract.**, v. 11, n. 2, p. 132-138, 2011.

GIANNAKOPOULOS, N. N. *et al.* Anxiety and depression in patients with chronic temporomandibular pain and in controls. **J Dent**, v. 38, n. 5, p. 369-376, 2010.

GIMENES, M. C. M. Bruxismo: aspectos clínicos e tratamentos. **Portal da Educação**, 1º jan. 2008. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/odontologia/bruxismo-aspectosclinicos-e-tratamento/2909>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

GOMES, L. M.; BIANCHINI, E. M. G. Caracterização da função mastigatória em crianças com dentição decídua e dentição mista. **Rev. CEFAC**, v. 11, s. 3, p. 324-333, 2009.

GÓMEZ, F. M. *et al.* Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. **J Oral Rehabil.**, v. 37, n. 11, p. 827-833, 2010.

GONÇALVES, B. M. **Uso da toxina botulínica em odontologia**. 2013. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GONÇALVES, L. P. V.; TOLEDO, O. A.; OTERO, S. A. M. Relação entre bruxismo, fatores oclusais e hábitos bucais. **Dental Press J Orthod**, v. 15, n. 2, p. 97-104, 2010.

- GUI, M. S. **Estudo da dor facial e da atividade eletromiográfica de músculos mastigatórios em portadores de fibromialgia e distúrbios do sono, com diagnóstico de disfunção temporomandibular**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2011.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HERRERA, M. *et al.* Bruxism in children: effect on sleep architecture and daytime cognitive performance and behavior. **Sleep**, v. 29, n. 9, p. 1143-1148, 2006.
- HOOK, J. N.; VALENTINER, D. P. Are specific and generalized social phobias qualitatively distinct? **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 9, n. 4, p. 379-395, 2002.
- HUANG, F. *et al.* Psychological stress induces temporary masticatory muscle mechanical sensitivity in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- INSANA, S. P. *et al.* Community based study of sleep bruxism during early childhood. **Sleep Medicine**, v. 14, n. 2, p. 183-188, 2013.
- ISHIKAWA, M. *et al.* Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box. **Physiol Behav.**, v. 52, n. 3, p. 475-480, 1992.
- JAMES, F. R. *et al.* Epidemiology of pain in New Zealand. **Pain.**, v. 44, n. 3, p. 279-283, 1991.
- KAMIYA, Y. *et al.* Increased mandibular condylar growth in mice with estrogen receptor beta deficiency. **J Bone Miner Res.**, v. 28, n. 5, p. 1127-1134, 2013.
- KAMPE, T. *et al.* Personality traits in a group of subjects with long-standing bruxing behavior. **J Oral Rehabil.**, v. 24, n. 8, p. 588-593, 1997.
- KATO, T. *et al.* Masseter EMG activity during sleep and sleep bruxism. **Arch Ital Biol.**, v. 149, n. 4, p. 478-491, 2011.
- KAZLAUCKAS, V. *et al.* Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 2, p. 272-278, 2005.
- KELLEY, A. E.; LANG, C. G.; GAUTHIER, A. M. Induction of oral stereotypy following amphetamine microinjection into a discrete subregion of the striatum. **Psychopharmacology**, v. 95, n. 4, p. 556-559, 1988.
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- KONRAD, P. **The ABC of EMG: a practical introduction to kinesiological electromyography**. Boston: Noraxon EMG & Sensor Systems, 2005.

- KUBO, K.; IINUMA, M.; CHEN, H. Mastication as a stress-coping behavior. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- LAVIGNE, G. J. *et al.* Bruxism physiology and pathology: an overview for clinicians. **J Oral Rehabil.**, v. 35, n. 7, p. 476-494, 2008.
- LAVIGNE, G. J.; MANZINI, C. Bruxism. *In*: KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. (Eds.). **Principles and practice of sleep medicine**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 773-785.
- LEE, A. G. *et al.* Striatal dopamine D2/3 receptor regulation by stress inoculation in squirrel monkeys. **Neurobiol Stress.**, v. 3, p. 68-73, 2016.
- LERESCHE, L. *et al.* Musculoskeletal orofacial pain and other signs and symptoms of temporomandibular disorders during pregnancy: a prospective study. **J Orofac Pain**, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2005.
- LERESCHE, L. *et al.* Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. **Pain.**, v. 69, n. 1-2, p. 153-160, 1997.
- LI, Q. *et al.* Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. **Physiol Behav.**, v. 104, n. 3, p. 365-372, 2011.
- LOBBEZOO, F. *et al.* Bruxism and genetics: a review of the literature. **J Oral Rehabil.**, v. 41, n. 9, p. 709-714, 2014.
- LOBBEZOO, F.; NAEIJE, M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. **J Oral Rehabil.**, v. 28, n. 12, p. 1085-1091, 2001.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. **The estrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley, CA: University of California Press, 1922. v. 6.
- LUCINDA, L. B. *et al.* Evaluation of the prevalence of stress and its phases in acute myocardial infarction in patients active in the labor market. **Rev Bras Cir Cardiovasc.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 1, p. 16-23, 2015.
- LUZ, J. G.; MARAGNO, I. C.; MARTIN, M. C. Characteristics of chief complaints of patients with temporomandibular disorders in a Brazilian population. **J Oral Rehabil.**, v. 24, n. 3, p. 240-243, 1997.
- MACEDO, C. R. *et al.* Occlusal splints for treating sleep bruxism (tooth grinding). **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 18-27, 2007.
- MACIEL, R. N. **Bruxismo**. São Paulo: Artes Médicas, 2010.
- MANDL, A. M. The phases of the o estrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, n. 4, p. 576-584, 1951.
- MANFREDINI, D. *et al.* Epidemiology of bruxism in adults: a systematic review of the literature. **J Orofac Pain.**, v. 27, n. 2, p. 99-110, 2013.

MARCHETTI, P. H.; UCHIDA, M. C. Effects of the pullover exercise on the pectoralis major and latissimus dorsi muscles as evaluated by EMG. **J Appl Biomech.**, v. 27, n. 4, p. 380-384, 2011.

MARKLUND, S.; WÄNMAN, A. Incidence and prevalence of myofascial pain in the jaw-face region. A one-year prospective study on dental students. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 2, p. 113-121, 2008.

MASCARO, M. B. *et al.* Forebrain projections to brainstem nuclei involved in the control of mandibular movements in rats. **Eur J Oral Sci.**, v. 117, n. 6, p. 676-684, 2009.

MASCARO, M. B. *et al.* O complexo trigeminal e as desordens da motricidade mandibular. **ConScientiae Saúde**, v. 7, n. 4, p. 449-456, 2008.

MAYER, P.; HEINZER, R.; LAVIGNE, G. Sleep bruxism in respiratory medicine practice. **Chest**, v. 49, n. 2, p. 1-38, 2015.

MENZANI, G.; BIANCHI, E. R. F. Stress dos enfermeiros de pronto socorro dos hospitais brasileiros. **Rev. Eletr. Enf.**, v. 11, n. 2, p. 327-333, 2009.

MERLETTI, R. *et al.* Technology and instrumentation for detection and conditioning of the surface electromyographic signal: state of the art. **Clin Biomech**, v. 24, n. 2, p.122-134, 2009.

MIKAMI, D. B. A review of psychogenic aspects and treatment of bruxism. **J Prosthet Dent.**, v. 37, n. 4, p. 411-419, 1977.

MOLINA, O. F. *et al.* Bruxism as mechanism subserving hysteria: a new theory. **Rev Neurocienc.**, v. 16, n. 4, p. 262-268, 2008.

MOLINA, O. F. *et al.* Uma análise crítica dos sistemas de classificação sobre o bruxismo: implicações com o diagnóstico, severidade e tratamento dos sinais e sintomas de DTM associados com o hábito. **JBA**, v. 2, n. 5, p. 61-69, 2002.

MORALES, A. *et al.* Testosterone Deficiency Syndrome (TDS) needs to be named appropriately – the importance of accurate terminology. **Eur Urol.**, v. 50, n. 3, p. 407-409, 2006.

NAKATA, A. *et al.* Perceived psychosocial job stress and sleep bruxism among male and female workers. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 36, n. 3, p. 201-209, 2008.

NALIBOFF, B. D. *et al.* Sex-related differences in IBS patients: central processing of visceral stimuli. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1738-1747, 2003.

NASCIMENTO, A. M. *et al.* Associação do bruxismo ao estresse emocional: estudo transversal. **RBO**, v. 66, n. 2, p. 160-164, 2009.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. Trad.+ Jacques Vissoky. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NITSCH, G. S. *et al.* Propriedades clinimétricas da variável eletromiográfica duty factor para desordem temporomandibular. **Audiol. Commun. Res.**, v. 20, n. 1, p. 69-75, 2015.

NOVAK, G. *et al.* Postnatal maternal deprivation and pubertal stress have additive effects on dopamine D2 receptor and CaMKII beta expression in the striatum. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 31, 2013, p. 189-195, 2013.

NOVAK, M. J. *et al.* Altered brain mechanisms of emotion processing in pre-manifest Huntington's disease. **Brain.**, v. 135, n. 4, p. 1165-1179, 2012.

OKAMOTO, K. *et al.* Response properties of TMJ units in superficial laminae at the spinomedullary junction of female rats vary over the estrous cycle. **J Neurophysiol.**, v. 89, n. 3, p. 1467-1477, 2003.

OKESON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. Trad. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

PAESANI, A. **Bruxism: theory and practice**. London: Quintessence, 2010.

PANKAJ, S. *et al.* Myofascial pain-dysfunction syndrome. **IJMRD**, v. 2, n. 2, p. 649-652, 2015.

PARK, I. H. *et al.* Electromyographic power spectrum of jaw muscles during clenching in unilateral temporomandibular joint. **J Oral Rehabil**, v. 39, n. 9, p. 659-67, 2012.

PASTANA, S. G.; COSTA, S. M.; CHIAPPETTA, A. L. M. L. Análise da mastigação em indivíduos que apresentam mordida cruzada unilateral na Faixa-etária e 07 a 12 anos. **Revista CEFAC**, v. 9, n. 3, p. 351-357, 2007.

PETERSON, L. J. *et al.* **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

PETIT, O. *et al.* Dyssomnias and parasomnias in early childhood. **Pediatrics**, v. 119, n. 5, p. 1016-1025, 2007.

PIERSON, M. J. Changes in temporomandibular joint dysfunction symptoms following massage therapy: a case report. **Bodywork**, v. 4, n. 4, p. 37-47, 2011.

PIQUERO, K.; SAKURAI, K. A clinical diagnosis of diurnal (non-sleep) bruxism in denture wearers. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 27, n. 6; p. 473-482, 2000.

PIZZOL, K. E. D. C. *et al.* Bruxismo na infância: fatores etiológicos e possíveis tratamentos. **Rev Odontol UNESP**, v. 35, n. 2, p. 157-163, 2006.

POHTO, P. Experimental aggression and bruxism in rats. **Acta Odontol Scand.**, v. 37, n. 2, p.117-126, 1978.

QUESADA, G. A. T. *et al.* Neuralgia trigeminal – do diagnóstico ao tratamento. **Revista Dentística on line**, ano 5, n. 11, p. 46-54, 2005.

RAMFJORD, S. P. Bruxism, a clinical and electromyographic study. **J Am Dent Assoc.**, v. 62, p. 21-44, 1961.

REFULIO, Z. *et al.* Association among stress, salivary cortisol levels, and chronic periodontitis. **J Periodontal Implant Sci.**, v. 43, n. 2, p. 96-100, 2013.

RIES, L. G. K. *et al.* Associação da atividade mastigatória com a função motora ampla, espasticidade e classificação topográfica na paralisia cerebral. **Rev. CEFAC**, v. 15, n. 6, p. 1533-1539, 2013.

RILEY, J. L. 3rd.; GILBERT, G. H. Orofacial pain symptoms: an interaction between age and sex. **Pain.**, v. 90, n. 3, p. 245-256, 2001.

ROCHA, A. P. F.; NARDELLI, M. R.; RODRIGUES, M. F. Epidemiologia das desordens temporomandibulares: estudo da prevalência da sintomatologia e sua inter-relação com idade e o sexo dos pacientes. **Rev Serviço ATM-FO/ UFJF**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 2002.

RODRIGUES, C. K. *et al.* Bruxismo: uma revisão de literatura. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 12, n. 3, p. 13-21, 2006.

ROSALES, V. P. *et al.* Emotional stress and brux-like activity of the masseter muscle in rats. **Eur J Orthod.**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2002.

SADIR, M. A.; LIPP, M. N. Influência do treino de controle do estresse nas relações interpessoais no trabalho. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 131-140, 2013.

SAID, N. *et al.* Prenatal stress induces vulnerability to nicotine addiction and alters D2 receptors' expression in the nucleus accumbens in adult rats. **Neuroscience**, v. 304, p. 279-285, 2015.

SANTOS, A. C.; SILVA, C. A. B. Eletromiografia de superfície de músculos masséters e temporais com percentual de uso durante a mastigação em candidatos à gastroplastia. **ABCD Arq Bras Cir Dig.**, v. 29, supl. 1, p. 48-52, 2016.

SANTOS, A. F.; ALVES JÚNIOR, A. Estresse e estratégias de enfrentamento em mestrandos de ciências da saúde. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 20, n. 1, p. 104-113, 2007.

SANTOS, E. B. *et al.* Estresse percebido nos idosos sobreviventes do AVC após a alta hospitalar para casa. **Rev. Esc. Enferm. USP**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 797-803, 2015.

SATO, C. *et al.* Bruxism affects stress responses in stressed rats. **Clin Oral Investig.**, v. 14, n. 2, p. 153-60, 2010.

SCHMID-SCHWAP, M. *et al.* Sex-specific differences in patients with temporomandibular disorders. **J Orofac Pain.**, v. 27, n. 1, p. 42-50, 2013.

SELMs, M. K. *et al.* Craniomandibular pain, oral parafunctions and psychological stress in a longitudinal case study. **J Oral Rehabil.**, v. 31, n. 8, p. 738-745, 2004.

SENNA, E. R. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD Approach. **J Rheumatol.**, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004.

SERAIDARIAN, P. I.; JACOB, M. F.; SERAIDARIAN, P. Mecanismos neurológicos envolvidos na gênese do bruxismo. **JBA**, Curitiba, v. 2, n. 7, p. 240-246, 2002.

SERRA-NEGRA, J. M. *et al.* Prevalence of sleep bruxism in a group of brazilian schoolchildren. **Eur Arch Paediatr Dent.**, v. 11, n. 4, p. 192-195, 2010.

SERRA-NEGRA, J. M. *et al.* Relationship between tasks performed, personality traits, and sleep bruxism in brazilian school children: a population-based cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80075, 2013.

SHIMIZU, K. *et al.* 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.

SILVEIRA, S. S. **Avaliação da atividade muscular mastigatória, nocicepção associada e participação do sistema endocanabinoide no comportamento bruxismo-símile em ratos.** 2015. 109 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behav Brain Res.**, v. 229, n. 1, p. 289-300, 2012.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 1, n. 4, p. 329-334, 2001.

THIEL, C. M. *et al.* High versus low reactivity to a novel environment: Behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience**, v. 93, n. 1, p. 243-251, 1999.

THILANDER, B. *et al.* Prevalence of temporomandibular dysfunction and its association with malocclusion in children and adolescents: an epidemiologic study related to specified stages of dental development. **Angle Orthod.**, v. 72, n. 2, p. 146-54, 2002.

THOMAZ, E. B. A. F.; CANGUSSU, M. C. T.; ASSIS, A. M. O. Malocclusion and deleterious bucal habits among adolescents in a developing area in northeastern Brazil. **Braz Bucal Res.**, v. 27, n. 1, p. 62-69, 2013.

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.

VANDERAS, A. P. *et al.* Urinary catecholamine levels and bruxism in children. **Journal of Oral Rehabilitation**, 1999, v. 26, p. 103-110.

WARREN, M. P.; FRIED, J. L. Temporomandibular disorders and hormones in women. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 3, p. 187-192, 2001.

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

WIESENFELD-HALLIN, Z. Sex differences in pain perception. **Gender Medicine**, v. 2, n. 3, p. 137-145, 2005.

WINOCUR, E. *et al.* Self-reported bruxism – associations with perceived stress, motivation for control, dental anxiety and gagging. **J Oral Rehabil.**, v. 38, n. 1, p. 3-11, 2011.

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.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



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 48/2014, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR MASTIGATÓRIA E NOCICEPÇÃO NO BRUXISMO EXPERIMENTAL EM RATOS: CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENÇAS ENTRE MACHOS E FÊMEAS.”**, 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 5 de junho de 2014.

Fortaleza, 5 de junho de 2014

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