

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MÔNICA DA CONSOLAÇÃO CANUTO SALGUEIRO

**“AVALIAÇÃO DA FORÇA DE MORDIDA E CORTISOL SALIVAR EM
CRIANÇAS COM BRUXISMO APÓS O USO DO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA EM ACUPONTOS – ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO E
RANDOMIZADO”**

São Paulo, SP

2017

MÔNICA DA CONSOLAÇÃO CANUTO SALGUEIRO

“AVALIAÇÃO DA FORÇA DE MORDIDA E CORTISOL SALIVAR EM CRIANÇAS COM BRUXISMO APÓS O USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM ACUPONTOS - ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO E RANDOMIZADO”

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de doutora em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Kalil Bussadori

São Paulo, SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Salgueiro, Mônica da Consolação Canuto.

S164a Avaliação da força de mordida e cortisol salivar em crianças com bruxismo após o uso do laser de baixa potência em acupontos – estudo clínico controlado e randomizado. /Mônica da Consolação Canuto Salgueiro-São Paulo,SP:[s.n],2017.

107p.: il.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sandra Kalil Bussadori.
Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho

1.Bruxismo. 2. Criança. 3.cortisol saliva . 4. Acupuntura. 5.laser.I.
Bussadori,Sandra Kalil.II.Universidade Nove de Julho.III.Título.

CDU 615.8

São Paulo, 08 de dezembro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Mônica da Consolação Canuto Salgueiro

Título da Tese: "Avaliação da força de mordida e cortisol salivar em crianças com bruxismo antes e após o uso de laser de baixa potência em acupontos - Estudo clínico controlado e randomizado"

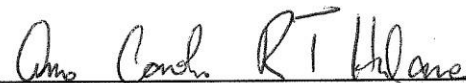
Presidente: PROF^a. DR.^a SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROF^a. DR.^a LARA JANSISKI MOTTA



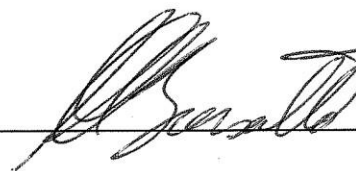
Membro: PROF^a. DR.^a ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI



Membro: PROF^a. DR.^a JUNIA MARIA CHEIB SERRA-NEGRA



Membro: PROF^a. DR.^a. MARIA CRISTINA BORSATO



DEDICATÓRIA

“Assim que você pensar que sabe como são realmente as coisas, descubra outra maneira de olhar para elas”

Robin Williams

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à Deus por ter chegado até aqui.

A minha família principalmente aos meus pais que sempre souberam que esse era o caminho.

Ao meu marido Max, por me apoiar e estimular sempre. Obrigada por compartilhar os meus ideais.

As minhas filhas, Ana Sofia e Maria Victória, que sempre motivaram, estimularam e entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão.

A minha querida orientadora e amiga que carinhosamente chamo de coach, Dra. Sandra Kalil Bussadori, por todo conhecimento transmitido, por todo carinho, apoio, paciência e incentivo. O conhecimento transmitido foi, é e será útil além da odontologia.

Aos professores do programa de Doutorado, em especial, às Prof^a Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari e Prof^a Dr^a Kristianne Porta dos Santos Fernandes, por todo carinho e ensinamentos .

Agradeço a querida professora Lara Motta pelos apontamentos deste trabalho na parte estatística.

A Fernanda Kobayashi desejo um lindo presente e futuro na pesquisa.

Agradeço a todos os participantes dessa pesquisa, sem vocês ela não poderia ter tomado forma.

Aos professores da Clínica infantil da UNINOVE durante o estágio supervisionado.

A todos os companheiros do doutorado pelos momentos e ideais compartilhados.

Agradeço a UNINOVE pela oportunidade de realização do doutorado e a experiência dos módulos internacionais.

A Capes pela bolsa concedida durante este período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte técnico, científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho. Processo-2015/24731-0.

RESUMO

O bruxismo em crianças é um desafio na clínica odontológica infantil, uma vez que esse distúrbio provoca danos estruturais importantes nas estruturas mastigatórias comprometendo o crescimento e desenvolvimento da face. Atualmente, o uso da placa de mordida é o tratamento de escolha para proteger os desgastes da estrutura dental, porém não resolve a causa. O uso do laser de baixa potência é indicado por promover efeito analgésico. A laserpuntura desempenha uma importante função, pois os acupontos quando estimulados corretamente aumentam na circulação sanguínea os neurotransmissores como ocitocina e noradrenalina. Assim, esta pesquisa objetiva estabelecer um modelo clínico para avaliar a força de mordida e a quantidade de cortisol salivar presente em crianças com bruxismo, pré e pós aplicação do laser de baixa potência nos acupontos. Por meio de um estudo clínico controlado randomizado, 76 crianças entre 6 à 12 anos foram divididas em 4 grupos: G1- Laser em acupontos (n=19), G2-Placa oclusal (n=19), G3-Placebo (n=19) e G4-Acompanhamento- sem bruxismo. O diagnóstico de bruxismo foi feito por meio do relato dos responsáveis através de um questionário e examinando clinicamente a presença de facetas de desgastes. Os dados foram analisados com o programa SPSS 20.0 (IBM) Os resultados obtidos referentes aos dados antes dos tratamentos empregados, evidenciam uma ausência de correlação significativa entre a presença do bruxismo e cefaleia ($p = 0.3485$, Qui-quadrado), bruxismo e facetas de desgastes ($p =$ bruxismo e mordiscado ($p = 0.5323$, chi-quadrado). A força de mordida é equivalente em ambos os lados do paciente para todos os grupos ($p > 0.05$, t-teste pareado para todos os grupos) e a força de mordida média é invariante em função do grupo estudado, mostrando, portanto que todos os grupos estão balanceados em relação à força de mordida antes do tratamento ($p > 0.05$, ANOVA). Em relação ao nível de cortisol observou-se equivalência em todos os grupos estudados inicialmente ($p > 0.05$, t- teste). Após a terapia da laserpuntura aplicada observou se uma diminuição na força de mordida no grupo G1- laser acupontos e aumento do cortisol em todos os grupos. A fotobiomodulação demonstrou ter ação em pacientes com BS e a dosagem do biomarcador sofreu influência do estressor agudo.

Palavras-chave; Bruxismo. Laser. Acupuntura. Criança. Cortisol Salivar.

ABSTRACT

The bruxism in children is a challenge in the odontological clinic for children, since this disorder causes important structural damages in the masticatory structures compromising the growth and development of the face. Currently, the use of the bite plate is the treatment of choice to protect the wear of the dental structure, but it does not solve the cause. The use of the low power laser is indicated to promote analgesic effect. Laserpuncture plays an important role because acupoints when properly stimulated increase neurotransmitters such as oxytocin and noradrenaline in the bloodstream. Thus, this research aims to establish a clinical model to evaluate the bite force and amount of salivary cortisol present in children with bruxism, pre and post application of low power laser in acupoints. In a randomized controlled clinical study, 76 children aged 6 to 12 years were divided into 4 groups: G1- Laser in acupoints (n = 19), G2-Occlusal plate with expander (n = 19), G3-Placebo = 19) and G4-Follow-up without bruxism. The diagnosis of bruxism was made through the report of those responsible through a questionnaire and clinically examining the presence of facets of wear. The data obtained were analyzed using the SPSS 20.0 program (IBM). The results obtained with respect to the data before the treatments used showed a lack of significant correlation between the presence of bruxism and headache ($p = 0.3485$, chi-square), bruxism and facets ($p = 0.5323$, chi-square). The bite force is equivalent on both sides of the patient for all groups ($p > 0.05$, paired t-test for all groups) and The mean bite force is invariant as a function of the studied group, showing that all groups are balanced with respect to bite force before treatment ($p > 0.05$, ANOVA). In relation to the cortisol level, equivalence was observed in all ($p > 0.05$, t-test) .Application of laser therapy showed a decrease in bite force in the group G1-laser acupoints and increase of cortisol in all groups. or to have action in patients with BS and that the dosage of the biomarker was influenced by the acute stressor.

Keywords: Bruxism. Child. Bite force. Acupuncture. Laser. Salivary Cortisol.

SUMÁRIO

Lista de tabelas e quadros	10
Lista de figuras	11
Lista de abreviaturas.	12
Contextualização	13
Objetivos.	27
Metodologia.....	28
Resultados	40
Estudo I	
Introdução	40
Resultados	40
Discussão.....	40
Conclusão	40
Estudo II	
Introdução	40
Resultados.	41
Discussão.....	44
Conclusão	46
Considerações finais	47
Referências bibliográficas	51
Apêndices.....	57
Artigo 1	58
Artigo 2	81
Anexos	95

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Resumo da condição experimental

Quadro 2: Estudos mais recentes sobre Diagnóstico de Bruxismo do Sono

Quadro 3: Diário para preencher durante 5 dias seguidos

Tabela 1 : Associação entre bruxismo, marcas de mordida, idade e gênero

Tabela 2 : Associação da cefaleia reportada pelos participantes, antes e após os tratamentos

Tabela 3 : Análise de força de mordida antes e após o tratamento em todos os grupos

Tabela 4 : Níveis de cortisol salivar antes e após tratamento nos diferentes grupos estudados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tamanho amostral total

Figura 2 - Fluxograma

Figura 3- Dinamômetro Digital Modelo DMD

Figura 4-Ponto **IG-4 (Hegu)**

Figura 5-Ponto **F-3 (Taichong)**

Figura 6- Ponto **VB-34 (Yanglingquan)**

Figura 7- Ponto **E-36 (Zusanli)**

Figura 8 - Ponto **ID-19 (Tinggong)**

Figura 9- Ponto **BP-6 (Sanyinjiao)**

Figura 10- Parâmetros utilizados

Figura 11- Força de mordida do lado esquerdo

Figura 12- Força de mordida do lado direito

Figura 13- Níveis de cortisol antes do tratamento

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

LBI: Laser de Baixa Intensidade

DTM: Disfunção Temporomandibular

REM: Rapid Eye Movement

ANOVA: Análise de variância

TENS: Estimulação Neuromuscular Transcutânea

MENS: Estimulação Neural Elétrica por Microcorrente

BS: Bruxismo do Sono

nm: nanômetros

cm: centímetro

ATP: Adenosina Trifosfato

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PO: Placa Oclusal

FM: Força de Mordida

ICSD-3: Critérios internacional de Distúrbios do Sono

ASMS: American Academy of Sleep Medicine

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Bruxismo

O bruxismo é considerado como uma atividade repetitiva da musculatura mastigatória, atividade essa caracterizada pelo ranger dos dentes e/ou segurar ou impulsionar a mandíbula^{1,2,8,27,28}. Pode ser classificado como primário ou secundário, sendo o primário aquele no qual não há uma causa médica evidente, sistêmica ou psiquiátrica, e o bruxismo secundário aquele associado a um transtorno clínico, neurológico, psiquiátrico, fatores iatrogênicos ou outro transtorno do sono^{1,3}. Pode ocorrer durante o sono ou em vigília. Respondendo a expressões circadianas distintas, dependendo do momento da ocorrência da atividade. O bruxismo diurno é caracterizado por uma atividade da mandíbula, de apertar os dentes enquanto o indivíduo se encontra acordado, já o bruxismo do sono é uma atividade inconsciente de ranger ou apertar os dentes, enquanto o indivíduo encontra-se dormindo^{1,3,5}. A etiologia do bruxismo é multifatorial, podendo ser de origem sistêmica, psicológica, ocupacional, hereditária ou ainda estar relacionada a distúrbios do sono e parassomias^{4,5}, sendo esse distúrbio amplamente associado com estresse e ansiedade⁶.

Embora a frequência do bruxismo na infância seja elevada, variando de 13 a 35,3%,^{7,8,24,27,28} e a presença desse distúrbio possa causar danos ao sistema estomatognático, existem poucos estudos na literatura que relatem quaisquer tratamentos durante esta fase. Atualmente, a fisioterapia vem sendo utilizada no tratamento deste⁵. Entre as técnicas fisioterapêuticas mais utilizadas estão: a estimulação neuromuscular transcutânea (TENS), estimulação neural elétrica por microcorrente (MENS), terapia de resfriamento (crioterapia), ultrassom, terapia de infravermelho, cinesioterapia, massoterapia e laser^{9,10}.

Estudos sugerem que o bruxismo pode predispor ou perpetuar dor nos músculos mastigatórios, ruído e dor nas articulações temporomandibulares (ATM), limitações na abertura bucal, dificuldade para mastigar, degenerações na ATM, cefaleia do tipo tensional, desgastes nos dentes⁹⁻¹². Sobre a musculatura, o bruxismo, pode provocar o aumento no tônus e na atividade muscular, sobretudo o masseter¹³.

As crianças podem desenvolver esse ato repetitivo da musculatura mastigatória precocemente, prejudicando o equilíbrio entre função e crescimento. Entre todos os distúrbios que podem alterar o crescimento do complexo crânio-facial, o bruxismo em especial, pode causar danos à ATM, aos músculos, ao periodonto e a oclusão^{4,14-16}.

Entende-se por força máxima de mordida a capacidade dos músculos elevadores da mandíbula de exercer um esforço máximo dos dentes inferiores contra os superiores em condições favoráveis à saúde de suas estruturas. A mensuração dessas forças exerce papel importante no diagnóstico dos distúrbios que afetam o sistema estomatognático^{17,18}. Dentre os vários métodos de mensuração desenvolvidos para a avaliação da força de mordida estão os gnatodinamômetros e os transdutores de força¹⁸.

Como o componente psicológico é frequentemente relacionado ao bruxismo, a avaliação de níveis de estresse e ansiedade parece ser um modo importante de se obter informações em torno desse distúrbio, assim como sobre as terapias utilizadas para controle do mesmo. Um método que tem se mostrado bastante eficaz para medir o estresse e a ansiedade é a quantificação do cortisol na saliva¹⁹. Sabe-se que a ansiedade e o estresse estimulam a secreção desse hormônio pela glândula supra-renal^{19,20}. Mc Cartan et al. (1996), encontraram correlação positiva entre ansiedade e a concentração de cortisol salivar, sendo esse um método confiável e não-invasivo que determina situações estressantes. Neste sentido, essa análise pode determinar situações estressantes independente da origem psicológica, física ou ambiental²¹⁻²⁵.

No caso de pacientes com bruxismo do sono o plano de tratamento deve buscar a redução da tensão física, muscular e psicológica, tratamento dos sinais e sintomas e o rompimento do padrão neuromuscular habitual, e por apresentar etiologia complexa uma abordagem multiprofissional se faz necessária, compreendendo a utilização em conjunto ou isolada de fisioterapia, farmacoterapia, terapias odontológicas e terapia psicológica^{26,27}.

O método diagnóstico mais eficiente, considerado o padrão ouro para diagnóstico do bruxismo do sono é a polissonografia, que registra os episódios eletromiográficos da musculatura mastigatória no padrão típico de bruxismo, conhecido como “atividade muscular rítmica mastigatória” (RMMA), fornecendo

o mapeamento preciso dos episódios da parafunção e avaliando a qualidade de sono do paciente. No entanto, algumas limitações, como custo financeiro, tempo, resultados não representativos pelo fato do paciente não estar em ambiente familiar e, particularmente em crianças, a cooperação para o exame pode ser comprometida ^{8,11,12,28}.

Segundo o critério do consenso internacional de pesquisadores da área, o diagnóstico do bruxismo acordado ou do sono pode ser considerado “possível” quando houver o auto relato, por meio de questionários e/ou anamnese, “provável” quando houver o auto relato associado ao exame clínico e “definitivo” quando houver o auto relato associado ao exame clínico e polissonografia ^{1,24,28}.

O critério de diagnóstico recomendado pela *American Academy of Sleep Medicine* determina que para ser considerado bruxomano, o indivíduo deve apresentar presença de ruídos de ranger dos dentes durante o sono e pelo menos uma das seguintes características: desgaste dental anormal, sons associados ao bruxismo e dor na musculatura mastigatória ⁴, e ainda pode ser classificado quanto a severidade como leve, quando os episódios não ocorrem todas as noites, não existem evidências de lesão dental ou prejuízo psicossocial; moderado, quando os episódios ocorrem todas as noites e com evidências de alterações psicossociais leves; severo, quando os episódios ocorrem todas as noites, com evidências de lesão dental, desordens temporomandibulares, e outras lesões, além de graves prejuízos psicossociais.

O bruxismo infantil é de difícil diagnóstico, não tem tratamento estabelecido e todo e qualquer conhecimento na área é considerado importante para auxiliar o tratamento em crianças.

1.2. Linha Alba

A Linha Alba é uma linha de hiper queratinização de coloração branca localizada na mucosa jugal paralela à linha de oclusão, relacionada a áreas dentárias, provavelmente associada a pressão, irritação por fricção, ou trauma por sucção da mucosa entre as superfícies vestibulares dos dentes ⁸. A alteração consiste em uma linha branca, geralmente bilateral. Pode ser franzida, sendo localizada na mucosa jugal, ao nível do plano oclusal dos dentes adjacentes. A linha varia em proeminência e é restrita a áreas dentadas. Frequentemente, é

mais pronunciada em áreas adjacente aos dentes posteriores. A Linha Alba deve ser avaliada e levada em questão para o fechamento de um diagnóstico mais completo, pois trata-se de um sinal associado ao hábito de sucção e de bruxismo^{7,8,11,61}.

Em crianças o diagnóstico de bruxismo deveria estar baseado não apenas no relato dos pais como também na avaliação clínica e presença de alguns sinais e sintomas, como a presença de desgastes dental e/ou presença de Linha Alba nas bochechas, língua mordiscada, presença de cansaço e relato de dor na região da face/temporas, para que sejam selecionadas a melhor abordagem no diagnóstico e conseqüentemente o tratamento^{8,9,10}.

1.3. Morsicatio Buccarum-Bochecha Mordiscada

O Morsicatio buccarum é o termo científico para mastigação crônica da bochecha. Morsicatio vem da palavra latina morsus ou morder. Mordiscadas crônicas produzem lesões, localizadas mais frequentemente na mucosa jugal; entretanto, a mucosa labial (morsicatio labiorum) e o bordo lateral da língua (morsica linguarum) também podem estar envolvidos. Alterações semelhantes têm sido observadas como resultado de sucção, pacientes com bruxismo do sono, cuja atividade muscular produz irritação crônica da mucosa jugal. Uma prevalência mais alta tem sido encontrada em pessoas sob estresse ou que exibem alterações psicológicas¹⁶.

A maioria dos pacientes tem consciência dos seus hábitos, embora muitos não afirmem a injúria ou realizem o ato inconscientemente. Ao exame clínico, as lesões nos pacientes com mordiscado são mais frequentemente encontradas bilateralmente, na mucosa jugal^{8,9}. Também podem ser unilaterais, combinadas com lesões dos lábios ou da língua, ou isoladas nos lábios ou língua. Áreas brancas espessadas e fragmentadas, ocasionalmente, estão combinadas com zonas interpostas de eritema, erosão, ou ulceração traumática focal. As áreas de mucosa branca mostram uma superfície dilacerada e irregular. A mucosa alterada localiza-se tipicamente na porção média da mucosa jugal anterior, ao longo do plano oclusal.

Histopatologicamente, a biopsia revela uma extensa hiperparaqueratose que, frequentemente, resulta numa superfície extremamente dilacerada, com numerosas projeções de queratina. A colonização bacteriana superficial é típica. Ocasionalmente, grupos de células vacuolizadas estão presentes na porção superficial da camada celular espinhosa. Tal padrão histopatológico não é patognomônico de morsicatio e pode produzir uma espantosa semelhança com a leucoplasia pilosa oral, lesão que ocorre mais frequentemente em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana. Também podem ser observadas semelhanças com a linha Alba e o Leucoedema. Não é necessário tratamento das lesões orais. Nenhuma complicação origina-se pela presença das alterações da mucosa⁴⁵.

Para os pacientes que desejarem tratamento, uma proteção acrílica, que cobre as superfícies vestibulares dos dentes, pode ser confeccionada, a fim de eliminar as lesões, por restringir o acesso à mucosa jugal e labial. Vários autores também sugerem a psicoterapia como o tratamento de escolha, porém nenhum estudo extenso e controlado mostrou benefícios desta terapia.

1.4. Cefaleia

A cefaleia consiste em qualquer dor referida no segmento cefálico, sendo uma manifestação extremamente comum. As cefaleias podem ser divididas em primárias e secundárias. Dentre as cefaleias primárias temos as cefaleias tensionais, que são as mais comumente encontradas em crianças, muitas vezes provocada por contratura muscular prolongada. Costuma ser bilateral, com predominância temporal, occipital ou frontal, podendo originar uma dor constante, com característica de aperto ou pressão, muitas vezes podendo envolver a cabeça, dando a sensação de “capacete”⁵.

As cefaleias estão entre as causas mais comuns para se buscar atendimento médico, sendo que a cefaleia do tipo tensional é a mais frequente em adultos³⁵. As queixas de cefaleias são comuns na infância e na adolescência. Estudos relatam que a prevalência pode variar de 40,7% a 82,9%¹³⁻¹⁶, sendo que ocorre um aumento diretamente proporcional a idade, na qual crianças com

7 anos apresentam uma prevalência de 39% e aos 14 anos esse valor sobe para 69%⁶⁸. Quando paciente busca o atendimento com a queixa de “dor de cabeça”, o exame detalhado é que mostra ser uma cefaleia por tensão do músculo temporal desencadeada por apertamento dental parafuncional, associada ou não a alterações posturais e emocionais, ou outras de origem central. Dentre as cefaleias primárias temos as enxaquecas e as cefaleias tensionais, que são as mais comumente encontradas em crianças⁷. São comuns na população geral e potencialmente representam a somatização de vários estímulos convergindo no sistema nervoso central, sendo a sensitização e estimulação do gânglio trigeminal parte importante na fisiopatologia da cefaleia e das dores faciais. A relação entre o sono e cefaleia é claramente complexa e extensa. Distúrbios do sono como a falta ou excesso de sono, assim como as mudanças no horário de dormir, podem ser um gatilho para ataques de enxaqueca ou cefaleia do tipo tensional⁵. Certos tipos de cefaleia parecem estar relacionadas com estágios do sono, por exemplo, a enxaqueca tem sido associada ao excesso de sono REM, assim como a enxaqueca severa e crônica em crianças tem sido associadas a curtos períodos de sono e baixa quantidade de sono REM^{26,27}. Estudos sugerem que disfunções dos músculos cervicais e mastigatórios estão associados com um aumento na prevalência de cefaleia do tipo tensional^{5,6}. Uma significativa associação entre o bruxismo do sono e enxaqueca crônica em adultos, e relataram que 83,3% dos pacientes com bruxismo do sono apresentam alguma cefaleia. Indivíduos com cefaleia do tipo tensional apresentam uma diminuição no número de horas dormidas, além de frequentes despertares⁷.

Na literatura científica, alguns estudos fazem relação entre a presença de bruxismo e cefaleia, porém, em revisão sistemática realizada sobre a associação entre bruxismo do sono e cefaleia tensional e enxaqueca, constatou-se que não existem evidências suficientes sobre esses dados em crianças, mas que adultos com bruxismo do sono parecem ser mais suscetíveis a ter cefaleias⁵.

1.5. Desgaste Oclusal

Os sinais e sintomas mais frequentes do bruxismo sono são os desgastes dentários, danos às restaurações, edentação da língua e/ou bochecha mordiscada, hipertrofia dos músculos masseter e temporal, fadiga na musculatura da face, rigidez na face ao acordar (às vezes associado com

dificuldade de movimentação da boca)^{4,14}. Em alguns pacientes o bruxismo parece estar associado a um fator de risco para à DTM como dor principalmente na região das têmporas e próximo ao ouvido ¹¹.

Embora o desgaste dentário seja amplamente relatado na literatura como o sinal dental clássico do bruxismo de vigília e do sono , ele pode estar relacionado a muitos outros fatores que podem induzir desgaste e erosão nas superfícies dentárias (por exemplo, idade, oclusão condições, características do esmalte, dieta, bebidas carbonatadas, medicações, xerostomia, refluxo gastroesofágico e distúrbios alimentares)^{3,4,7,15}. Entretanto Huynh et al. (2016), demonstrou recentemente que o desgaste dos dentes não pode ser usado como critério absoluto para avaliar a gravidade do SB: nenhuma diferença no grau de desgaste dentário foi encontrado entre baixa e alta frequência de contrações musculares em adultos jovens com SB^{11,12}.

No entanto, Casett et al (2017), comenta que nenhum desses sinais e sintomas constituem prova direta do diagnostico definitivo do bruxismo se não estiverem associados a polissonografia, porém o relato é importante sempre.

Lobbezoo et al.(2013), considera os desgastes dentários como sendo um critério de diagnóstico para bruxismo em vigília. Porém, é muito difícil definir quando o desgaste dentário é uma consequência de uma atividade funcional ou de um hábito parafuncional. Esta dificuldade é mais acentuada quando se observa a dentição decídua, em que o desgaste das superfícies do dente é fisiológico. Nesta perspectiva, existe controvérsia sobre a correlação entre o bruxismo e a presença de desgaste dentário ^{2,3}.

Restrepo et al em 2016, sugere que na literatura o bruxismo deveria basear-se em conceitos muito claros e objetivos e apresentar uma definição separada para bruxismo infantil do sono e de vigília e um diagnóstico de fácil análise.

1.6. Cortisol Salivar

O cortisol salivar é um importante biomarcador do estresse fisiológico ¹⁹. Sua dosagem foi escolhida devido à sua praticidade, aceitação e confiabilidade²⁰

A produção do cortisol tem um ritmo circadiano dependente da produção de ACTH, com concentrações de pico pela manhã e diminuição à noite. Deste

modo, o hormônio cortisol, prepara o organismo para a vigília e a interação ativa com o meio ambiente. Existe uma variação rítmica circadiana endógena, quando se realiza a dosagem plasmática de diversos hormônios, entre eles o hormônio cortisol, em que se observa uma variação entre os valores mínimos e máximos, ao longo das 24 horas. O hormônio cortisol tem seu pico máximo de produção e secreção no final da noite de sono, precedendo o despertar ²¹.

A dosagem de cortisol na saliva proporciona um método fidedigno para avaliar a função adrenal, além de alterações como ansiedade, hiperatividade e déficit de atenção ²².

Os glicocorticóides são essenciais para a vida. Eles permitem se adaptar às alterações externas e ao estresse²³. O cortisol (hidrocortisona, composto F) é o glicocorticóide mais potente produzido pelo córtex adrenal humano é responsável por aproximadamente 95% de toda a atividade glicocorticóide do organismo ²³.

O cortisol é conhecido por estimular a gliconeogênese para garantir um suprimento adequado de substrato; aumentar a mobilização de ácidos graxos livres, tornando-os mais disponível como fonte energética; diminuir a utilização de glicose, poupando-a para o cérebro; estimular o catabolismo proteico para liberar aminoácidos para o uso na reparação, na síntese de enzimas e na produção de energia; atuar como um agente antiinflamatório e aumentar a vasoconstrição causada pela adrenalina ²²⁻²⁵.

É excretado na urina na forma livre, no plasma sanguíneo e na saliva. Dosagens de cortisol salivar são um excelente indicador de cortisol livre ou do cortisol biologicamente ativo no soro humano ²³⁻²⁵. A dosagem de cortisol na saliva fornece várias vantagens sob as dosagens em soro ou plasma. As coletas das amostras para dosagem de cortisol na saliva não são invasivas e nem de alto custo, além disso, são fáceis de serem realizadas em crianças ^{20,21,28}. Múltiplas amostras podem ser coletadas em vários lugares, não necessariamente em laboratório²², oferecendo um modo conveniente de coleta seriada em diferentes períodos do dia^{23-25, 29}. Quando um organismo é exposto a uma situação de estresse, termina produzindo hormônios como adrenalina e cortisol (hormônios do estresse), que são responsáveis por diversas mudanças no corpo, como aumento da pressão arterial, da capacidade pulmonar, da atividade cerebral e força de contração cardíaca^{18,20,21}.

1.7. Fotobiomodulação

A fotobiomodulação laser é uma modalidade de tratamento não invasiva que vem sendo amplamente utilizada na prática clínica para alívio da dor e regeneração tecidual. De acordo com Hamblin et al. (2010), fototerapia e fotobiomodulação são sinônimos, mas há uma preferência pela terminologia fotobiomodulação e a razão é facilmente ser entendida, pois biomodulação pode significar bioestimular ou bioinibir, a depender das condições do tecido alvo e dos parâmetros dosimétricos da radiação óptica de acordo com. O LBI, atua por meio de fotoativação da célula, determinado pelos efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ou fotofísicos causado pelo laser, sem que aconteça um efeito fototérmico. Entre os efeitos terapêuticos do laser pode-se citar analgesia, estimular a reparação tecidual, reduzir o edema e hiperemia nos processos inflamatórios, modulador da atividade celular, prevenir infecções, além de atuar em parestesias e paralisia⁴⁰⁻⁴³. Uma vez absorvido pelos tecidos, a radiação laser leva à liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, relacionadas com a dor, bem como pode modificar as atividades celulares e enzimáticas, inibindo-as ou estimulando-as^{41,42}. Os lasers de baixa potência possuem efeito eminentemente analgésico, promovendo o alívio de dores de diversas etiologias, incluindo irradiação de pontos gatilho em dor miofacial como meio eficaz de tratamento de dor orofacial, redução de edema e de hiperemia e possui efeito bioestimulador do trofismo celular, promovendo reparação tecidual mais rápida e com padrão de qualidade histológica superior^{42,44}.

A irradiação laser exerce um estímulo sobre as mitocôndrias celulares, provocando um aumento na produção ATP mitocondrial no interior das células e, conseqüentemente, aceleração da mitose, levando a um aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular, eliminando as atividades anaeróbicas ocorridas em um processo inflamatório^{57,58,59}. Outros mecanismos relatados de efeitos benéficos induzidos pela radiação laser incluem a modulação dos níveis de prostaglandinas, o aumento da atividade fibroblástica, a alteração do potencial somato sensorial e da velocidade de condução nervosa, além de melhora da circulação local dos tecidos tratados, levando ao alívio da

dor e reparo tecidual^{57,58}. O alívio da dor justifica-se pela pelo efeito bioelétrico da fotobiomodulação laser devido à eficiência da bomba de sódio e potássio na manutenção do potencial de membrana celular que impede que os estímulos dolorosos se propaguem para os centros nervosos em decorrência da maior disponibilidade de ATP resultante do efeito bioquímico. Ricci R (2003).

Entretanto, para que se obtenha a resposta biológica adequada é necessário atingir a dose ideal de radiação, com o comprimento de onda correto e o número de aplicações suficientes para se produzir o efeito desejado. Portanto, os seguintes parâmetros devem ser observados: escolha do comprimento de onda, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de potência (intensidade), tipo de regime de operação do Laser e número de sessões^{42,45}.

A acupuntura tem sido utilizada com sucesso no tratamento do bruxismo, pois é capaz de reduzir a atividade dos músculos masseter e temporal anterior e auxiliar na redução da ansiedade³⁰. Em crianças não existem estudos para tratar o bruxismo do sono com esta técnica de forma tradicional. A acupuntura é uma técnica milenar, com origem na China, caracterizada pela inserção de agulhas em pontos específicos na pele, com o objetivo específico de cura e prevenção de doenças³¹⁻³⁴.

Existem cerca de 750 pontos de acupuntura ou acupontos³⁵. Os acupontos são regiões da pele com íntima relação com nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteo e cápsulas articulares^{36,37}. A estimulação dos acupontos pode ser realizada através de agulhas, infravermelhos, corrente elétrica ou laser³⁸ e essa estimulação possibilita acesso direto ao sistema nervoso central^{36,37}.

A partir da estimulação de certos pontos pode-se alterar a dinâmica da circulação sanguínea e também promover o relaxamento muscular, sanando os espasmos e diminuindo a inflamação e a dor. Além disso, essa estimulação pode promover a liberação de hormônios como o cortisol e endorfinas, promovendo analgesia³⁹.

A terapia a laser em pontos de acupuntura foi eficaz para o tratamento de vários problemas orofaciais encontrados na odontologia, mas ainda há muitas

diferenças entre os parâmetros utilizados para a irradiação e há uma falta de informações importantes relatadas pelo estudos, como o comprimento de onda, dose, densidade de potência, tempo e frequência de irradiação, pontos de acupuntura selecionados para efeitos de irradiação e terapia, sendo bem indicada para pacientes sensíveis, crianças e idosos, por ser indolor e por apresentar um menor tempo de aplicação sobre o acuponto ⁴⁰⁻⁴².

1.8. Laser de baixa potência

O uso da laserterapia de baixa potência proporciona um tratamento não invasivo e de baixo custo, que tem se mostrado benéfico para tratamento da dor relacionada às alterações orofaciais ⁴⁰⁻⁴³. É uma radiação situada na porção visível do espectro das ondas eletromagnéticas entre o infravermelho e o ultravioleta, e o comprimento da onda depende da substância estimulada ⁴¹. Mais conhecido como laser terapêutico, sua densidade de energia oferecida não é capaz de ultrapassar o limiar de sobrevivência da célula. Ele induz a célula à biomodulação, isto é, não só estimulação, mas também supressão de processos biológicos: ela procurará restabelecer o estado de normalização da região afetada^{44,45}.

Entre os efeitos terapêuticos do laser pode-se citar analgesia, estimular a reparação tecidual, reduzir o edema e hiperemia nos processos inflamatórios, modulador da atividade celular, prevenir infecções, além de atuar em parestesias e paralisia ⁴⁰⁻⁴³.

Visto que o laser de baixa potência nos tecidos irradiados tem contribuição favorável para o alívio da dor, por suas ações analgésicas e antiinflamatórias, sua aplicação clínica se torna extremamente relevante e sua utilização é praticamente inevitável^{41,42}. Os lasers de baixa potência possuem efeito eminentemente analgésico, promovendo o alívio de dores de diversas etiologias, incluindo irradiação de pontos gatilho em dor miofacial como meio eficaz de tratamento de dor orofacial, redução de edema e de hiperemia e possui efeito bioestimulador do trofismo celular, promovendo reparação tecidual mais rápida e com padrão de qualidade histológica superior ⁴².

A ação do laser na analgesia ocorre devido à maior liberação de

endorfinase, encefalinas (opioides endógenos) e ao aumento da microcirculação. Portanto, a utilização dos lasers em baixa intensidade deve ser considerada de forma relevante, já que demonstrou ser capaz de aliviar a dor sem comprometer demais sistemas⁴⁴. Portanto, lasers de baixa intensidade diminui a inflamação e, como consequência, a sensibilidade à dor, além de estimular a circulação e a atividade celular com o potencial de aumentar a produção de ATP mitocondrial, e causar um aumento no limiar de excitabilidade das terminações nervosas livres que resultam no efeito analgésico.

Entretanto, para que se obtenha a resposta biológica adequada é necessário atingir a dose ideal de radiação, com o comprimento de onda correto e o número de aplicações suficientes para se produzir o efeito desejado. Portanto, os seguintes parâmetros devem ser observados: escolha do comprimento de onda, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de potência (intensidade), tipo de regime de operação do Laser e número de sessões^{42,45}.

1.9. Placa Oclusal

A placa oclusal tem como objetivo reduzir a atividade parafuncional, desprogramar e induzir ao relaxamento muscular, obter uma proteção dos dentes contra a atrição e desgaste⁴⁶, balanceio dos contatos oclusais, bem como reposicionar a mandíbula, colocando-a em uma relação normal com a maxila para alcançar um equilíbrio neuromuscular Kobayashi et al.(2012). A placa oclusal tem como vantagem não interferir no processo de crescimento das arcadas dentárias infantis ou alterar as suas características físicas, além de ser um tratamento reversível, de boa aceitação pelas crianças e eficaz.

De acordo com Solberg et al. (2007), o uso de placa de mordida reduz a atividade muscular, proporcionando maior conforto ao paciente. As placas oclusais parecem reduzir o ranger de dentes, a atividade muscular e a dor orofacial⁴⁸. Apesar das placas oclusais serem amplamente utilizadas para o tratamento do bruxismo, até o momento não foram estabelecidas estratégias específicas ou um tratamento único para minimizar os efeitos causados pelo bruxismo. Por esse motivo, estudos são necessários com o objetivo de determinar o possível tratamento ideal^{46,47}.

1.10. Força de Mordida

A força de mordida é um dos componentes da função mastigatória. É exercida pelos músculos elevadores da mandíbula e é regulada pelos sistemas muscular, neurológico, esquelético e dental em 1895, Black fez um estudo a respeito da força máxima de mordida.

Os valores ditos normais referentes a força de mordida encontrados foram: região dos molares valores de 45 a 99 Kgf e região de incisivos os valores foram bem menores, variando de 14 a 25 Kgf . Em 1991, Kiliaridis e Kålebo verificaram que havia uma relação direta entre a espessura dos músculos mastigatórios e o desenvolvimento da força de mordida, ou seja, quanto maior a espessura do músculo, maior a força de mordida. Afirmaram que a força de mordida era um fator relevante para a função mastigatória e que estava relacionada com a saúde do sistema mastigatório.

A força oclusal máxima é um parâmetro de fácil mensuração. Assim, é um recurso muito utilizado atualmente em pacientes portadores de deformidades dentofaciais, onde é possível obter valores prévios e posteriores ao tratamento¹⁸.

Kogawa et al. (2006) afirmaram não haver conhecimento suficiente dos mecanismos que envolviam as diferenças de valores de força de mordida máxima para indivíduos com dor muscular e alterações na ATM e concluíram que a dor muscular e as alterações na articulação temporomandibular poderiam ter influência na força de mordida máxima.

1.11. Justificativa

O Bruxismo do sono é considerado uma atividade repetitiva da musculatura mastigatória, atividade essa caracterizada pelo ranger dos dentes e/ou apertar ou impulsionar a mandíbula, frequente em crianças, causando desgaste dental, ruído, desconforto e ansiedade. Sendo assim, medidas de controle e tratamento devem ser tomadas pelos profissionais. Baseado na ênfase que se tem dado às medidas preventivas em relação às doenças e alterações que possam causar danos ao desenvolvimento fisiológico infantil, se torna necessário o empenho de profissionais no controle e tratamento de bruxismo em crianças, o uso do laser de baixa potência é indicado por promover

efeito analgésico (MARINI et al., 2010). A acupuntura desempenha importante função, pois os acupontos quando estimulados corretamente aumentam na circulação sanguínea os neurotransmissores como ocitocina e noradrenalina (DALLANORA et al., 2004). A dosagem de Biomarcadores como cortisol salivar tem se tornado cada vez mais comum por ser de fácil utilização, manuseio e não ser invasivo (GUNNAR; DONZELLA, 2002) e está associado a ansiedade e ao estresse que poderia alterar o comportamento do paciente. Assim sendo, esta pesquisa objetiva estabelecer um modelo clínico para avaliar a força de mordida e do cortisol salivar em crianças com bruxismo do sono, pós aplicação do laser de baixa potência em acupontos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a força de mordida e níveis de cortisol salivar, pós terapia com laser de baixa intensidade nos acupontos em crianças com provável bruxismo do sono.

2.2. Específico

Estudo I - Evaluation of muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism before and after low level laser applied to acupoints: study protocol for a randomised controlled trial. (publicado na BMC)

- **Estabelecer um protocolo para análise da força de mordida e o cortisol salivar em crianças com bruxismo do sono, após aplicação do laser de baixa potência nos acupontos**

Estudo II - Evaluation of stress biomarkers levels in saliva, muscle strength and clinical signs in a randomized controlled trial photobiomodulation therapy in children with sleep bruxism.(Submetido para publicação no periódico PLOS ONE)

- **Avaliar em um estudo clínico controlado e randomizado se o uso da placa e a terapia de fotobiomodulação em crianças com bruxismo do sono houve alguma alteração.**

3. METODOLOGIA

Este estudo consistiu em um ensaio clínico, controlado, randomizado. Seguiu as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos com submissão e aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Nove de Julho parecer de número 1.333.636 e CAAE 49730215.2.0000.5511. O Clinical Trials/ NCT02757261. Os participantes ou responsáveis assinaram o termo de assentimento e consentimento livre respectivamente, após esclarecimentos para autorização da participação na pesquisa (Anexo 1/ Anexo 2). Esses indivíduos foram selecionados no ambulatório da Clínica Infantil da Universidade Nove de Julho e convidados a participar da pesquisa voluntariamente .

3.1.1. Cálculo para determinar o tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi especificado, pelo pesquisador, que o aumento no desvio padrão das respostas a partir da qual se deseja rejeitar a hipótese é de $P=20\%$. Nestas condições, adotando um nível máximo de significância $\alpha = 0,05$ e, no mínimo, um poder de teste de 80% , assim o n foi $n=15,75$, assumindo uma perda amostral de 20% , portanto o número de repetições em cada grupo é de 19 sujeitos (totalizando $19 \times 4 = 76$ sujeitos).

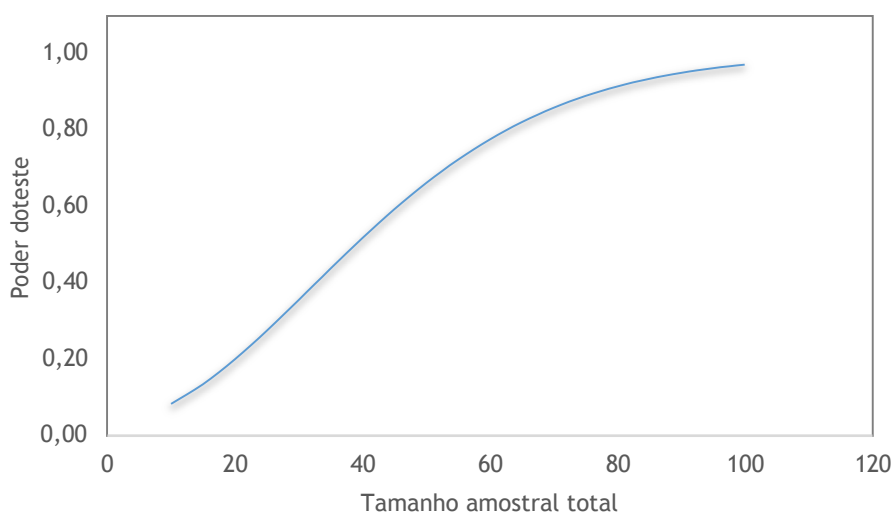


Figura 1. Tamanho amostral total

3.2. Sujeitos da Pesquisa

3.2.1. Critérios de exclusão

Foram excluídos desta pesquisa, sujeitos que faziam uso de medicamentos miorelaxantes, que apresentassem disfunção temporomandibular e que realizassem outra terapia para bruxismo, que não a da pesquisa.

3.2.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo crianças de 6 a 12 anos sem limitações físicas ou psíquicas que poderiam comprometer a realização da terapia, de ambos os sexos sem distinção de raça e que apresentem os 1^{os} molares em Classe I de Angle com ausência de lesões de cárie. O critério clínico de desgaste dental e o questionamento aos pais ou responsáveis foram utilizados para o diagnóstico do bruxismo nos participantes. Eram consideradas bruxistas as crianças que apresentarem: indicação por parte dos pais da ocorrência de ranger os dentes, desgaste incisal e/ou oclusal dos elementos dentais, seguindo os critérios da American Academy of Sleep Medicine (AASM)¹ e do questionário validado por Serra Negra et al. em 2014, para avaliação do Bruxismo⁵¹ e uma revisão sistemática realizada por Manfredini et al. 2013²⁴ (Anexo 3 e 4). Foram avaliadas 264 crianças de ambos os gêneros que frequentavam a clínica infantil da UNINOVE, após os critérios de inclusão estabelecidos selecionamos para o estudo 76 crianças sendo 35 do gênero masculino e 41 do gênero feminino. O critério clínico de desgaste dental e o questionamento aos pais ou responsáveis foram utilizados para o diagnóstico do bruxismo nos participantes. Foram consideradas bruxistas as crianças que apresentaram: relato por parte dos pais da ocorrência de apertamento ou sons audíveis, desgaste incisal e/ou oclusal dos elementos dentais, seguindo os critérios da American Academy of Sleep Medicine (AASM)¹. Os sujeitos selecionados foram divididos em 4 grupos, conforme descrito no quadro 1. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação da força de mordida com gnatodinamômetro, e avaliação do cortisol salivar, antes e após a intervenção terapêutica. A randomização foi realizada usando o Microsoft Excel (versão 2013). Setenta e seis pacientes foram

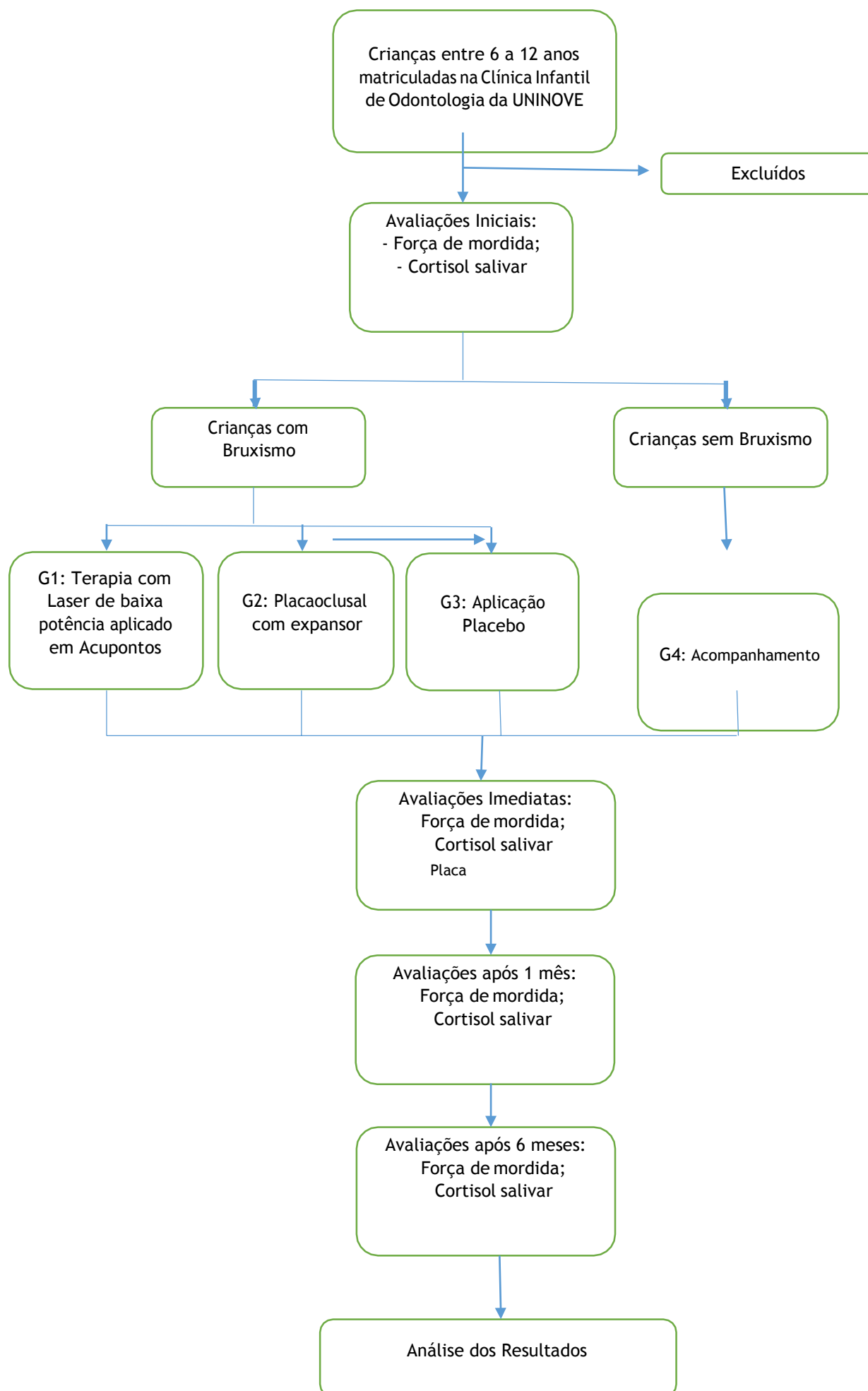
alocados aleatoriamente para os quatro grupos. A randomização foi realizada em bloco (grupos de quatro pacientes). Setenta e seis envelopes opacos foram identificados com números seqüenciais (1 a 76) e cada um continha informações sobre o grupo correspondente seguindo a ordem aleatória estabelecida. Os envelopes foram selados até o momento do tratamento.

Quadro 1: Resumo da condição experimental

Grupo	N	Intervenção Terapêutica
1	19	Laser em Acupontos
2	19	Placa oclusal com expansor
3	19	Aplicação Placebo
4	19	Acompanhamento/Sem Bruxismo

Por se tratar de um estudo clínico controlado e buscando uma maior transparência e qualidade dessa pesquisa, foi utilizado nesta dissertação as recomendações CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).

Figura 2: Fluxograma CONSORT



3.3. Protocolo de avaliação da força de mordida utilizando Dinamômetro.

Para a obtenção das forças de mordida foi utilizado o Dinamômetro Digital Modelo DMD (Kratos Equipamentos Industriais Ltda. Cotia, SP) adaptado para as condições bucais (FIG. 3). Esse aparelho é um instrumento de medição de força eletrônico, composto por um garfo de mordida e um corpo digital, interligados por um fio. As mensurações foram realizadas na região de 1º molar que apresentaram os primeiros molares em Classe I de Angle, por ser a neutro oclusão e com ausência de lesões de cárie. Os participantes receberam orientações e treinamento prévio para se familiarizarem com o dispositivo. Segundo a literatura específica, nesta faixa etária a abertura bucal em crianças oscila entre 35 e 40mm. O dinamômetro digital utilizado, com capacidade de até 100Kg/f, adaptado às condições bucais, provido de duas hastes, cujo diâmetro é de aproximadamente 10 mm, sendo adequado para garantir uma abertura bucal que não interfira na força empregada, evitando o estiramento muscular.

Foram realizados 6 registros, sendo 3 do lado esquerdo e 3 do lado direito, alternando os lados durante as medições. A medição foi realizada durante 5 segundos, e entre cada medição era realizado um repouso de 1 minuto. Foram realizadas uma avaliação antes do início do tratamento, uma após o término e outros 30 dias após a finalização do tratamento. Os resultados foram computados e analisados estatisticamente.



Figura 3: dinamômetro digital modelo DMD adaptado para as condições bucais.

3.4. Protocolo de utilização da placa oclusal

A placa oclusal superior foi confeccionada em resina incolor acrílica e usada na maxila com cobertura palatal e oclusal. Impressões dos arcos maxilar

e mandibular foram feitas com alginato, vazados em gesso pedra e montados no articulador semi-ajustável. A placa foi construída em cera (duas camadas de cera rosa) e adaptada sobre os dentes da maxila. A placa apresentava 3mm de espessura, contato de todos os dentes em relação cêntrica, distoclusão dos dentes posteriores em lateralidade e protusão, evitando interferências no lado de balanceio com a guia canina estendendo se na região vestibular à lingual o suficiente para prevenir a perfuração e aumentar a resistência ao impacto foi colocado também um expansor, para que o mesmo possa ser utilizado para acompanhar a dinâmica do crescimento. Seguindo o protocolo de Hachmann et al⁴⁶. As crianças usaram somente a noite por 2 meses com ajustes semanais. Era realizada a ativação em ¼ de volta apenas quando havia necessidade, ou seja, quando apresentava falta de retenção e estabilidade da dispositivo no arco.

3.5. Protocolo de avaliação do cortisol salivar

Para determinação do estresse foram mensurados os níveis de cortisol salivar no 1º dia e no 60º dia. As coletas foram realizadas observando as seguintes condições: para o estudo do ritmo circadiano do cortisol foram coletadas duas amostras de saliva, na casa dos participantes com horário estipulado em 9 horas da manhã e antes de dormir, respeitando 1 hora de jejum, seguida de higiene bucal com água. A coleta era realizada no domingo de acordo com a orientação e armazenamento seguindo as recomendações do fabricante e era entregue na segunda feira para análise na Universidade Nove de Julho.

A saliva foi coletada em swabs, que consiste de um pequeno rolo de algodão em uma haste de plástico envolto em um tubo de plástico (Salivettes®). A haste permanecia na boca durante dois minutos. O algodão era subsequentemente colocados num outro tubo de centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos e os debrís descartados, somente o sobrenadante foi utilizado; sendo logo após armazenadas as amostras à -20°C até a análise²⁵. Na análise bioquímica, os Salivettes® foram centrifugados e a dosagem dos níveis de cortisol se deu através do kit Enzimaimunoensaio (Salimetrics®, EUA), a temperatura ambiente (25°C). No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas em geladeira e centrifugadas novamente. As amostras foram incubadas durante 60 minutos e em seguida colocadas nos respectivos sítios na

placa. A análise foi realizada por meio de leitura da absorvância da solução, utilizando-se leitora de microplacas ajustada em 450 nm.

3.6. Protocolo de aplicação do laser de baixa potência

Para o tratamento com laser e o tratamento placebo foi utilizado o aparelho Therapy EC da empresa DMC.

A criança ficava sentada confortavelmente na cadeira odontológica em ambiente sem ruídos ou interferências sonoras, posicionado com o plano de Frankfurt paralelo ao solo. A ponta do laser era revestida com plástico transparente (evitando contaminações cruzada e por motivo de higiene) era realizada limpeza facial prévia do local a ser irradiado com álcool 70%.

Foram realizadas 12 sessões de laser no total, sendo 2 sessões por semana, utilizando laser com comprimento de onda de 786,94 nm, com ponta convencional, densidade de energia de 1 J/cm², intensidade de 1,675 mW/cm², potência de 70mW (0,070W), durante 20 segundos por ponto. Foi utilizado o método de aplicação pontual, em contato com a pele e com a ponta, considerando desta maneira a área de 0,04 cm² conforme protocolo sugerido por Carvalho et al⁵⁰ e Venezian et al⁴⁴.

Para analisar a potência média real do equipamento de aplicação de laser de baixa intensidade e as doses terapêuticas aplicadas durante a utilização clínica, foi utilizado um potenciômetro para verificação e segurança do operador.

Dos 4 grupos, 1 recebeu tratamento com laser e 1 tratamento placebo. Foi utilizado o método de aplicação pontual, em contato com a pele, sendo que as aplicações foram somente nos seguintes acupontos³³:

No tratamento placebo será utilizado o mesmo equipamento, aplicado nos mesmos pontos com uma caneta que apresenta luz guia vermelha e aviso sonoro, mas que não emite energia nos mesmos pontos. Após o acompanhamento de 6 meses, os voluntários receberam tratamento complementar para o controle do bruxismo.

- **IG-4 (hegu)** –No lado radial, entre o 1º e o 2º osso metacarpal, esse ponto tem uma influência direta e forte sobre a face, olhos, orelhas, nariz e boca.

Também é utilizado para acalmar a mente e aliviar ansiedade.

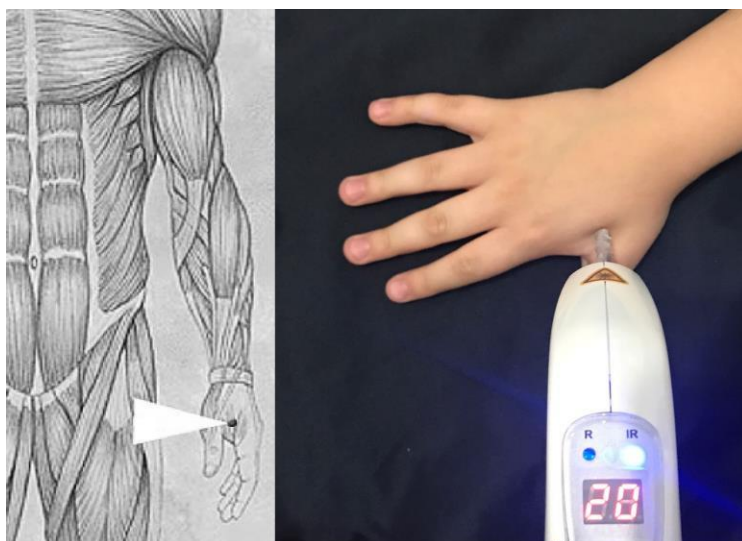


Figura 4-Ponto **IG-4 (hegu)**

- **F-3 (taichong)** – Na depressão entre o 1º e o 2º metatarsos, próximos às bases metatarsais exerce um profundo efeito calmante sobre a mente. Sua ação calmante é aumentada quando combinado com IG-4.



Figura 5-Ponto **F-3 (taichong)**

- **VB-34 (yanglingquan)** – Na depressão anterior e inferior da cabeça da fíbula é um ponto importante para relaxar os tendões sempre que há contrações dos músculos.

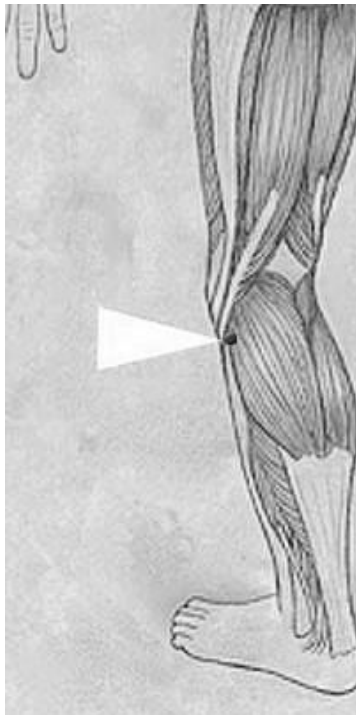


Figura 6- Ponto **VB-34 (yanglingquan)**

- **E-36(zusanli)** – 3 cun* abaixo da patela, 0,5 cun* lateral à margem anterior da tíbia. Indicado para tratar a irritabilidade, depressão, insônia, cansaço, fadiga e cefaleia.

Figura 7- Ponto **E-36 (zusanli)**

- **ID-19 (tinggong)** – Numa depressão anterior à orelha acima do tragus

indicado para tratar problemas na região do ouvido e disfunção da ATM.

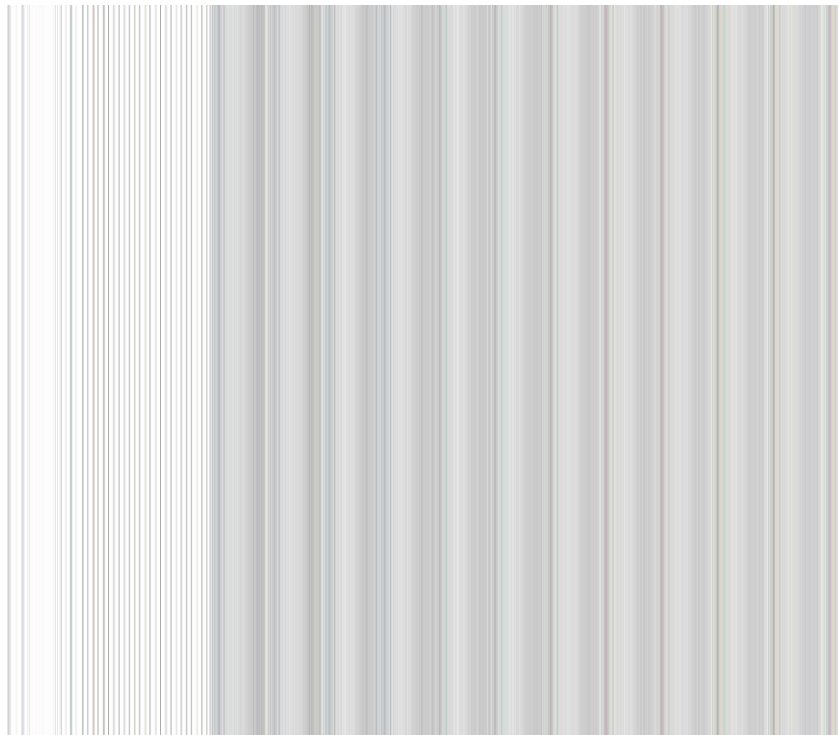


Figura 8 - Ponto **ID-19 (tinggong)**

- **BP-6 (sanyinjiao)** – 3 cun acima da proeminência do maléolo medial, na margem posteromedial da tíbia. Esse é um dos pontos mais importantes, com ampla esfera de ação. Apresenta uma ação calmante forte sobre a mente, sendo em geral utilizado para insônia.

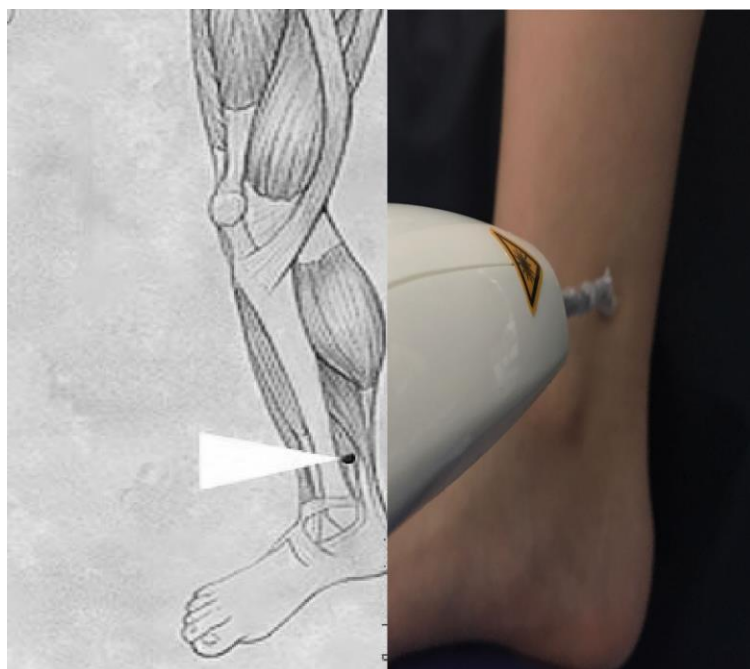


Figura 9- Ponto **BP-6 (sanyinjiao)**

	Laser Infra-Vermelho
Comprimento de onda central (nm)	786,94
Largura espectral FWHM (nm)	0,65
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência máxima média (mW)	100 mW
Polarização	Random
Diâmetro de abertura (cm)	0,6 cm
Irradiância na abertura (mW/cm ²)	3571mw/cm ²
Perfil do feixe	Multimodo
Área do feixe (cm ²)	0,028cm ²
Irradiância no alvo (mW/cm ²)	3,571mW/cm ²
Tempo de exposição (s)	10s por ponto
Exposição Radiante (J/cm ²)	35
Energia Radiante(J)	1J
Números de pontos irradiados	12
Área irradiada (cm ²)	0,336
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	12 / 2 vezes por semana
Energia Total Irradiada (J)	144

Figura 10 - Parâmetros utilizados

3.7. Organização e tratamento estatístico dos dados

Os dados foram tabulados e tratados no programa SPSS /ou bio stat 20.0 for Win e foi realizada a estatística descritiva. Para avaliação da associação das variáveis categóricas foi utilizado o test Qui-quadrado e Exato de Fisher. Para as variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) utilizou-se ANOVA (Análise de Variância) e as que não apresentaram normalidade o teste Kruskal-wallis. Em todas as análise considerou-se um nível de significância de 95% $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo I

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28789647>

Os resultados da presente tese serão apresentados no formato de artigos. O artigo I, intitulado: Evaluation of muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism before and after low level laser applied to acupoints: study protocol for a randomised controlled trial, foi aceito para publicação no periódico BMC Musculoskeletal Disorders e corresponde ao protocolo que foi descrito nos elementos textuais desta tese.

4.2. Estudo II

O artigo II, intitulado: Evaluation of stress biomarkers levels in saliva, muscle strength and clinical signs in a randomized controlled trial photobiomodulation therapy in children with sleep bruxism. Submetido para publicação no periódico PLOS ONE.

4.2.1. Introdução

O Bruxismo do Sono (BS) é uma atividade repetitiva da musculatura caracterizada por aperto e moagem de dentes e ocorre em adultos e crianças¹. Há um tipo que ocorre durante a noite, bruxismo do sono, e há outro que ocorre durante o dia, bruxismo em vigília². Pode ser classificado como primário ou secundário. O diagnóstico de BS em adultos é feito por um exame de polissonografia, no entanto, em crianças não há ainda um protocolo definido³. Assim, um exame clínico completo é importante para diagnosticar BS corretamente.

O BS é frequentemente visto em crianças e adolescentes, com uma prevalência entre 3,5% e 40,6%, dependendo do método de diagnóstico utilizado⁴. A presença do BS na infância pode ser vista como um preditor de SB adulto⁵. Crianças com bruxismo no sono podem ter sintomas adicionais durante o dia, como dores de cabeça, dor de ouvido e dor nos músculos mastigatórios. Segundo Fulgencio et al (2016)¹³, BS em adolescentes também pode ser

associado à fadiga da musculatura mastigatória, dores de cabeça e respiração com ruídos durante o sono.

Os tratamentos BS já foram estudados ⁷. A terapia com Placas Oclusais (PO) é uma escolha considerada padrão ouro, para adultos e crianças⁸. Mas há algumas limitações como cooperação por parte crianças em usá-las. Tratamentos alternativos foram estudados para usar em vez de PO. A fotobiomodulação foi estudada com sucesso em adultos em pontos de acupuntura para Transtorno Temporomandibular (DTM), outra desordem muscular ⁹.

A avaliação desses tratamentos BS pode ser feita por análises morfológicas como, por exemplo, a análise da força muscular ou força de mordida^{10,11}. São relatados bons resultados no desempenho muscular, utilizando a fotobiomodulação em terapias musculares incluindo força ⁹. Outra variável é uma análise fisiológica, utilizando níveis de cortisol salivar. Os níveis de cortisol têm sido utilizados para investigar a resposta ao estresse individual, incluindo distúrbios musculares ¹²

Outros estudos mostram bons resultados em distúrbios musculares com terapia de fotobiomodulação ^{13,15}, porém nenhum deles em pacientes com BS. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar um estudo randomizado e controlado da terapia de fotobiomodulação e terapia de placas oclusais em crianças com bruxismo do sono.

422 Resultados

Ao analisar as possíveis associações entre bruxismo e marcas de mordida na mucosa jugal, dor de cabeça, idade e gênero. Observou se que não houve associação estatisticamente significativa entre gênero, idade e dor de cabeça com a presença de bruxismo. Houve associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre marcas de mordida na mucosa jugal e bruxismo do sono conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Associação entre bruxismo, marcas de mordida, idade e gênero.

		Bruxism		<i>P values</i>
		No	Yes	
Gender	Male	10 (28.6%)	25 (71.4%)	<i>p=0.344</i>
	Female	9 (22.0%)	32 (78.0%)	
Bite marks	No	17 (58.5%)	12 (41.4%)	<i>p<0.001</i>
	Yes	2 (4.3%)	45 (95.7%)	
Headache	No	7 (31.8%)	15 (68.2%)	<i>p<0.381</i>
	Yes	12 (22.2%)	42 (77.8%)	

* $p<0,05$ (Chi-square test/ Fisher's exact test)

A Tabela 3 descreve a diferença estatisticamente significativa entre a frequência de crianças com cefaleia antes e após o tratamento nos grupos G1 e G2, mas não houve diferença entre os dois grupos (G1 e G2).

Tabela 3: Análise da cefaleia reportada pelos participantes, antes e após os tratamentos

		Headache	No	Yes	Significance
G1	Before		4 (21.05%)	15 (78.95%)	<i>p=0.005*</i>
	After		12 (63.15%)	7 (36.85%)	
G2	Before		5 (26.31%)	14 (73.69%)	<i>p=0.001*</i>
	After		16 (84.21%)	3 (15.79%)	
G3	Before		6 (31.57%)	13 (68.43%)	<i>p=0.157</i>
	After		8 (42.10%)	11 (57.9%)	
G4	Before		7 (36.84%)	12 (63.16%)	<i>p=0.317</i>
	After		8 (42.10%)	11 (57.9%)	

* $p<0,05$

Em análises intra grupos, descritas na Tabela 4, observou-se diferença estatisticamente significativa entre a força de mordida(FM) no lado esquerdo antes do tratamento entre G1 e G3. Observou-se que após o tratamento, G1 apresentou menor FM quando comparado aos outros grupos em ambos os lados (significa = 16,36 kg / F, SD = 3,99). O G3 apresentou o BF mais alto para o lado esquerdo, antes e depois do tratamento (significa = 27,93; SD = 7,83).

Tabela 4: Análise de força de mordida antes e após o tratamento em todos os grupos

* $p < 0.05$

Em uma análise intra grupos após tratamentos, todos os grupos mostraram um aumento nos níveis salivares de cortisol, com G3 apresentando níveis mais altos que os demais, conforme descrito na Tabela 5.

	n	Means	SD	IC (95%)		sig
Bite force on the left side	G1	19	29.4921	9.92421	24.7088	34.2754
	G2	19	23.1168	10.95891	17.8348	28.3989
	G3	19	21.8995	5.70204	19.1512	24.6478
	G4	19	22.8284	4.05646	20.8733	24.7836
	Total	76	24.3342	8.56765	22.3764	26.2920
Bite force on the right side	G1	19	27.1284	8.59126	22.9876	31.2693
	G2	19	21.5589	8.15538	17.6282	25.4897
	G3	19	22.2068	8.73903	17.9948	26.4189
	G4	19	22.4705	4.39811	20.3507	24.5903
	Total	76	23.3412	7.84885	21.5476	25.1347

Tabela 5: Níveis de cortisol salivar antes e após tratamento nos diferentes grupos estudados.

	Salivary Cortisol levels	Median	sig
G1	Before	0.510	
	After	0.910	$p=0.001^*$
G2	Before	0.400	
	After	0.880	$p=0.009^*$
G3	Before	1.010	
	After	2.990	$p=0.001^*$
G4	Before	0.480	
	After	0.950	$p=0.005^*$

Kruskal-Wallis test

423. Discussão

Estudos sobre o bruxismo do sono em crianças aumentaram na literatura devido a associações com problemas respiratórios, desgaste dentário, cárie dentária e má oclusão ^(16,17). Tachibana et al. (2016) ⁽¹⁷⁾ encontraram uma taxa de prevalência de 21,0% em uma amostra de 1263 crianças, com maior índice

na faixa etária de cinco a sete anos (27,4%). A alta prevalência sublinha a importância de um diagnóstico precoce e preciso. Embora a polissonografia seja considerada padrão-ouro para o diagnóstico de SB em adultos, não há protocolo para a execução deste teste complementar em crianças ⁽³⁾. Assim, um exame clínico preciso é importante para o diagnóstico de BS infantil.

Os resultados dos presentes mostraram que BS e marcas de mordida na mucosa jugal apresentam diferenças estatisticamente diferentes. De acordo com o ICSD-3 o BS é diagnosticado na presença de desgaste dentário na porção incisal / oclusal de dentes permanentes e relatórios de pais / cuidadores sobre a ocorrência de aperto e / ou moagem dos dentes. Como esperado, encontrou-se associação significativa no presente estudo entre desgaste dentário e BS.

Na Tabela 2, foram encontradas diferenças entre a frequência de crianças com dor de cabeça antes e após o tratamento nos grupos G1 e G2. As cefaleias são um sintoma muito comum, como enxaquecas e dores de cabeça de tensão, a última é a mais comum ⁽⁶⁾. É o resultado de uma fraca postura ou estresse O estresse tem sido associado ao BS na literatura ⁽⁷⁾. Dores de cabeça de tensão e BS envolvem contrações musculares causadas por estresse constante. No entanto, na maioria das dores de cabeça relatadas, a dor não cessou com o sono, o que significa uma má qualidade do sono, com falta de sono reparador, corroborando com Restrepo et al (2016)¹⁰, que observaram que as crianças BS têm um maior número de microdespertares noturnos, o que parece estar associado a um aumento dos problemas de comportamento e atenção. Alguns distúrbios do sono levam a um transtorno de hiperatividade com déficit de atenção (TDAH) ²⁰, então, torna-se mais difícil de tratar com PO, então o uso das terapias alternativas ganham maior importância por serem eficientes.

A avaliação da força dos músculos mastigatórios determina quantificar a força disponível para cortar ou esmagar o alimento, e a força de mordida é indicativa da sua magnitude. No presente estudo, G1 apresentou menor FM, quando comparado aos outros grupos em ambos os lados. Este estudo não corrobora outros estudos que avaliam as características morfológicas dos músculos antes da terapia de fotobiomodulação. Em estudos clínicos utilizando terapia de fotobiomodulação, aumentou a contração muscular máxima após

aplicações a laser ²¹. Outro estudo avaliou a terapia de fotobiomodulação em pacientes com fratura mandibular em mandibular. Seus resultados mostraram um aumento na FM após a terapia com fotobiomodulação. Embora os resultados presentes ocorram ao contrário da literatura, a força de mordida mais baixa em um caso de bruxismo do sono pode proporcionar um relaxamento muscular necessário para causar menos dano aos tecidos, devido à intensa contração muscular. Há muitas consequências já apontadas pela literatura sobre BS, como associação com distúrbios temporomandibulares, dores de cabeça, facetas de desgaste dental, limitações na boca aberta, fadiga, cansaço ^{1,4}. Em outro estudo, o presente estudo obteve a mesma redução na FM em uma terapia de fotobiomodulação como PO em adultos ²², mostrando uma terapia alternativa para casos em que o PO é inviável em crianças.

Outra avaliação foi o nível de cortisol salivar. No presente estudo, observou-se aumento de níveis de biomarcadores em todos os grupos após os tratamentos, que não corroboram com um estudo em adultos, onde os níveis de cortisol salivar diminuíram no grupo ²². Outro estudo não corroborou também. Uma correlação positiva moderada entre a atividade muscular e os níveis de biomarcadores em crianças BS ²³. No entanto, quando comparado em outra desordem muscular, distúrbios temporomandibulares (DTM), crianças com ou sem TMD não mostraram diferenças nos níveis salivares de cortisol ¹². Pode ser explicado por um associado na literatura em cortisol salivar com resposta aguda do cortisol a um estressor e o cortisol do cabelo reflete a exposição cumulativa ao cortisol²⁴. Como o bruxismo é uma condição crônica, o paciente está exposto a vários estressores por um determinado período. Fatores de ambientes, incluindo equipamentos diferentes, podem influenciar como estressor agudo. Então, para esse protocolo, talvez seja possível observar uma resposta ao estresse no cortisol do cabelo, em vez da saliva. Os autores sugerem mais estudos sobre.

424. Conclusão

Os resultados sugerem um diagnóstico complementar de bruxismo do sono, observando marcas de mordida na mucosa bucal, melhorando a precisão do diagnóstico, especialmente em crianças. Sobre os tratamentos, a fotobiomodulação em pontos de acupuntura resultou em um tratamento alternativo em crianças com BS, reduzindo o relato de dor de cabeça e diminuindo a força de mordida. Os níveis salivares de cortisol aumentam em todos os grupos após terapias, provavelmente como influência do estressor agudo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre o bruxismo do sono (BS) em crianças têm sido encontrados na literatura devido a associações com problemas respiratórios, desgaste dentário, cárie dentária e má oclusão ^(9,28). Tachibana et al. (2016) encontraram uma taxa de prevalência de 21% em uma amostra de 1263 crianças, com maior índice na faixa etária de cinco a sete anos (27,4%). A presença de BS em faixa etária precoce reforça a importância de um diagnóstico. A polissonografia tem sido um instrumento diagnóstico para o BS, sendo considerada padrão-ouro para o diagnóstico de BS em adultos, entretanto ainda não há um protocolo para a realização deste teste complementar em crianças ¹⁰. Assim, um exame clínico completo, acompanhado de questionário preciso respondido pelos cuidadores e responsáveis se faz necessário.

Os resultados deste estudo apontam para uma associação entre BS e mordiscados na mucosa jugal. De acordo com o ICSD-4 o BS é diagnosticado na presença de desgaste dentário na porção incisal/oclusal de dentes permanentes e relatórios de pais/cuidadores sobre a ocorrência de apertamento e/ou ranger dos dentes. Dessa forma, os resultados obtidos também mostraram uma associação positiva entre o desgaste dentário e BS.

Neste estudo foram encontradas diferenças significativas entre a frequência de crianças que apresentaram cefaleia antes e após a terapêutica nos grupos G1 e G2. As cefaleias são um sintoma presente em muitos relatos, e possui diversas formas de manifestação, como enxaquecas e dores de cabeça de tensão, sendo a última a mais comum ¹⁸. Geralmente, a cefaleia tensional esta associada à uma má postura ou estresse. O estresse também foi um fator que foi associado ao BS na literatura ¹⁹. A cefaleia tensional e o BS envolvem contrações musculares geradas por um estresse constante. Em um estudo, no entanto, na maior parte dos casos, a cefaleia não passou após uma noite de sono, o que fez os autores concluírem que a má qualidade do sono, juntamente com a falta de sono reparador, (Herrerra et al)²⁹. Foi observado que as crianças com BS têm um maior numero de microdespertares noturnos, o que parece estar

associado a um aumento dos problemas de comportamento e atenção. Alguns distúrbios do sono levam a um transtorno de hiperatividade com déficit de atenção (TDAH)⁵², o que torna mais difícil a colaboração do paciente na terapia com placas rígidas oclusais, então, o uso de terapias alternativas ganham maior destaque por serem eficientes.

A avaliação da Força de Mordida (FM) quantifica a força disponível para cortar ou esmagar o alimento, e a força de mordida indicando da sua magnitude. No presente estudo, G1 apresentou menor FM, quando comparado aos outros grupos em ambos os lados. Este estudo não corrobora com outros estudos que avaliam as características morfológicas dos músculos antes da terapia de fotobiomodulação. Em estudos clínicos utilizando terapia de fotobiomodulação, aumentou a contração muscular máxima após aplicações a laser⁵³. Outro estudo avaliou a terapia de fotobiomodulação em pacientes com fratura mandibular em mandíbula. Seus resultados mostraram um aumento na FM após a terapia com fotobiomodulação. Embora os resultados presentes ocorram ao contrário da literatura, a FM mais baixa em um caso de BS pode proporcionar um relaxamento muscular necessário para causar menos dano aos tecidos, devido à intensa contração muscular. Há muitas consequências já apontadas pela literatura sobre BS, como associação com distúrbios temporomandibulares, dores de cabeça, facetas de desgaste dental, limitações na boca aberta, fadiga, cansaço^(3,24). Quando comparado à outra pesquisa, o presente estudo obteve a mesma redução na FM após uma terapia de fotobiomodulação obtida neste estudo, em adultos tratados com placa rígida oclusal⁴⁴, mostrando-se como uma terapia alternativa para casos em que a placa rígida é inviável em crianças.

Observou-se um resultado positivo e significativo em relação à aplicação da fototerapia com laser nos acupontos. Além dos princípios da MTC (Medicina Tradicional Chinesa) e da Acupuntura Científica, os acupontos a serem estimulados foram selecionados levando-se em consideração a sintomatologia específica das crianças, ponto da área local e distantemente, com base em uma visão mais ampla da acupuntura e à utilização das categorias de pontos de maneira simétrica e em pares. A fluência foi calculada observando a cor de pele do paciente, idade e principalmente conhecendo o comprimento de onda e a potência do equipamento. A laserpuntura baseia-se nos efeitos biológicos do

laser terapêutico, promovendo uma bioestimulação dos tecidos, biomodulação, analgesia e ação antiinflamatória^{36,37,39}. A irradiação laser exerce um estímulo sobre as mitocôndrias celulares, provocando um aumento na produção ATP no interior das células e conseqüentemente, aceleração da mitose, levando a um aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular, eliminando as atividades anaeróbicas ocorridas em um processo inflamatório^{57,58,59}. Outros mecanismos relatados de efeitos benéficos induzidos pela radiação laser incluem a modulação dos níveis de prostaglandinas, o aumento da atividade fibroblástica, a alteração do potencial somato sensorial e da velocidade de condução nervosa, além de melhora da circulação local dos tecidos tratados, levando ao alívio da dor e reparo tecidual^{57,58}. Não produz calor, e a elevação da temperatura no local da aplicação está relacionada com o aumento da atividade metabólica^{57,58}. O LBI atua por meio de fotoativação da célula, um processo conhecido como fotobiomodulação, determinado pelos efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ou fotofísicos sem que aconteça um efeito fototérmico. O laser infravermelho é o mais indicado quando o tecido alvo está mais distante da superfície da pele, como tecidos ósseos e articulações.

Outra avaliação foi o nível de cortisol salivar. Nesse estudo, foi percebido um aumento no nível do biomarcador em todos os grupos após os tratamentos, que não revalida com alguns estudos em adultos, onde os níveis de cortisol salivar diminuíram no grupo⁴⁴. Outro estudo não validou uma correlação positiva moderada entre a atividade muscular e os níveis de biomarcadores em crianças BS⁴³. No entanto, quando comparado em outra desordem muscular, distúrbios temporomandibulares (DTM), crianças com ou sem DTM não mostraram diferenças nos níveis salivares de cortisol²¹. Estes achados podem ser explicados por um estudo encontrado na literatura dosando o cortisol salivar e encontrando uma resposta aguda do cortisol associado a um agente estressor²⁹. Como o bruxismo é uma condição crônica, o paciente está exposto a vários estressores por um determinado período. Fatores de ambientes, incluindo equipamentos diferentes, podem influenciar e interferir como estressor um agente estressor agudo. Dessa forma, para esse protocolo, talvez seja possível observar uma resposta ao estresse no cortisol do cabelo, ao invés de saliva. Os autores sugerem mais estudos sobre a real influência deste biomarcador em

relação ao bruxismo do sono. Os níveis de cortisol salivar neste estudo, aumentam em todos os grupos após terapias, o que provavelmente teve como influência algum agente agressor agudo.

Conclui-se que o Laser nos acupontos é um método rápido e eficaz, capaz de inibir a dor sem causar traumas ao paciente com picadas de agulhas e em um curto espaço de tempo evita os riscos de infecções. Ainda, as melhoras desse método podem persistir seis meses após a interrupção da terapia, podendo ser utilizados por crianças e pacientes com sequelas neurológicas.

É muito importante uma padronização rigorosa quanto à variação de parâmetros de irradiação tais como: comprimento de onda, dose, fluência, irradiância, número e frequência de sessões de aplicação, de forma a obterem-se resultados reproduzíveis e confiáveis.

Em relação às terapias utilizadas, a fotobiomodulação em pontos de acupuntura resultou em um tratamento viável em crianças com BS, reduzindo o relato de cefaleia e diminuindo a força de mordida.

6. Referências

1. Sleep related bruxism. In: International classification of sleep disorders. 3rd ed. Darien, IL.: American Academy of Sleep Medicine; 2014
2. Bader G, Lavigne G. Sleep bruxism: an overview of an oromandibular sleep movement disorder. *Sleep Med Reviews*. 2000;4:27-43.
3. Murali R V, Rangarajan P, Mounissamy A. Bruxism: Conceptual discussion and Review. *J Pharm Bioallied Sci [Internet]*. 2015;7(Suppl 1):S265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439689/>
4. Motta LJ, Bortoletto CC¹, Marques AJ, Ferrari RA, Fernandes KP, Bussadori SK. Association between respiratory problems and dental caries in children with bruxism. *Indian J Dent Res*. 2014 Jan-Feb;25(1):9-13. doi: 10.4103/0970-9290.131047.
5. Bortoletto CC, Cordeiro da Silva F, Silva PF, Leal de Godoy CH, Albertini R, Motta LJ, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Romano R, Bussadori SK. Evaluation of Cranio-cervical Posture in Children with Bruxism Before and After Bite Plate Therapy: A Pilot Project. *J Phys Ther Sci*. 2014 Jul;26(7):1125-8.
6. Fernandes G, Franco AL, Gonçalves DA, Speciali JG, Bigal ME, Camparis CM. Temporomandibular disorders, sleep bruxism, and primary headaches are mutually associated. *J Orofac Pain [Internet]*. 2013;27(1):14–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424716>
7. Wieckiewicz M, Paradowska-Stolarz A, Wieckiewicz W. Psychosocial aspects of bruxism: The most paramount factor influencing teeth grinding. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
8. Lavigne GJ, Rompe RH, Montplaisir JY. Sleep bruxism: validity of clinical research diagnostic criteria in a controlled polysomnographic study. *J Dent Res*. 1996;75(1):546-55.
9. Tachibana M, Kato T, Kato-Nishimura K, Matsuzawa S, Mohri I, Taniike M. Associations of sleep bruxism with age, sleep apnea, and daytime problematic behaviors in children. *Oral Dis*. 2016;22(6):557–65.
10. Restrepo C, Manfredini D, Castrillon E, Svensson P, Santamaria A, Alvarez C, et al. Diagnostic accuracy of the use of parental-reported sleep bruxism in a polysomnographic study in children. *Int J Paediatr Dent*. 2016;1–8.

11. Lobbezoo F, Ahlberg J, Glaros AG, Kato T, Koyano K, Lavigne G, et al. Bruxism defined and graded: an international consensus. *J Oral Rehab* 2013;40:2–4.
12. Kato T, Thie NMR, Montplaisir JY, Lavigne GJ. Bruxism and orofacial movements during sleep. *Dent Clin North Am*. 2001;45(4):657-84.
13. Fulgencio LB, Correia-Faria P, Lage CF, Paiva SM, Pordeus IA, Serra-Negra JM. Diagnosis of sleep bruxism can assist in the detection of cases of verbal school bullying and measure the life satisfaction of adolescents. *Int J Paediatr Dent*. 2016;1–9.
14. Barbosa TS, Miyakoda LS, Pocztaruk RL, Rocha CP. Temporomandibular disorders and bruxism in children and adolescence. review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008;72:290-314.
15. Motta LJ, Guedes CC, De Santis TO, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori. SK. Association between parafunctional habits and signs and symptoms of temporomandibular dysfunction among adolescents. *Oral Health Prev Dent*. 2013;11(1):3-7.
16. Quintero Y, Restrepo CC, Tamayo V, al e. Effect of awareness through movement on the head posture of bruxist children. *J Oral Rehab*. 2009;36:18-25.
17. Pellizer EP, Muench A. Forças de mordida relacionadas a próteses removíveis inferiores. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997.
18. Kobayashi FY, Furlan NF, Barbosa TS, Castelo PM, Gavião MBD. Evaluation of masticatory performance and bite force in children with sleep bruxism. *J Oral Rehabil*. 2012;39(10):776–84.
19. Amanto JN, Tuon RA, Castelo PM, Gavião MB, Barbosa T de S. Assessment of sleep bruxism, orthodontic treatment need, orofacial dysfunctions and salivary biomarkers in asthmatic children. *Arch Oral Biol*. 2015 May;60(5):698-705. doi:10.1016/j.archoralbio. 2015.02.011. Epub 2015 Feb 20.
20. McCartan B.E., Lamey P.J., Wallace A.M. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*; 25: 357-359, 1996.
21. Kobayashi FY, Gavião MBD, Marquezim MCS, Fonseca FLA, Montes ABM, Barbosa T de S, et al. Salivary stress biomarkers and anxiety symptoms in children with and without temporomandibular disorders. *Braz Oral Res [Internet]*. 2017;31:e78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29019550>

22. Gunnar MR, Donzella B - Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendoc*. 2002 jan-Fev;27(1-2):199-220.
23. Silva ML, Mallozi MC, Ferrari GF. Salivary cortisol to assess the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in healthy children under 3 years old. *J Pediatr*. 2007; 83(2):121-6.
24. Manfredini D, Restrepo C, Diaz-Serrano K, Winocur E, Lobbezoo F. Prevalence of sleep bruxism in children: A systematic review of the literature. *J Oral Rehabil*. 2013;40:631–342.
25. Santos MJP, Bernabé DG, Nakamune ACMS, Perri SHV, Aguiar SMHCA, Oliveira SHP. Salivary alpha amylase and cortisol levels in children with global developmental delay and their relation with the expectation of dental care and behavior during the intervention. *Res Develop Disabil.*, 2012; 33(2):499-505.
26. Raphael KG, Marbach JJ, Klausnerr JJ, Teaford MF. Is bruxism severity a predictor of oral splint efficacy in patients with myofascial face pain? *J Oral Rehabil*. 2003;30(1):17-29.
27. Serra-Negra JM, Paiva SM, Seabra AP, Dorella C, Lemos BF, Pordeus IA. Prevalence of sleep bruxism in a group of Brazilian schoolchildren. *Eur Arch Pediatr Dent*. 2010; 11(4):192-5.
28. Serra-Negra JM, Aquino MS, Silva MES, Abreu MH, Silveira RR. Tooth wear and sleep quality: A study of police officers and non-police officers. *Cranio®* [Internet]. 2016;9634(December):1–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08869634.2016.1263275>
29. Kao K, Doan SN, St. John AM, Meyer JS, Tarullo AR. Salivary cortisol reactivity in preschoolers is associated with hair cortisol and behavioral problems. *Stress* [Internet]. 2017;0(0):1–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10253890.2017.1391210>
30. Dallanora LJ, Faltin PP, Inoue Rt, Aranha dos Santos VM, Tanaka J. Avaliação do uso de acupuntura no tratamento de pacientes com bruxismo. *RGO*, 52(5): 333-9 nov/dez 2004.
31. Rosted P. The use of acupuncture in dentistry: a review of scientific validity of published papers. *Oral Dis*. 4(2): 100-4, 2000.

32. Magro KO, Hirschfeld GCR, Campolongo GD, Barros TEP. Acupuntura: tratamento alternativo nas dores orofaciais. Disponível em: http://www.unidor.com.br/publi/Acupuntura_DOE.pdf
33. Wen TS. Acupuntura clássica chinesa. São Paulo: Cultrix; 1989.
34. Yeh M-C, Chen K-K, Chiang M-H, Chen C-H, Chen P-H, Lee H-E, et al. Low-power laser irradiation inhibits arecoline-induced fibrosis: an in vitro study. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2017;9(1):38–42. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ijos.2016.49>
35. Bauer J. Acupuntura. In: Barros JJ, Tratamento das disfunções craniomandibulares, ATM. São Paulo: Santos, 1995. Cap 17, p. 175-82.
36. Wu DZ. Acupuncture and neurophysiology. *Clin Neurol Neurosurg*. 1990; 92(1): 13-25.
37. Farber PL, Timo-Laria C. Acupuntura e sistema nervoso. *J Bras Med* 1994; 67(5/6): 125-31.
38. Carlsson GE, Egermark I, magnusson T. Predictors of bruxism, other oral parafunctions, and tooth wear over a 20-year follow-up period. *J Orofac Pain*. 2003; 17(1): 50-7.
39. Wen, Tom Sintan. Acupuntura clássica chinesa. São Paulo: Cultrix, 2006 p.15-17.
40. Epelbaum E. tratamento da deficiência neurosensorial por laser em baixa potência e sua associação a acupuntura a laser. 2007. 74f. Dissertação – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
41. Ferreira de Oliveira, Renata & Silva, Camila & Cersosimo, Maria & Borsatto, Maria Cristina & Freitas, Patricia. (2015). Laser therapy on points of acupuncture: Are there benefits in dentistry?. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 151. 76-82. 10.1016/j.jphotobiol.2015.07.008.
42. Siedentopf CM et al. Laser acupuncture induced specific cerebral cortical and subcortical activations in humans. *Lasers in medical Science* 2005; 20:68-73.
43. Karakoulaki S, Tortopidis D, Andreadis D, Koidis P. Relationship Between Sleep Bruxism and Stress Determined by Saliva Biomarkers. *Int J Prosthodont* [Internet]. 2015;28(5):467–74. Available from: [http://quintpub.com/journals/ijp/abstract.php?iss2_id=1325&article_id=15583&article=4&title=Relationship Between Sleep Bruxism and Stress Determined by](http://quintpub.com/journals/ijp/abstract.php?iss2_id=1325&article_id=15583&article=4&title=Relationship%20Between%20Sleep%20Bruxism%20and%20Stress%20Determined%20by)

Saliva Biomarkers#.WATv0Vuhxz8

44. Rosar JV, Barbosa T de S, Dias IOV, Kobayashi FY, Costa YM, Gavião MBD, et al. Effect of interocclusal appliance on bite force, sleep quality, salivary cortisol levels and signs and symptoms of temporomandibular dysfunction in adults with sleep bruxism. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017;82:62–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.05.018>

45. Rosa RS, Cury AAB, Garcia RCMR. Terapias alternativas para desordens temporomandibulares. *Rev Odonto Ciencia - Fac Odonto/PUCRS*. 2002;17(36):187-92.

46. Hachmann A, Martins EA, Araujo FB, Nunes R. Efficacy of the nocturnal bite plate in the control of bruxism for 3 to 5 year old children. *J Clin Pediatr Dent*. 1999 Fall;24(1):9-15.

47. Solberg WK, Clarck GT, Rugh JD. Nocturnal electromyographic evaluation of bruxism patients undergoing short term splint therapy. *J Oral Rehabil*. 2007;2:215-23.104 (3):32-9, 2007.

48. Serra Negra JM, Paiva SM, Fulgencio LB et al. Environmental factors, sleep duration, and sleep bruxism in Brazilian schoolchildren: a case control study *Sleep Med*. 2014 Feb; 2014(2):236-9.

49. da Silva MM, Albertini R, Leal-Junior ECP, de Tarso Camillo de Carvalho P, Silva JA, Bussadori SK, et al. Effects of exercise training and photobiomodulation therapy (EXTRAPHOTO) on pain in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* [Internet]. 2015;16(1):252. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464876/>

50. Carvalho CM, Lacerda JÁ, Neto FPS, Cangussu MCT, Marques AMC, Pinheiro ALB. Wavelength effect in temporomandibular joint pain: a clinical experience. *Lasers Med Sci*. 2010; 25: 229-32.

51. Elsdon DS, Spanswick S, Zaslowski C, Meier PC. Protocol: Testing the Relevance of Acupuncture Theory in the Treatment of Myofascial Pain in the Upper Trapezius Muscle. *JAMS J Acupunct Meridian Stud* [Internet]. 2017;10(1):67–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2016.11.007>

52. Cohen-Zion M, Ancoli-Israel S. Sleep in children with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): A review of naturalistic and stimulant intervention studies. *Sleep Med Rev.* 2004;8(5):379–402.
53. de Oliveira AR, Vanin AA, Tomazoni SS, Miranda EF, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, et al. Pre-Exercise Infrared Photobiomodulation Therapy (810nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans: What Is the Optimal Power Output? *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2017;35(11):595–603. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2017.4343>
54. Ferrario VF, Sforza C, Colombo A, Ciusa V. An electromyographic investigation of masticatory muscles symmetry in normo-occlusion subjects. *J Oral Rehab.* 2000; 27:33-40.
55. Huang Y-F, Lin J-C, Yang H-W, Lee Y-H, Yu C-H. Clinical effectiveness of laser acupuncture in the treatment of temporomandibular joint disorder. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2014;113(8):535–9. Available from: <http://www.jfma-online.com/article/S0929664612003944/fulltext>
56. Moyers RE. Etiologia da Maloclusão. In: Moyers RE. *Ortodontia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991: 157-59/212-37.59.
57. Kato MT, Kogawa EM, Santos CN, Conti PCR. TENS and low-level laser therapy in the management of temporomandibular disorders. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14 (2): 130-135.
58. Marini I, Gatto MR, Bonetti GA. Effects of superpulsed low-level laser therapy on temporomandibular joint pain. *Clin J Pain.* 2010; 26 (7): 611-616. ///
59. Andrade TNC, Frare JC. Estudo comparativo entre os efeitos de técnicas de terapia manual isoladas e associadas à laserterapia de baixa potência sobre a dor em pacientes com disfunção temporomandibular. *Rev Gauch Odontol.* 2008; (3): 287-295.
60. Disponível em: www.consort-statement.org (CONSORT).

7. Apêndices

7.1. Artigo1

Evaluation of muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism before and after low level laser applied to acupoints: study protocol for a randomised controlled trial

Mônica da Consolação Canuto Salgueiro¹monicasalgueiro@globo.com

Carolina Carvalho Bortoletto²carolcbortoletto@gmail.com

Anna Carolina RattoTempestini Horliana³annacrth@gmail.com

Ana Carolina Costa Mota¹ana_cmota@yahoo.com.br

Lara Jansiski Motta⁴larajmotta@terra.com.br

Pamella de Barros Motta⁵pamellabmotta@gmail.com

Raquel Agnelli MesquitaFerrari⁶raquel.mesquita@gmail.com

Kristianne Porta Santos Fernandes⁶kristianneporta@gmail.com

Sandra Kalil Bussadori⁶Sandra.sk@b@gmail.com

¹PhD student, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

²PhD student, Postgraduate program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

³Professor, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

⁴Professor, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences and Master's degree in Administration, Management in Health Systems, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

⁵Dental surgeon

⁶Professor, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences and Postgraduate program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

Correspondence: Sandra Kalil Bussadori, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences Nove de Julho University, Rua Vergueiro, 249 - Liberdade CEP 0154001, São Paulo, SP, Brasil, sandra.skb@gmail.com

ABSTRACT

Background: Bruxism is a repetitive activity that causes tooth wear, audible sounds, and discomfort. Preventive measures have been studied for conditions that can exert a negative influence on physiological development in children. Low-level laser therapy administered over acupoints is an effective, painless, low-cost treatment option that has achieved good results. Thus, the aim of the proposed study is to evaluate changes in muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism after the application of low-level laser to accupoints. **Methods:** The children will be randomly allocated to four groups of 19 individuals: G1 - low-level laser; G2 - occlusal splint; G3 - placebo laser; and G4 - control (without bruxism). The BTS TMJOINT electromyography will be used to determine muscle activity and a digital gnathodynamometer will be used to measure bite force. Salivary cortisol will be analysed at baseline as well as one and six months after treatment. Two-way ANOVA will be employed and complemented by Tukey's test. **Discussion:** Bruxism is a repetitive activity of the

masticatory muscles that can have negative consequences if not treated, such as tooth wear, noises, discomfort and anxiety. Thus, control and treatment measures should be taken. Although low-level laser therapy over acupoints has been indicated for children, the effects of this treatment modality have not yet been studied.

Trial registration: NCT02757261 on 8 April 2016. This study protocol received a grant from the Brazilian fostering agency São Paulo Research Foundation (FAPESP: #2015/13180-2).

KEY WORDS: Bruxism; Child; Occlusal splints; Bite force; Acupuncture; Laser; Muscle Activity; Salivary Cortisol

BACKGROUND

Bruxism is a repetitive activity of the masticatory muscles characterised by grinding and/or clenching one's teeth or movements of the mandible [1, 2, 3]. This condition is classified as either primary or secondary [1]. With primary bruxism, there is no evident medical, systemic or psychiatric cause, whereas secondary bruxism is associated with a clinical, neurological or psychiatric disorder, iatrogenic factors or sleep disorder [1, 4]. Awake (or diurnal) bruxism is characterised by clenching one's teeth during waking hours and sleep bruxism is the unconscious activity of grinding or clenching one's teeth during sleep with the production of audible sounds [1, 4-6].

Divergent opinions are found on the aetiology of sleep bruxism. Some authors state that central disturbances are the main cause. In this theory, muscle hyperactivity is caused by instability in the basal ganglia; synapses change the way that they function, altering between inhibitory and excitatory neurons [7]. Another theory assumes that malocclusion is the primary cause of grinding and clenching the teeth, as occlusal maladjustment reduces masticatory muscle tone; with occlusal imbalance, the activity of motor neurons of the masticatory muscles could be initiated by periodontal receptors [7]. Sleep bruxism can be measured using an index score (e.g., rhythmic masticatory muscle activity [RMMA]). Such

indices measure the number of bruxism episodes per hour of sleep. The Tooth Wear Index quantifies occlusal and incisal wear to determine its severity and prevalence, with a particular cut-off point considered indicative of sleep bruxism [8]. There is also the theory that orofacial pain stems from a lack of adequate rest time between muscle activities, which leads to muscle overload and pain; however, some authors have failed to prove this [9]. Bruxism is also widely associated with stress and anxiety [10-13].

The frequency of bruxism is high in childhood, with prevalence rates ranging from 13.5 to 33% [14, 15] and this condition can cause harm to the stomatognathic system. Childhood bruxism is difficult to diagnosis and ideal treatment has not yet been established. Physical therapy is currently used to treat this condition and the most commonly employed methods are transcutaneous neuromuscular stimulation, microcurrent electrical neuromuscular stimulation, cryotherapy, ultrasound, infrared therapy, kinesiotherapy, massage therapy, acupuncture, low-level laser therapy (LLLT) and occlusal splint usage [16, 17]. According to Solberg et al. [18], an occlusal splint reduces muscle activity and provides greater patient comfort. Occlusal splint usage seems to reduce tooth grinding, masticatory muscle activity and orofacial pain [19]. Although occlusal splints are widely employed for the treatment of bruxism, no specific strategy has been established for the cure of this condition. Thus, further studies are needed [18, 20].

LLLT is a non-invasive, low-cost treatment. The irradiation of trigger points constitutes effective treatment for orofacial pain as well as the reduction of swelling and hyperemia [21]. Acupuncture has also been successfully used for the treatment of bruxism, achieving a reduction in the activity of the masseter and anterior temporal muscles as well as a reduction of anxiety [22]. The stimulation of particular acupoints can alter blood circulation dynamics and promote muscle

relaxation, thereby alleviating muscle spasms, inflammation and pain. Moreover, such stimulation leads to the release of hormones, such as cortisol and endorphins, thereby promoting an analgesic effect [23]. The stimulation of acupoints can be achieved with the use of needles, infrared irradiation, electrical current or laser [24]. The latter method is indicated for children because it is painless and has a shorter exposure time per acupoint [25, 26, 27]. However, the use of LLLT over acupoints has not yet been tested on children with bruxism. Therefore, the aim of the proposed study is to investigate changes in maximum bite force (measured using a gnathodynamometer) one and six months after low-level laser therapy over acupoints and occlusal splint usage compared to muscle hyperactivity at baseline in children. The secondary outcomes are the measure of pain (VAS scale), muscle activity (using the BTS TMJOINT[®] electromyograph) and salivary cortisol.

METHODS

This is a protocol for a randomised, controlled, clinical trial. The project received approval from the Institutional Review Board of Nove de Julho University (Brazil) under process number 1.333.636. The participants and legal guardians will receive clarifications regarding the objectives and procedures and will sign a statement of informed consent agreeing to participate in the study.

Sample size calculation

For the calculation of the sample size, the researcher will specify that an increase in the standard deviation of the responses for which the null hypothesis will be rejected is $P = 20\%$. Adopting a maximum significance level of $\alpha = 0.05$ and a minimum test power of 80% , the number of subjects per group will be $n =$

15.75, which will be increased by 20% to compensate for possible dropouts, leading to 19 subjects per group (total: $19 \times 4 = 76$ subjects).

Exclusion criteria

Individuals that use muscle relaxants, those with temporomandibular disorder, cerebral palsy, physical or psychiatric disorders (i.e., anxiety, persistent delusional disorder, acute and transient psychotic disorders, schizoaffective disorders and mood disorders) and those currently undergoing another treatment for bruxism will be excluded from the study.

Inclusion criteria

Male and female children with sleep bruxism aged six to eight years with no physical or psychiatric limitations that may compromise the proposed therapies will be included. All individuals will need to have the first molars in Angle Class I and be free of dental caries. A clinical examination of tooth wear and the reports of parents/caregivers regarding tooth clenching/grinding will be used for the diagnosis of bruxism, following the criteria established by the American Academy of Sleep Medicine [1]. A questionnaire adapted from Serra Negra (2014) [28] and Manfredini et al. (2013) [27] will also be used to assist in the diagnosis of bruxism based on these two signs and symptoms (dental wear and parent's report of tooth clenching or grinding).

Randomisation and interventions

Randomisation will be performed using Microsoft Excel (version 2013). Seventy-six patients will be randomly allocated to the four groups. Randomisation will be in block form (groups of four patients).

Seventy-six opaque envelopes will be identified with sequential numbers (1 to 76) and each will contain information regarding the corresponding group following the established random order. The envelopes will be sealed until the time of treatment.

Patients will be allocated as follows:

Group 1 will receive low-level laser over acupoints; Group 2 will use an occlusal splint; Group 3 will receive placebo laser therapy over acupoints; and Group 4 (control group) will be composed of children without bruxism and will not receive any type of treatment. Parents/guardians will received guidance throughout the study. In G1, low-level laser (power: 70 mW; energy density: 1.675 mW/cm²; 12 points irradiated; 1 J per point for 20 s; 12 sessions; 12 J/session; twice a week) will be applied directly to the skin at six acupoints on each side, always by the same operator. In G2 and G3, the laser device will be positioned over the same points as in G1, but will be switched off.

- **Group 1 – experimental (n = 19)** – low-level laser therapy over acupoints;
- **Group 2 –positive control (n = 19)** – occlusal splint usage;
- **Group 3 – control (n = 19)** – placebo laser therapy over acupoints;
- **Group 4 – control (n = 19)** – children without bruxism

The child will be seated comfortably in a room without noise or sound interference and positioned with the Frankfurt plane parallel to the floor. A total of twelve sessions of LLLT will be performed at a frequency of twice per week using a laser at wavelength of 786.94 nm with a conventional tip, energy density of 25 J/cm², intensity of 1.675 mW/cm², power of 70mW, 1 Joules (J) per point for 20

seconds for a total of 12 J per session. Point application will be used in direct contact with the skin (spot area: 0.04 cm²) following the protocol suggested by Carvalho et al. [30] and Venezian et al. [21]. The Twin Flex Evolution® device (MM Optics) will be employed. A potentiometer will be used at the onset of the study to determine the effective mean power of the equipment and therapeutic doses applied during clinical use. The points irradiated are listed below with their respective explanations:

- IG-4 (Hegu) - has a direct and strong influence on the face, eyes, ears, nose and mouth. It is also used to calm the mind and relieve anxiety. This point is located in the patient's hand at the base between the thumb and index finger
- F-3 (Taichong) - exerts a profound soothing effect on the mind. Its soothing action is increased when combined with IG-4. This point is located in the patient's feet at the base between the hallux and index toe.
- VB-34 (Yanglingquan) - is an important point to relax the tendons whenever there are muscle contractions. This point is located in the upper distal part of gastrocnemius muscle.
- E-36 (Zusanli) - indicated to treat irritability, depression, insomnia, tiredness, fatigue and headache. This point is located below the patella in the lateral portion of the tibia.
- ID-19 (Tinggong) - indicated to treat problems in the ear region. This point is located in the anterior part of the tragus
- BP-6 (Sanyinjiao) - this is one of the most important points, with a broad scope of action. It has a strong soothing action on the mind and

is generally used to treat insomnia. This point is located in the proximal end of the medial malleolus, the distal margin of the tibia.

The patients in G3 (placebo LLLT) will receive the same treatment as those in G1, with the same equipment and a pen that emits a red guide light and a sound, but does not emit energy. After 30 days of follow up, the volunteers in this group will receive complementary treatment for the control of bruxism for ethical reasons.

For G2, the maxillary occlusal splint will be made with transparent acrylic resin and used on with upper arch with palatal and occlusal coverage. Impressions of the maxillary and mandibular arches will be made in alginate, poured in dental stone and mounted on a semi-adjustable articulator. The splint will be made in two layers of rose-colored wax and adapted to the maxillary teeth. The splint will have a thickness of 3 mm, contact with all teeth in centric relationship, distocclusion of the posterior teeth in laterality and protrusion, avoiding interferences on the swinging side with the canine guide extending from the vestibular to the lingual direction enough to prevent perforation and increase resistance to impact. An expander will also be installed so the splint will be able to accompany the growth dynamics. Following the protocol described by Hachmann et al., [20] the children will use the occlusal splint only at night for two months, with weekly adjustments of one quarter turn.

In G4 (control), children without bruxism will be evaluated. Therefore, this group will not be submitted to any bruxism treatment. This will be the control group.

Study variables

All groups will be submitted to the evaluation of muscle activity using the BTS TMJOINT® electromyograph and the evaluation of bite force with a gnatodynamometer at baseline as well as one and six months after treatment. Salivary cortisol will be measured at baseline and after the therapeutic intervention.

Protocol for electromyographic (EMG) evaluation of masticatory muscle and trapezius muscle

The electrical activity resulting from the activation of the masseter and temporal muscles as well as the descending fibres of the trapezius will be captured using a six-channel electromyograph (TMJOINT, BTS Engineering) with a bioelectric signal amplifier, wireless data transmission and disposable bipolar Ag/AgCl surface electrodes (Medical Trace®) measuring 10 mm in diameter. The EMG signal will be amplified with a 2000-fold gain and filtered within a frequency range of 20 to 450 Hz. Impedance of the equipment is $> 10^{15} \Omega/0.2 \text{ pF}$ and the common rejection mode ratio is 60/10Hz 92 dB. The data will be captured and digitised at 1000 frames/second using the BTS MYOLA®52 software program. After cleaning the sites with 70% alcohol to diminish impedance between the skin and electrode [23], the self-adhesive surface electrodes will be attached over the belly of the muscle in the region with the most tonus (determined during moderate intercuspation) at a distance of 20 mm centre to centre, as suggested by the European Society Recommendations for Surface Electromyography [23]. A reference electrode will be placed on the left wrist to impede the interference from outside noise.

The right and left masseter and anterior temporal muscles will be analysed

under four conditions: i) at rest; ii) during maximum habitual intercuspation with a strip of Parafilm M® 40 between the molars for the collection of maximum voluntary contraction (MVC) of the muscles studied; iii) habitual chewing (isotonic contraction); and iv) maximum intercuspation (isometric contraction) without the Parafilm. Three readings will be made under each condition, with a two-minute interval between readings. The collection time will be 15 seconds for in the resting position, five seconds for MVC, 10 seconds for isotonic contraction and 10 seconds for isometric contraction [19, 31]. During the simulation of habitual chewing, a metronome set at 60 beats per minute will be used to standardise the process. The EMG signal captured during chewing will be rectified and normalised by the mean of the signal followed by the calculation of the root mean square (RMS) using a 500-ms moving window without overlap. The data will be normalised by the largest RMS obtained during MVC.

For the positioning of the electrodes on the descending fibres of the trapezius muscle, a point will be marked 2 cm lateral to the midpoint of the straight line between the posterior edge of the acromion and seventh cervical vertebra [19]. Prior to the readings, the participant will be instructed to sit in a chair with the shoulder and arm bare, back erect, knees flexed at 90° and feet apart for the collection of isometric MVC. Two non-elastic bands attached to each side of the base of the chair will be used to resist the movement of the raising of the shoulder during the reading. The volunteer will be instructed to raise the shoulders with maximum force for five seconds. The procedure will be repeated three times with a one-minute interval between readings. The highest value among the three readings will be used to normalise the EMG data of the descending fibres of the trapezius muscle. After a three-minute interval, the volunteer will be instructed to

perform 90° abduction of both arms for 60 s, with the elbows completely extended and the forearms in pronation with the palms turned toward the floor. To monitor the position of the shoulder, two flexible rods positioned horizontally between the arms at a distance of 8 cm will be used to provide feedback of the tactile position [32].

Data processing of the EMG signals will be performed using specific routines developed in Matlab, version 7.1 (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA).

Protocol for analysis of bite force

Bite force will be measured using a digital dynamometer (DMD model, Kratos Equipamentos Industriais Ltda, Cotia, SP, Brazil) adapted for oral conditions. This device is an electronic bite force meter composed of a bite fork and module with a digital display connected by a wire. The readings will be made in the region of the first molars in Angle Class I [33] and free of caries. The volunteer will receive prior orientation and training to become familiar with the device. Six readings will be made – three on the right side and three on the left side, alternating sides between readings. Each reading will last five seconds and will be separated by a one-minute rest period. Bite force will be evaluated prior to the onset of treatment, at the end of treatment and 30 days after the end of treatment. The results will be computed and analysed statistically.

Protocol for evaluation of occlusal contacts

Occlusal contacts will be determined during the electromyographic analysis following the method described by Ferrario et al [34]. To evaluate

symmetry of the temporal and masseter muscles, the overlap percentage coefficient will be computed, which is an index of the distribution of the symmetry of muscle activity ranging from 0% (asymmetry) to 100% (perfect symmetry). The torque coefficient will also be determined, which is the lateral displacement in contralateral activity of the masseter and temporal muscles ranging from 0% (absence of lateral displacement force) to 100% (maximum lateral displacement force) [27, 31]. The total mean activity of the masseter and temporal muscles will be analysed as area over time [27, 32-35]. A clinical examination will then be performed to determine the type of occlusion based on the Angle classification [33], which is the most practical, traditional system and is considered the gold standard in the literature. This system is based on anteroposterior relationships of the maxilla and mandible:

- Angle Class I (neuroclulsion) – The mesiovestibular cusp of the permanent maxillary molar makes contact with the buccal groove of the permanent mandibular first molar;
- Angle Class II (distoclulsion) – The mesial groove of the permanent mandibular first molar makes contact with the mesiobuccal cusp of the permanent maxillary first molar.
- Angel Class III (mesioclulsion) – The mesial groove of the permanent mandibular first molar makes contact anterior to the mesiobuccal cusp of the permanent maxillary first molar.

Protocol for evaluation of salivary cortisol

Saliva will be collected using a swab, which consists of a small ball of cotton on the end of a thin plastic tube. The swab will remain in the mouth for two

minutes. The cotton will subsequently be placed in a centrifugation tube and stored at -20 °C until analysis [36]. Stress will be determined by the quantification of salivary cortisol prior to the onset of treatment and on Day 50. For the study of circadian rhythm of cortisol, two saliva samples will be collected at the home of the participant after at least one hour of fasting and after oral hygiene with water: one at 9 am and one before sleep. The collections will be performed on a Sunday with orientation and using the recommendations of the manufacturer. The samples will be delivered the following day for analysis at Nove de Julho University.

Protocol for evaluation of pain

The Wong-Baker FACES Pain Rating Scale will be used to evaluate pain. This is a self-reported scale that consists of a number of faces ranging from happy to crying. The scale will be explained to the children and they will indicate the face that best corresponds to their level of pain before and after treatment.

Flowchart 2: Proposed experimental conditions/Study flow diagram

Statistical analyses

Descriptive statistics will be used first for the determination of point estimates. The Shapiro-Wilk test will be used to determine the normality of the data. The chi-square test, Student's t-test and ANOVA will be employed for the analysis of associations between variables, with the level of significance set at 5% ($p < 0.05$). After the analysis of data distribution, ANOVA will be used for the evaluation of residuals and parametric tests will be used for the determination of

pre-treatment conditions. Interval estimates will be used for the variables of interest to determine the estimates and perform comparisons. When necessary, transformation methods or non-parametric tests will be used in the data analysis.

DISCUSSION

The main objective of the proposed study is to compare the efficacy of low-level laser therapy administrated to acupoints and occlusal splint usage in children with bruxism. Obviously, it will not be possible to blind the participants submitted to occlusal splint usage (G2), as will occur with the other treatments (G1, G3 and G4), which can be considered a limitation of the study. However, this treatment cannot be excluded, since it is the gold standard in the literature, despite divergences of opinion [37].

Regarding the outcome variables, methods will be employed that can be reproducible in future studies and accessible to patients. Although polysomnography (sleep study) is the most effective for the diagnosis of bruxism, this method has limitations, such as the high cost and the amount of time required for its execution [38]. Moreover, this method had been criticised due to the fact that the patient is not in a familiar environment and children normally do not cooperate, which compromises the quality of the test [38].

The outcome variables muscle activity and bite force have been validated and used in previous studies [39, 8]. We expect an improvement in the distribution of the contact symmetry based on the chosen acupoints (regulation of anxiety/muscle relaxation). We do not expect the number of contacts to increase or intensify nor do we expect any improvement in the bruxism index (which will

not be measured in this study). Some acupuncture points, especially IG-4 (Hegu), F-3 (Taichong) and BP-6 (Sanyinjiao), are indicated to alleviate anxiety and VB-34 (Yanglingquan) is used to treat muscle contraction.

The third outcome (level of salivary cortisol) has become increasingly common due to its non-invasive nature and the existence of accessible commercial kits [40, 41, 42]. We will act on some anxiety points, especially IG-4 (Hegu), F-3 (Taichong) and BP-6 (Sanyinjiao). Some authors [43, 44] state that benzodiazepines, especially clonazepam, are beneficial to adult patients with bruxism. However, the risk of dependency limits its use for prolonged periods. Moreover, such therapies are not indicated for children due to the side effects [45]. We expect treatment with acupoints to improve the anxiety of these children and cause a decrease of cortisol levels. While the attention given to the children during treatment could have a positive effect on decreasing anxiety, all groups will be subject to this bias.

To date, there are no randomised, controlled, clinical trials on this subject and the proposed study is expected to contribute to different fields of knowledge, such as pediatrics, dentistry, physical therapy, speech therapy, etc.

Figure 1 - Low-level laser parameters

Trial status

The authors are currently recruiting participants. This began in July 2016 and we plan to continue until October 2016.

List of abbreviations

LLLT - low level laser

EMG - eletromyography

MVC - maximum voluntary contraction

Declarations

Ethical approval and consent to participate: This study will be conducted in compliance with the norms governing research involving human subjects, following approval from the Institutional Review Board of University Nove de Julho (Brazil) under process number 1.333.636. The participants and/or legal guardians will receive clarifications regarding the objectives and procedures and will sign a statement of informed consent agreeing to participate in the study.

Consent for publication: not applicable

Availability of data and material: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests

Funding: Grant # 2015/13180-2, São Paulo Research Foundation (FAPESP)

Authors' contributions: ACCM, MLLG and CHLG participated in the conception and design of the study, data collection and drafting of the present manuscript. ACCM, CCB, and MCCS helped draft the manuscript and participated in data collection. MMP, ACRH and LJM performed statistical analyses and contributed to the design of the study. LJM, SKB and CCB critically reviewed the manuscript for intellectual content. OMA and SKB conceived the study, coordination, and

helped draft the manuscript. PBM participated in the formatting of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments: The authors gratefully thank University of Nove de Julho for its technological support. This work was supported by a FAPESP research assistance grant (Process: 2015/13180-2).The authors declare that there is no funding.

REFERENCES

1. Darien IL. Sleep related bruxism. In: International classification of sleep disorders. 3rd ed. American Academy of Sleep Medicine. 2014.
2. Bader G, Lavigne G. Sleep bruxism: an overview of an oromandibular sleep movement disorder. *Sleep Med Reviews*. 2000;4:27-43.
3. Lobbezoo F, Zaag JUD, Naeije M. Bruxism: its multiple causes and its effects on dental implants - an updated review. *J Oral Rehabil*. 2006;33(4):293-300.
4. Aloé F, Gonçalves LR, Azevedo A, Barbosa RC. Bruxismo durante o sono. *Rev Neurociências*. 2003;11(1):4-17.
5. Motta LJ, Bortoletto CC, Marques AJ, Ferrari RA, Fernandes KP, Bussadori SK. Association between respiratory problems and dental caries in children with bruxism. *Indian J Dent Res*. 2014;25(1):9-13.
6. Bortoletto CC, Cordeiro da Silva F, Silva PF, Leal de Godoy CH, Albertini R, Motta LJ, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Romano R, Bussadori SK. Evaluation of Cranio-cervical Posture in Children with Bruxism Before and After Bite Plate Therapy: A Pilot Project. *J Phys Ther Sci*. 2014;26(7):1125-8.

7. Behr M, Hahnel S, Faltermeier A, Bürgers R, Kolbeck C, Handel G, Proff P. The two main theories on dental bruxism. *Annals of Anatomy-AnatomischerAnzeiger*, 2012;194(2): 216-9.
8. Shetty S, Pitti V, Babu CS, Kumar GS, Deepthi BC. Bruxism: a literature review. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 2010;10(3), 141-148.
9. Muzalev K, Lobbezoo F, Janal MN, Raphael KG. Inter-episode sleep bruxism intervals and myofascial face pain. *Sleep*. 2017.
10. De Boever JÁ, Steenks MH. Epidemiologia, sintomatologia e etiologia da disfunção craniomandibular. In: STEENKS, M.H. & WIJER, A. *Disfunção da articulação temporomandibular do ponto de vista da fisioterapia e da odontologia- diagnóstico e tratamento*. Translation by Hildegard Thiemann Buckup. São Paulo, Santos:1996.p.35-43.
11. Manfredini D, Landi N, Fantoni F, SeguM, Bosco M. Anxiety symptoms in clinically diagnosed bruxers. *Journal of oral rehabilitation*. 2005; 32(8), 584-8.
12. Oliveira M, Bittencourt S, Marcon K, Destro S, Pereira, J. Sleep bruxism and anxiety level in children. *Brazilian oral research*, 2015; 29(1), 1-5.
13. Gungormus Z, &Erciyas K. Evaluation of the relationship between anxiety and depression and bruxism. *Journal of International Medical Research*. 2009; 37(2), 547-50.
14. Rodrigues CK, Ditterich RG, Shintcowsk RL, Tanaka O. Bruxismo: uma revisão da literatura. *Ci BiolSaúde UERG*. Set 2006;12(3):13-21.
15. Lavigne GJ, Rompe RH, Montplaisir JY. Sleep bruxism: validity of clinical research diagnostic criteria in a controlled polysomnographic study. *J Dent Res*. 1996;75(1):546-55.
16. Kato T, Montplaisir JY, Guitard F, Sessle BJ, Lund JP, Lavigne GJ. Evidence

that experimentally induce sleep bruxism is a consequence of transient arousal.

J Dent Res. 2003;82:284-8.

17. Tsukiyama Y, Baba K, Clark GT. An evidence-based assessment of occlusal adjustment as a treatment for temporomandibular disorders. J Prosthet Dent. 2001;86(1):57-66.

18. Solberg WK, Clark GT, Rugh JD. Nocturnal electromyographic evaluation of bruxism patients undergoing short term splint therapy. J Oral Rehabil. 2007;2:215-23.

19. McLean L, Chislett M, Keit M, Murphy M, Walton P. The effect of head position, electrode site, movement and smoothing window in the determination of a reliable maximum voluntary activation of the upper trapezius muscle. J Electromyography and Kinesiology; 2003. p. 169-80.

20. Hachmann A, Martins EA, Araujo FB, Nunes R. Efficacy of the nocturnal bite plate in the control of bruxism for 3 to 5 year old children. J Clin Pediatr Dent. 1999;24(1):9-15.

21. Venezian GC, Silva MAMR, Mazzetto RG, Mazzetto MO. Low level laser effects on pain to palpation and electromyographic activity in TMD patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. J Craniomandib Pract. 2010;28(2):84-91.

22. Dallanora LJ, Faltin PP, Inoue Rt, Aranha dos Santos VM, Tanaka J. Avaliação do uso de acupuntura no tratamento de pacientes com bruxismo. nov/dez 2004;52(5):333-9.

23. Wen, Tom Sintan. Acupuntura clássica chinesa. São Paulo: Cultrix, 2006 p.15-17.

24. Carlsson GE, Egermark I, Magnusson T. Predictors of bruxism, other oral parafunctions, and toothwear over a 20-year follow-up period. *J OrofacPain.* 2003;17(1): 50-7.
25. Epelbaum E. tratamento da deficiência neurosensorial por laser em baixa potência e sua associação a acupuntura a laser. Dissertação – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC; 2007.
26. King CE et al. Effect of Helium-Neon laser auriculotherapy on experimental pain threshold. *PhysTher.* 1990;70(1): 38-44.
27. Siedentopf CM et al. Laser acupuncture induced specific cerebral cortical and subcortical activations in humans. *Lasers in medical Science.* 2005; 20:68-73.
28. Serra-Negra JM, Paiva SM, Seabra AP, Dorella C, Lemos BF, Pordeus IA. Prevalence of sleep bruxism in a group of Brazilian schoolchildren. *EurArchPediatrDent.* 2010; 11(4):192-5.
29. Manfredini D, Restrepo C, Diaz-Serrano K, Winocur E, Lobbezoo F. Prevalence of sleep bruxism in children: A systematic review of the literature. *J Oral Rehabil.* 2013;40:631–42.
30. Carvalho CM, Lacerda JÁ, Neto FPS, Cangussu MCT, Marques AMC, Pinheiro ALB. Wave length effect in temporomandibular joint pain: a clinical experience. *Lasers MedSci.* 2010; 25: 229-32.
31. Tartaglia GM, Rodrigues Moreira, da Silva MA, Bottini S, Sforza C. Masticatory muscle activity during maximum voluntary clench in different research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) groups.

Man Ther. 2008;13: 434–40.

32. Falla D, Arendt-Nielsen L, Farina, D. The pain-induced change in relative activation of upper trapezius muscle regions is independent of the site of noxious stimulation. *ClinNeurophysiol.*2009; 120: 150–7.

33. Moyers RE. Etiologia da Maloclusão. In: Moyers RE. *Ortodontia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991: 157-59/212-37.59.

34. Ferrario VF, Sforza C, Colombo A, Ciusa V. An electromyographic investigation of masticatory muscles symmetry in normo-occlusion subjects. *J Oral Rehab.* 2000;27:33-40.

35. Tartaglia GM, Lodetti G, Paiva G.D, Felicio CM, Sforza C. Surface eletromyography assessment of patients with long lasting temporomandibular joint disorder pain. *J ElectromyogrKinesiol* 2011;21: 659-64.

36. Santos MJP, Bernabé DG, Nakamune ACMS, Perri SHV, Aguiar SMHCA, Oliveira SHP. Salivary alpha amylase and cortisol levels in children with global developmental delay and their relation with the expectation of dental care and behavior during the intervention. *Res Develop Disabil.* 2012;33(2):499-505.

37. Restrepo CC, Medina I, Patiño I. Effect of occlusal splints on the temporomandibular disorders, dental wear and anxiety of bruxist children. *Eur J Dent.* 2011;5(4), 441-50.

38. Lobbezoo F, Ahlberg J, Glaros AG, Kato T, Koyano K, Lavigne G, et al. Bruxism defined and graded: an international consensus. *J Oral Rehab* 2013; 40:2–4.

39. Alkan A, Bulut, E, Arici S, Sato S. Evaluation of treatments in patients with

nocturnal bruxism on bite force and occlusal contact area: a preliminary report. Eur J Dent. 2008;2(4), 276-282.

40. Bruce J, Davis EP, Gunnar MR - Individual differences in childrens cortisol response to the beginning of a new school year. Psychoneuroendoc. 2002;27(6):635-50.

41. Gunnar MR, Donzella B - Social regulation of the cortisol levels in early human development. Psychoneuroendoc. 2002;27(1-2):199-220.

42. Silva ML, Mallozi MC, Ferrari GF. Salivary cortisol to assess the hypothalamic-pituitaryadrenal axis in healthy children under 3 years old. J Pediatr. 2007; 83(2):121-6.

43. Saletu A, Parapatics S, Saletu B, Anderer P, Prause W, Putz H, Saletu-Zyhlarz GM. On the pharmacotherapy of sleep bruxism: placebo-controlled polysomnographic and psychometric studies with clonazepam. Neuropsychobiology. 2005;51(4), 214-25.

44. Huynh N, Manzini C, Rompré PH, Lavigne GJ. Weighing the potential effectiveness of various treatments for sleep bruxism. J Can Dent Assoc, 2007;73(8), 727-30.

45. Reimão R, Lefèvre AB. Evaluation of flurazepam and placebo on sleep disorders in childhood. Arquivos de neuro-psiquiatria. 1982;40(1), 1-13.

Additional files

Additional file 1

Microsoft Word

Figure 1 – Wong-Baker FACES Pain Rating Scale

Additional file 2

Microsoft Word

Chart 1 - Points irradiated and respective explanations

Additional file 3

Microsoft Word

Chart 2 - Proposed experimental conditions

Additional file 4

Microsoft Word

Figure 2 - Low-level laser parameters

Additional file 5

PDF

Flow diagram

72 Artigo II

Title: Evaluation of stress biomarkers levels in saliva, muscle strength and clinical signs in a randomized controlled trial photobiomodulation therapy in children with sleep bruxism.

Authors: Salgueiro MC, Kobayashi FY, Motta LJ, Mesquita-Ferrari RA, Gonçalves MLL, Fernandes KP, Bussadori SK.

Ms. Monica da Consolação Canuto Salgueiro (1); e-mail: monicasalgueiro@globocom.com

MS. Fernanda Yukie Kobayashi(1); e-mail: fernandaykobayashi@gmail.com

PhD, Ms. Lara Jansiski Motta(2,3); e-mail: larajmotta@terra.com.br

PhD, Ms. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari(2); e-mail: raquel.mesquita@gmail.com

MS. Marcela Letícia Leal Gonçalves(1); e-mail: marcelalleal@hotmail.com

PhD, Ms. Kristianne Porta Santos Fernandes(2); e-mail: kristianneporta@gmail.com

PhD, Ms. Sandra Kalil Bussadori(2); e-mail: sandra.skb@gmail.com

Affiliations:

1- Doctor's Student in Rehabilitation Sciences, University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

2- Professor of the Master's and Doctoral Program in Rehabilitation Sciences and Biophotonics Applied University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

3- Professor of Professional Master's in administration, management in health systems, University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Sandra Kalil Bussadori

Address: Rua Vergueiro, 235 Brasil. CEP: 570300-400

Phone: 55 82 999179282

Email: sandra.skb@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: sleep bruxism (SB) etiology can be related stress factors with SB. Cortisol salivary levels is a biomarker, which one has been used as a method noninvasive to evaluate quantitatively stress response. Besides physiological aspects, morphological aspects are also important. One of them very study is muscle strength by bite force evaluation. Treatments are also difficult for them, because the gold standard, occlusal splints therapy, has some limitations, like cooperation to use it full time. **AIM:** the present study aimed to evaluate investigate the occurrence of bite marks on the buccal mucosa in children with sleep bruxism (SB), as a complement sign to diagnosis, and the effectiveness of photobiomodulation, as an alternative treatment for SB. **METHODS:** 76 children, aged 6-12 years old, were divided in four groups: G1- With SB, Laser therapy treated in acupuncture points ($\lambda=786,94$ nm, 1 J , 1.675 mW/cm², 70Mw, 20 s/point); G2 – With SB, Occlusal Splint treated, G3 – With SB, Placebo treated; and G4 – Without SB, Control group. Before and after treatments, was evaluated clinical signs, as bite marks on jugal mucosa and headaches, bite force and stress biomarkers on saliva. . Statistical analysis was performed with the aid of the SPSS 20.0 program with a 5% significance level ($p \leq 0.05$), using Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk and Anova tests **RESULTS:** Bite marks on jugal mucosa is a clinical signs with a positive association with SB presence ($p<0.001$). A statistically significant difference between the frequency of children with headache before and after treatment in the G1 ($p=0.0005$) and G2 ($p=0.0001$) groups , but there was no difference between the two groups (G1 and G2) . G1 presented lower BF when compared to the other groups on both sides (means = 16.36 kg / F; SD = 3.99. In an intra-groups analysis after treatments, all groups showed an increase in salivary cortisol levels. **CONCLUSION:** Photobiomodulation therapy had good response in SB children as a decrease of headache report and reduction on bite force. Bite marks on jugal mucosa can be complement to clinical SB diagnosis.

KEY-WORDS: photobiomodulation, laser, children, sleep bruxism

Introduction

Sleep bruxism (SB) is a muscle disorder characterized by clenching and grinding teeth and occurs in adults and children (1). There is a type which occurs during at night, *sleep bruxism or primary*, and there is another which occurs during the day, *awake bruxism or secondary* (2). SB diagnosis in adults is made by a polysomnography exam, however in children there is no protocol yet (3). Thus, a complete clinical exam is important to diagnose SB correctly and earlier.

SB is often seen in children and adolescents, with a prevalence of between 3.5% and 40.6%, depending on the diagnostic method used (4). SB presence in childhood may be viewed as a predictor of adult SB (5). Children with sleep bruxism may have additional symptoms during the day, such as headaches, earaches, and pain in the masticatory muscles. According to Fulgencio et al. (6) SB in young children can also be associated with fatigue of the masticatory musculature, headaches, and noisy breathing during sleep.

SB treatments has been studied a lot (7). Occlusal splints therapy (OST) is a gold standard choice yet, for adults and children (8). But there are some limitations as cooperative in using it for children. Alternative treatments have been studied to use instead of OST. Photobiomodulation were studied successfully in adults in acupuncture points for Temporomandibular Disorder (TMD), another muscle disorder (9).

The evaluation of these SB treatments can be done by morphological analyses, like muscle strength analysis by bite force (10)(11). In photobiomodulation studies in muscle therapies, there was good results in muscle performance, including strength (9). Another variable is a physiological analysis, utilizing salivary cortisol levels. Cortisol levels has been used to investigate stress response in individual, including muscle disorders (12).

Others studies showing good results in muscle disorders with photobiomodulation therapy (13–15) however none of them in SB patients. Thus, this study aimed to evaluated a randomized and controlled trial of the photobiomodulation therapy and occlusal splints therapy in children with sleep bruxism.

Material and Methods

Sample

The present study was approved by the Human Research Ethics Committee of the *Universidade Nove de Julho* (Brazil), process nº 1.333.636 and CAAE 49730215.2.0000.5511 (Clinical Trials: NCT02757261). Parents and guardians signed an informed consent statement authorizing the participation of their children, containing objectives and procedures of the present project. Children between 6-12 years old were selected randomly the *Universidade Nove de Julho's* Pediatric Clinic School of Dentistry, where all data can be find in database, available at the *Universidade Nove de Julho*.

The inclusion criteria were children with first molars in Angle Class I occlusion, dental caries free, absence of physical motor deficiency reported by parents, or an inappropriate patient's behavior during treatment and/or assessment. The exclusion criteria were use of medication, which can interfere in muscle assessment, for example antidepressants, analgesics, anti-inflammatories and muscle relaxants, and has undergone any type of therapy for bruxism.

The sample size was calculated using researcher's specification that an increase in deviation standard of the responses for which hypothesis would be rejected was $p=20\%$. Considering a maximum significant level of $\alpha=0.05$ and a minimum test power of $1-\beta$ (probability of rejecting H_0 when it is false) $=0.95$, Φ is approximately 2.2. Thus, $n \div 1.2$ and the number of repetitions in each group is 19 individuals.

SB diagnoses

SB diagnosis was obtained according to American Academy of Sleep Medicine (AASM) guideline: guardian's report audible sounds and presence of wear facets in permanent teeth. Other clinical sign evaluated to complement the assessment were bitemarks in jugal mucosa. Seventy six children, aged 6-12 years old were divided into 4 groups: G1- With SB, Laser therapy treated in acupuncture points ($\lambda=94$ nm, 5 J/cm², 1.675 mW/cm², 0,070W, 20 s/point); G2

– With SB, Occlusal Splint treated, G3 – With SB, Placebo treated; and G4 – Without SB, Control group. All were evaluated according to muscle strength, assessed by a digital gnathodynamometer. Statistical analysis was performed with the aid of the SPSS 20.0 program with a 5% significance level ($p \leq 0.05$), using Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk and Anova tests.

Anamnesis

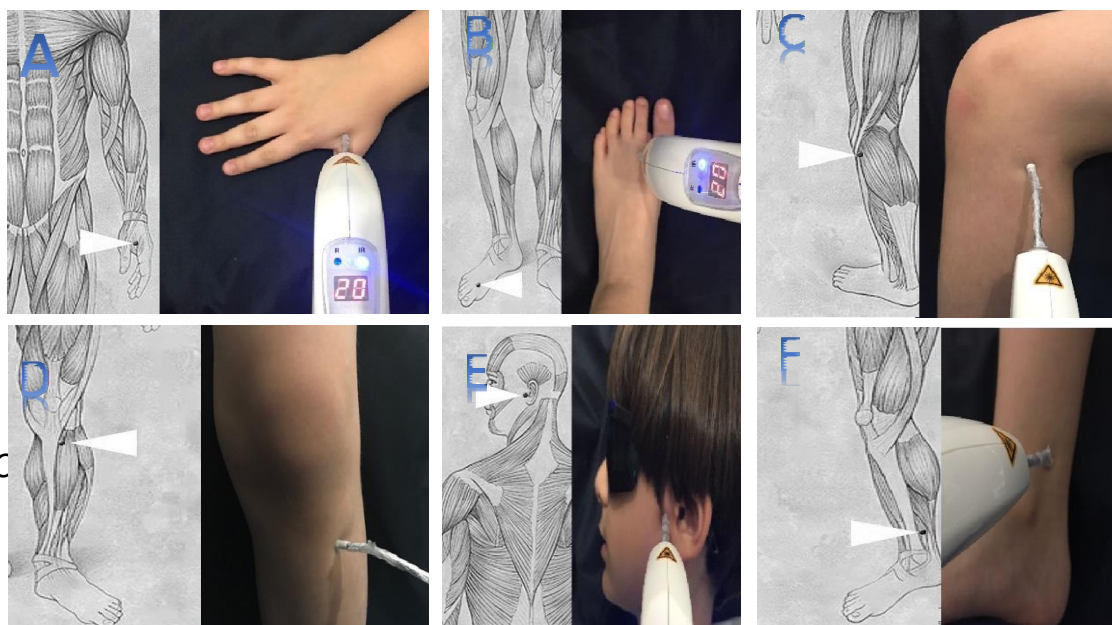
A questionnaire was sent to the parents or guardians. In addition to investigating part of the diagnosis of bruxism, clinical symptoms such as presence of headache and non-nutritional parafunctional habits were evaluated.

Therapies

- Photobiomodulation

Twelve laser sessions were performed, 2 sessions per week, using Therapy EC® - DMC (786.94 nm, 1 J, 1,675 mW / cm², 70mW (0.070W), 0,04 cm², 20 seconds per acupuncture points). Carvalho et al 50 and Venezian et al 44. Figure 1 showed all points.

Figure 1: **A) IG-4 (hegu)** - On the radial side, between the 1st and 2nd metacarpal bones, it acts on the face, eyes, ears, nose and mouth. It is also used to calm the mind and relieve anxiety. **B) F-3 (taichong)** - In the depression between the 1st and 2nd metatarsals, close to the metatarsal bases. Deep soothing effect on the mind. Its soothing action is increased when combined with IG-4. **C) VB-34 (yanglingquan)** - In the anterior and lower depression of the fibula head is an important point to relax the tendons whenever there are contractions of the muscles. **D) E-36 (zusanli)** - 3 cm below the patella, 0.5 cm lateral to the anterior margin of the tibia. Indicated for treating irritability, depression, insomnia, tiredness, fatigue and headache. **E) ID-19 (tinggong)** - In a depression anterior to the ear above the tragus indicated to treat problems in the ear and TMJ dysfunction. **F) BP-6 (sanyinjiao)** - 3 cm above the prominence of the medial malleolus, on the posteromedial margin of the tibia. This is one of the most important points, with broad scope of action. It has a strong soothing action on the mind, being generally used for insomnia.



Occlusal splints (OS) was made of acrylic resin and used on superior arch. Impressions were made using alginate, cast in stone gypsum and mounted on the semi-adjustable articulator. OS had a thickness of 3mm, contact of all teeth in centric relation, posterior tooth dislocation in laterality and protrusion, avoiding interference on the balance side with the canine guide extending in the vestibular region to the lingual enough to prevent perforation and increase the impact resistance was also placed an expander, so that it can be used to monitor the dynamics of growth. Children used during the night for 2 months with a week intervals of adjustments. Activation was performed in $\frac{1}{4}$ turn only when needed, when there was lack of retention and stability of the device in the arch.

Analysis

- Bite force (BF)

A digital dynamometer (DMD, Kratos Equipamentos Industriais Ltda, Cotia, SP, Brazil) was utilized to assess BF. This electronic device is composed of a plate with 2mm diameter, providing BF values in Newton(N). Volunteers received instructions for training in maximum BF, becoming familiar to device. They were placed with Camper plane parallel to ground. Six five-second readings were taken—three on left side and three on right, alternating between sides for each reading, with a one-minute rest interval between readings.

- Salivary cortisol levels

Saliva was collected on swabs before and 60 days after treatment. The collections were performed respecting the circadian rhythm of the cortisol, being in all two samples of saliva, one in the house of the volunteers, at 9 o'clock in the morning and another before bed. All samples were observed for 1 hour of fasting, followed by oral hygiene with water. The cotton containing the saliva was placed in another tube, centrifuged and stored at -20°C . The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was then performed.

Results

Table 1 showed the association between bruxism and bite marks on jugal mucosa, headache, age, and gender. There was no statistically significant association between gender, age and headache with the presence of bruxism. There was a statistically significant association ($p < 0.05$) between bite marks on jugal mucosa and sleep bruxism.

Table 1. Association between bruxism, bite marks, age and gender.

		Bruxism		<i>P values</i>
		No	Yes	
Gender	Male	10 (28.6%)	25 (71.4%)	<i>p=0.344</i>
	Female	9 (22.0%)	32 (78.0%)	
Bite marks	No	17 (58.5%)	12 (41.4%)	<i>p<0.001*</i>
	Yes	2 (4.3%)	45 (95.7%)	
Headache	No	7 (31.8%)	15 (68.2%)	<i>p<0.381</i>
	Yes	12 (22.2%)	42 (77.8%)	

* $p<0,05$ (Chi-square test/ Fisher's exact test)

Table 2 showed a statistically significant difference between the frequency of children with headache before and after treatment in the G1 and G2 groups, but there was no difference between the two groups (G1 and G2).

Table 2: Association between before and after treatment in all groups and headache.

	Headache	No	Yes	Significance
G1	Before	4 (21.05%)	15 (78.95%)	<i>p=0.005*</i>
	After	12 (63.15%)	7 (36.85%)	
G2	Before	5 (26.31%)	14 (73.69%)	<i>p=0.001*</i>
	After	16 (84.21%)	3 (15.79%)	
G3	Before	6 (31.57%)	13 (68.43%)	<i>p=0.157</i>
	After	8 (42.10%)	11 (57.9%)	
G4	Before	7 (36.84%)	12 (63.16%)	<i>p=0.317</i>
	After	8 (42.10%)	11 (57.9%)	

* $p<0,05$

In an inter groups analyses, observed in Table 3, a statistically significant difference was observed between the BF on the left side before the treatment between G1 and G3. It was observed that after treatment, G1 presented lower BF when compared to the other groups on both sides (means = 16.36 kg / F; SD = 3.99). The G3 presented the highest BF mean for the left side, before and after treatment (means = 27.93; SD = 7.83).

		n	Means	SD	IC (95%)		sig
Bite force on the left side	G1	19	29.492 1	9.92421	24.7088	34.2754	<i>p=0.021*</i>
	G2	19	23.116 8	10.95891	17.8348	28.3989	
	G3	19	21.899 5	5.70204	19.1512	24.6478	
	G4	19	22.828 4	4.05646	20.8733	24.7836	
	Total	76	24.334 2	8.56765	22.3764	26.2920	
Bite force on the right side	G1	19	27.128 4	8.59126	22.9876	31.2693	<i>p=0.108</i>
	G2	19	21.558 9	8.15538	17.6282	25.4897	
	G3	19	22.206 8	8.73903	17.9948	26.4189	
	G4	19	22.470 5	4.39811	20.3507	24.5903	
	Total	76	23.341 2	7.84885	21.5476	25.1347	

Table 3: Bite force inter-groups analysis.

* $p < 0.05$

In an intra-groups analysis after treatments, all groups showed an increase in salivary cortisol levels, with G3 presenting higher levels than the others, as described in Table 4.

Table 4: Salivary cortisol levels medians about before and after treatments.

	Salivary Cortisol levels	Median	sig
G1	Before	0.510	
	After	0.910	p=0.001*
G2	Before	0.400	p=0.009*
	After	0.880	
G3	Before	1.010	
	After	2.990	p=0.001*
G4	Before	0.480	
	After	0.950	p=0.005*

Kruskal-Wallis test

Discussion

Studies addressing sleep bruxism in children have increased in the literature due to associations with respiratory problems, tooth wear, dental caries and malocclusion (16,17). Tachibana et al. (2016) (17) found a prevalence rate of 21.0% in a sample of 1263 children, with a higher rate in the five-to-seven-year-old age group (27.4%). The high prevalence underscores the importance of an early, precise diagnosis. Although polysomnography is considered the gold standard for the diagnosis of SB in adults, there is no protocol for the execution of this complementary test in children (3). Thus, a precise clinical examination is important to the diagnosis of childhood SB.

Presents results showed SB and bite marks on jugal mucosa have statistically differences. According to the ICSD-3, SB is diagnosed in the presence of tooth wear on the incisal/occlusal portion of permanent teeth and reports by parents/caregivers regarding the occurrence of clenching and/or grinding the teeth. As expected, a significant association was found in the present study between tooth wear and SB.

In Table 2, differences between the frequency of children with headache before and after treatment in the G1 and G2 groups were found. Headaches are a symptom very common, such as migraines and tension headaches, last one is the most common (18). It is the result of poor posture or stress Stress has been associated with SB in literature (19). Tension headaches and SB involve muscle

contractions caused by constantly stress . However, in most of headaches reported, the pain ceased with sleep, which means a poor sleep quality, with a lack of restful sleep, corroborating with Herrerra et al²⁹, who observed that SB children have a higher number of nocturnal microarousals, which seems to be associated with an increase in behavior and attention issues. Some sleep disorders lead to an attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) (20) so, it get more difficult to treat with OPT, then alternative therapies get more importance to be efficient.

Evaluation of masticatory muscles strength determines quantify the force available to cut or crush the food, and the bite force is indicative of its magnitude. In the present study, G1 presented lower BF, when compared to the other groups on both sides. This study does not corroborate other studies that evaluated morphological characteristics of the muscles before photobiomodulation therapy. In clinical studies using photobiomodulation therapy, maximal muscle contraction increased after laser applications(21). Another study evaluated photobiomodulation therapy in patients with mandibular fracture on mandibular. Their results showed an increase in BF after photobiomodulation therapy. Although present results go to the opposite to the literature indicates, bite force lower in a sleep bruxism case may provide a muscle relaxing necessary to cause less damage to tissues, due to intense muscle contraction. There are a lot of consequences already pointed by literature about several SB consequences , as association with temporomandibular disorders, headaches, dental wear facets, limitations in open mouth, fatigue, tiredness (1,4). In another study, present study got the same reduction in BF in a photobiomodulation therapy as OPT had in adults (22), showing an alternative therapy for cases that OPT is inviable in children.

Another evaluation was salivary cortisol level. In the present study, an increase in biomarker levels was observed in all groups after treatments, which not corroborate with an study in adults, where salivary cortisol levels decreased in OST group (22). Another study did not corroborate as well. A moderate positive correlation between muscle activity and biomarker levels in SB children (23). However, when compared in another muscle disorder, temporomandibular disorders (TMD), children with or without TMD did not show differences in salivary cortisol levels(12). It can be explained by an associated in literature in salivary

cortisol with an acute cortisol response to a stressor and hair cortisol reflects cumulative cortisol exposure (24). As bruxism is a chronic condition, which patient is exposed to several stressors for a certain period. Environmental factors, including different equipment, could influence as an acute stressor. So, for this protocol, maybe some stress response could be observed in hair cortisol, instead of saliva. Authors suggest more studies about.

Conclusion

The results suggest a complementary sleep bruxism diagnostic, observing bite marks on buccal mucosa, improving the diagnostic accuracy, especially in children. About treatments, photobiomodulation in acupuncture points turned it out an alternative treatment in children with SB, reducing headache report and a decrease BF. Cortisol salivary levels increase in all groups after therapies, probably as influence of acute stressor.

ACKNOWLEDGEMENTS/DISCLOSURE

Authors would like to thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financing this study, and declare no conflicts of interest.

FUNDING

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), protocol 2015/13180-2, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), protocol 305905/2014-7 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) protocol 1573522, provided financial support. The sponsor had no role in design or conduct of present research.

References

1. Murali R V, Rangarajan P, Mounissamy A. Bruxism: Conceptual discussion and Review. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2015;7(Suppl 1):S265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439689/>
2. Serra-Negra JM, Scarpelli AC, Tirsá-Costa D, Guimarães FH, Pordeus

- IA, Paiva SM. Sleep bruxism, awake bruxism and sleep quality among Brazilian dental students: A cross-sectional study. *Braz Dent J*. 2014;25(3):241–7.
3. Restrepo C, Manfredini D, Castrillon E, Svensson P, Santamaria A, Alvarez C, et al. Diagnostic accuracy of the use of parental-reported sleep bruxism in a polysomnographic study in children. *Int J Paediatr Dent*. 2016;1–8.
 4. Manfredini D, Restrepo C, Diaz-Serrano K, Winocur E, Lobbezoo F. Prevalence of sleep bruxism in children: A systematic review of the literature. Vol. 40, *Journal of Oral Rehabilitation*. 2013. p. 631–42.
 5. Eftekharian A, Raad N, Gholami-Ghasri N. Bruxism and adenotonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008;72(4):509–11.
 6. Fulgencio LB, Corrêa-Faria P, Lage CF, Paiva SM, Pordeus IA, Serra-Negra JM. Diagnosis of sleep bruxism can assist in the detection of cases of verbal school bullying and measure the life satisfaction of adolescents. *Int J Paediatr Dent*. 2016;1–9.
 7. Mesko ME, Hutton B, Skupien JA, Sarkis-Onofre R, Moher D, Pereira-Cenci T. Therapies for bruxism: a systematic review and network meta-analysis (protocol). *Syst Rev [Internet]*. 2017;4–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0397-z>
 8. Shetty S, Pitti V, Babu CLS, Kumar GPS, Deepthi BC. Bruxism: A literature review. *J Indian Prosthodont Soc*. 2010;10(3):141–8.
 9. Huang Y-F, Lin J-C, Yang H-W, Lee Y-H, Yu C-H. Clinical effectiveness of laser acupuncture in the treatment of temporomandibular joint disorder. *J Formos Med Assoc [Internet]*. 2014;113(8):535–9. Available from: <http://www.jfma-online.com/article/S0929664612003944/fulltext>
 10. de Campos MM, Kobayashi FY, Barbosa T de S, Costa S da S, Lucas B de L, Castelo PM. Characteristics of salivary secretion in normal-weight, overweight and obese children: A preliminary study: Salivary composition and excessive fat tissue. *Odontology*. 2014;102(2):318–24.
 11. Kobayashi FY, Furlan NF, Barbosa TS, Castelo PM, Gavião MBD. Evaluation of masticatory performance and bite force in children with sleep bruxism. *J Oral Rehabil*. 2012;39(10):776–84.
 12. Kobayashi FY, Gavião MBD, Marquezim MCS, Fonseca FLA, Montes ABM, Barbosa T de S, et al. Salivary stress biomarkers and anxiety symptoms in children with and without temporomandibular disorders. *Braz Oral Res [Internet]*. 2017;31:e78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29019550>
 13. Elsdon DS, Spanswick S, Zaslowski C, Meier PC. Protocol: Testing the Relevance of Acupuncture Theory in the Treatment of Myofascial Pain in the Upper Trapezius Muscle. *JAMS J Acupunct Meridian Stud [Internet]*. 2017;10(1):67–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2016.11.007>
 14. da Silva MM, Albertini R, Leal-Junior ECP, de Tarso Camillo de Carvalho P, Silva JA, Bussadori SK, et al. Effects of exercise training and photobiomodulation therapy (EXTRAPHOTO) on pain in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials [Internet]*. 2015;16(1):252. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4464876&tool=>

- pmcentrez&rendertype=abstract
15. Yeh M-C, Chen K-K, Chiang M-H, Chen C-H, Chen P-H, Lee H-E, et al. Low-power laser irradiation inhibits arecoline-induced fibrosis: an in vitro study. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2017;9(1):38–42. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ijos.2016.49>
 16. Serra-Negra JM, Aquino MS, Silva MES, Abreu MH, Silveira RR. Tooth wear and sleep quality: A study of police officers and non-police officers. *Cranio®* [Internet]. 2016;9634(December):1–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08869634.2016.1263275>
 17. Tachibana M, Kato T, Kato-Nishimura K, Matsuzawa S, Mohri I, Taniike M. Associations of sleep bruxism with age, sleep apnea, and daytime problematic behaviors in children. *Oral Dis*. 2016;22(6):557–65.
 18. Fernandes G, Franco AL, Gonçalves DA, Speciali JG, Bigal ME, Camparis CM. Temporomandibular disorders, sleep bruxism, and primary headaches are mutually associated. *J Orofac Pain* [Internet]. 2013;27(1):14–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424716>
 19. Wieckiewicz M, Paradowska-Stolarz A, Wieckiewicz W. Psychosocial aspects of bruxism: The most paramount factor influencing teeth grinding. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 20. Cohen-Zion M, Ancoli-Israel S. Sleep in children with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): A review of naturalistic and stimulant intervention studies. *Sleep Med Rev*. 2004;8(5):379–402.
 21. de Oliveira AR, Vanin AA, Tomazoni SS, Miranda EF, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, et al. Pre-Exercise Infrared Photobiomodulation Therapy (810nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans: What Is the Optimal Power Output? *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2017;35(11):595–603. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2017.4343>
 22. Rosar JV, Barbosa T de S, Dias IOV, Kobayashi FY, Costa YM, Gavião MBD, et al. Effect of interocclusal appliance on bite force, sleep quality, salivary cortisol levels and signs and symptoms of temporomandibular dysfunction in adults with sleep bruxism. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017;82:62–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.05.018>
 23. Karakoulaki S, Tortopidis D, Andreadis D, Koidis P. Relationship Between Sleep Bruxism and Stress Determined by Saliva Biomarkers. *Int J Prosthodont* [Internet]. 2015;28(5):467–74. Available from: [http://quintpub.com/journals/ijp/abstract.php?iss2_id=1325&article_id=15583&article=4&title=Relationship Between Sleep Bruxism and Stress Determined by Saliva Biomarkers#.WATv0Vuhxz8](http://quintpub.com/journals/ijp/abstract.php?iss2_id=1325&article_id=15583&article=4&title=Relationship%20Between%20Sleep%20Bruxism%20and%20Stress%20Determined%20by%20Saliva%20Biomarkers#.WATv0Vuhxz8)
 24. Kao K, Doan SN, St. John AM, Meyer JS, Tarullo AR. Salivary cortisol reactivity in preschoolers is associated with hair cortisol and behavioral problems. *Stress* [Internet]. 2017;0(0):1–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10253890.2017.1391210>

8. ANEXOS

ANEXO 1

Nome do Voluntário: _____
 Endereço: _____
 Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____ E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental: “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR, FORÇA DE MORDIDA E CORTISOL SALIVAR EM CRIANÇAS COM BRUXISMO ANTES E APÓS O USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM ACUPONTOS - ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO”

2. Objetivo: Avaliar a atividade eletromiográfica dos músculos masseteres, temporais e trapezoidais, força de mordida, contatos oclusais e níveis de cortisol salivar, empregando a terapia com laser de baixa potência nos acupontos em crianças com bruxismo.

3. Justificativa: O bruxismo é considerado uma atividade caracterizada pelo ranger dos dentes e/ou segurar ou impulsionar a mandíbula, muito frequente em crianças, causando desgaste dental, ruído, desconforto e ansiedade que pode muitas vezes causar dor e comprometer movimentos mandibulares, diminuindo a qualidade de vida da criança. Sendo assim, medidas de controle e tratamento devem ser tomadas pelos profissionais baseado na ênfase que se tem dado as medidas preventivas em relação às doenças e alterações que possam causar danos ao desenvolvimento fisiológico infantil. O uso do laser de baixa potência é indicado por promover efeito antiinflamatório e analgésico, porém, não invasivo, de baixo custo, que pode proporcionar como benefício ao paciente alívio da dor.

4. Procedimentos da Fase Experimental: Crianças na faixa etária de 6 a 8 anos sem limitações físicas ou psíquicas, que apresentem os primeiros molares irrompidos, ausência de lesão cárie. O critério clínico de desgaste dental e o questionamento dos pais ou responsáveis serão utilizados para o diagnóstico do bruxismo nos participantes, de acordo com os critérios da American Academy of Sleep Medicine (AASM). Todos os participantes serão submetidos à avaliação da atividade muscular com o dispositivo BTS (Dispositivo sem fio para análise da atividade eletromiográfica de superfície) aderido a pele, antes e depois da terapia com laser e placa oclusal. Todos os grupos serão coletadas amostras de saliva em casa logo após a criança acordar por apenas duas vezes uma no início e outra após os procedimentos para análise do cortisol salivar, a coleta é simples e fácil e avaliará o nível do cortisol presente nas crianças. Dos 4 grupos, 1 receberá tratamento com laser e 1 tratamento placebo. Será utilizado o tratamento pontual, em contato com a pele; a ponta ativa será coberta com plástico transparente evitando a contaminação cruzada e por motivo de higiene será realizada limpeza facial com álcool 70%. Serão realizadas 12 sessões de laser no total, sendo 1 sessão por semana.

5. Desconforto ou Riscos Esperados: É possível que aconteçam algum desconforto ou riscos, como por exemplo, algum tipo de reação alérgica devido ao adesivo do BTS, pois ele fixado na pele, porém isto será previsível e as pesquisadoras estarão preparadas para resolução.

6. Métodos Alternativos Existentes: É importante esclarecer que, caso vc decida não participar, existe outro tratamento indicado para o caso do seu filho, a placa oclusal é o tratamento para o bruxismo. Um grupo será placebo ou seja, não será realizado nenhum tipo de tratamento

apenas os inalsonorodolaser será acionado sem que haja efetivamente a aplicação. Entretanto, neste grupo após o término da pesquisa serão tratados com terapia convencional que é a placa oclusal.

7. Retirada do Consentimento: Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

8. Garantia do Sigilo: Os pesquisadores comprometem-se formalmente, quando da divulgação dos resultados da pesquisa, manter a preservação do anonimato dos participantes do estudo. Isto inclui a não utilização de iniciais, números de registros em instituições ou outra forma de cadastros.

9. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa: Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

10. Local da Pesquisa: A pesquisa será desenvolvida na Universidade nove de julho Campus Vergueiro.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos - Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos. Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 - 3º subsolo - Liberdade - São Paulo - SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9197 comitedeetica@uninove.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Alunos) para Contato: Prof. Dr. Sandra Kalil Bussadori - (011) 33859197, Aluno Mônica da Consolação Canuto Salgueiro - (011) 33859197.

13. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

15. Consentimento Pós-Infirmação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que a participação é voluntária, e que autorizo _____ a participação _____ do menor _____ e que o mesmo, poderá sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo por meio científico.

ANEXO 2

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR, FORÇA DE MORDIDA E CORTISOL SALIVAR EM CRIANÇAS COM BRUXISMO ANTES E APÓS O USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM ACUPONTOS - ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO”.



O adulto que é responsável por você nos contou que enquanto dorme, você faz movimentos com os dentes que emitem sons muito estranhos. O nome disso é bruxismo. Queremos aplicar uma luz de laser infravermelho, muito legal em alguns pontos para ver se após esta aplicação você dorme bem quietinho sem fazer nenhum barulho.



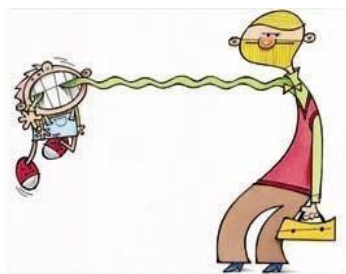
Seus pais deixaram você participar, mas você não é obrigado e se não quiser não tem problema, ninguém irá ficar bravo com você.

Talvez possa acontecer de você ficar com vergonha ou medo, ou ainda não gostar do barulhinho que a luz vermelha emite, mas não tem problema, é só falar que não quer mais participar.

Você irá cuspir dentro de um tubinho para analisar sua saliva e observarmos se você está fazendo esse barulhinho por causa de um substância que poderá estar na sua saliva.



Mas também há coisas legais que podem acontecer como: você gostar da luz e de morder o aparelhinho para ver se você é forte.



Ninguém vai saber que você está participando, não contaremos que você emite estes sons quando está dormindo para outras pessoas.

Vamos usar as informações sobre você para um trabalho, para mostrarmos como a luz de laser infravermelho pode ajudar no bruxismo, mas ninguém vai saber que essas informações são suas.

Se tiver alguma dúvida ou pergunta, pode pedir para seus responsáveis ligar nesses números: **NOME DO PESQUISADOR** Dra. Sandra Kalil Bussadori
TELEFONE 011(983817453) “INCLUSIVE LIGAÇÕES À COBRAR”
E-MAIL sandra.sk@gmail.com

SIM, aceito participar, ouvi tudo o que o responsável leu e explicou, e sei que quando não quiser mais participar é só falar não, em qualquer momento. E recebi uma cópia deste papel.

NÃO, não quero participar.

ANEXO 3

Questionário adaptado de Junia Serra Negra.

Prezado Responsável

Você está recebendo um questionário sobre os costumes de seu filho quando está acordado e quando está dormindo. Precisamos da sua colaboração observando o **sono de seu filho(a) por 3 dias seguidos**. Não existem respostas certas ou erradas! Sua colaboração é muito importante, todas as informações são confidenciais e desde já agradecemos. Mônica da Consolação Canuto Salgueiro -Cirurgiã dentista. CRO 1414AL

1. Quem é o responsável que responde a este questionário?

mãe pai avó/avô outros

Os pais da criança vivem juntos na mesma casa?

sim não

Quantos anos você tem? _____ Quantos anos seu filho(a) tem? _____

Qual o sexo do seu filho(a) ?

() feminino () masculino

2. O seu filho(a) faz uso de algum medicamento?

() sim () não

qual(is)? _____

3. Você considera que, comumente, o seu filho dorme bem por toda a noite ?

() sim () não

4. Algum responsável tem o costume de visitar o quarto onde a criança dorme durante a noite para conferir se está tudo bem?

() sim () não quantas vezes por
noite? _____

Responda sobre a localização do quarto onde a criança dorme:

- a) o quarto da criança fica ao lado do quarto de um dos responsáveis
- b) o quarto da criança fica no mesmo corredor, mas em lados opostos ao do responsável
- c) o quarto da criança fica em um andar e o do responsável fica em outro andar
- d) a criança dorme no mesmo quarto que um dos responsáveis

A porta dos quartos da criança e dos responsáveis fica aberta ou entreaberta durante a noite?

() sim () não

A criança tem o costume de dormir com a luz acesa no quarto ou algum tipo de luz próxima que ilumina o quarto de dormir durante a noite?

() sim () não

Pensando em barulhos enquanto a criança dorme, como você classificaria o nível de sons no quarto de seu filho(a)?

quarto silencioso quarto com barulho

A criança tem costume de dormir com TV, rádio, computador, telefone, música ligados ?

sim não

5. Você já observou se o seu filho aperta os dentes enquanto está acordado, sem estar comendo?

sim não em que situações observou? _____

6. O seu filho(a) tem o costume de roer as unhas?

sim não

7. O seu filho(a) tem o costume de morder objetos tais como lápis/caneta?

sim não

8. Além das atividades da escola a criança faz mais algum tipo de atividade (esporte, música, etc)? Qual? _____

sim não

9. Escreva as tarefas que a criança tem costume de fazer: _____

10. A criança relata se tem ou teve dor de cabeça? sim não . Quantas vezes por semana ? _____

11. Quando relata dor de cabeça, a criança toma medicação? sim não

12. Quando relata dor de cabeça, qual a duração da mesma? _____.

13. Melhora a dor ao dormir? ()sim ()não

14. O seu filho toma café da manhã? () sim ()não

15. O que costuma comer no café da manhã? _____

ANEXO 4

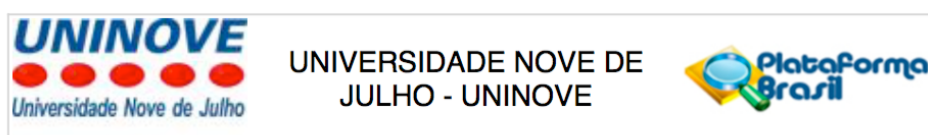
Quadro 2- Estudos mais recentes sobre Diagnóstico de Bruxismo do Sono

Autores/Título/Revista	Tipo de estudo	Diagnóstico
Firmani et al 2015; Bruxismo de sueño en niños y adolescentes; Revista Chilena de Pediatría.	Revisão	Critérios Do Artigo de Lavigne (1996)
Castro et al 2013; A influência do bruxismo na posição postural da cabeça; Revista Portuguesa de Estomatologia Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial.	Randomizado	História, relato e exame clínico. O diagnóstico clínico foi confirmado pelo paciente e seu companheiro de quarto (bruxismo noturno).

<p>Klasser, Rei and Lavigne, 2015: Sleep Bruxism Etiology: The Evolution of a Changing Paradigm J Can Dent</p>	<p>Revisão</p>	<p>Critérios de diagnóstico: Possível, provável e definitivo;</p> <p>Crteres da American Academy Of Sleep Medicine;</p> <p>International classification of sleep disorders, diagnosis and coding manual.</p>
<p>Bortoletto et al., 2014; Evaluation Of Cranio-cervical Posture in Children with Bruxism Before and After Bite Plate Therapy: A Pilot Project; J. Phys TherSci.</p>	<p>Observacional</p>	<p>Questionário dos pais, seguindo os critérios da American Academy of Sleep Medicine.</p>
<p>Carvalho et al 2015; Bruxismo e qualidade de vida em escolares de 11 a 14 anos; Ciência & saúde coletiva.</p>	<p>Observacional Transversal</p>	<p>Apenas relato dos responsáveis legais sobre a presença de Bruxismo do sono ou não.</p>
<p>Castroflorio et al 2015; Risk factors related to sleep bruxism in children: A systematic literature review; Archives of Oral Biology.</p>	<p>Revisão</p>	<p>Critérios da AASM</p>
<p>Serra Negra et al 2014; Environmental factors, sleep duration, and sleep bruxism in Brazilian; Sleep Medicine</p>	<p>Case-control</p>	<p>Questionário</p>
<p>Manfredini et al 2015; Journal Oral Rehabilitation Management of sleep Bruxism in adult: a qualitative systematic literature review</p>	<p>Revisão Sistemática</p>	<p>Polissonografia e Eletromiografia</p>

<p>Manfredini et al 2013; J Oral Rehabilitation. Prevalence of sleep Bruxism in children: A systematic review of the literature.</p>	<p>Revisão Sistemática</p>	<p>Estudos originais descrevendo a prevalência de bruxismo do sono em crianças, por meio de questionários, avaliações clínicas ou gravações de polissonografia (PSG).</p>
--	----------------------------	---

ANEXO 5



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUSCULAR, FORÇA DE MORDIDA E CORTISOL SALIVAR EM CRIANÇAS COM BRUXISMO ANTES E APÓS O USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM ACUPONTOS-ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO,

Pesquisador: Mônica da Consolação Canuto Salgueiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49730215.2.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.333.636

QUARO 3-. Preencha o diário abaixo durante 5 dias seguidos:

Dias	A que horas a criança foi dormir	A que horas a criança acordou	Marque um X se ouviu ruídos da criança rangendo os dentes enquanto dormia	Marque um X se notou que a criança dormiu de boca aberta e/ou babou no travesseiro
1º dia ____/____				
2º dia ____/____				
3º dia ____/____				

STUDY PROTOCOL

Open Access

Evaluation of muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism before and after low level laser applied to acupoints: study protocol for a randomised controlled trial



Mônica da Consolação Canuto Salgueiro¹, Carolina Carvalho Bortoletto², Anna Carolina RattoTempestini Horliana¹, Ana Carolina Costa Mota¹, Lara Jansiski Motta^{1,3}, Pamela de Barros Motta⁴, Raquel Agnelli MesquitaFerrari^{1,2}, Kristianne Porta Santos Fernandes^{1,2} and Sandra Kalil Bussadori^{1,2*}

Abstract

Background: Bruxism is a repetitive activity that causes tooth wear, audible sounds, and discomfort. Preventive measures have been studied for conditions that can exert a negative influence on physiological development in children. Low-level laser therapy administered over acupoints is an effective, painless, low-cost treatment option that has achieved good results. Thus, the aim of the proposed study is to evaluate changes in muscle activity, bite force and salivary cortisol in children with bruxism after the application of low-level laser to acupoints.

Methods: The children will be randomly allocated to four groups of 19 individuals: G1 - low-level laser; G2 - occlusal splint; G3 - placebo laser; and G4 - control (without bruxism). The BTS TMJOINT electromyography will be used to determine muscle activity and a digital gnathodynamometer will be used to measure bite force. Salivary cortisol will be analysed at baseline as well as one and six months after treatment. Two-way ANOVA will be employed and complemented by Tukey's test.

Discussion: Bruxism is a repetitive activity of the masticatory muscles that can have negative consequences if not treated, such as tooth wear, noises, discomfort and anxiety. Thus, control and treatment measures should be taken. Although low-level laser therapy over acupoints has been indicated for children, the effects of this treatment modality have not yet been studied.

Trial registration: NCT02757261 on 8 April 2016. This study protocol received a grant from the Brazilian fostering agency São Paulo Research Foundation (FAPESP: #2015/24731-0).

Keywords: Bruxism, Child, Occlusal splints, Bite force, Acupuncture, Laser, Muscle activity, Salivary cortisol

* Correspondence: Sandra.klb@gmail.com

¹Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University, Rua Vergueiro, 249 - Liberdade, São Paulo, SP CEP 0154001, Brazil

²Postgraduate program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

PLOS ONE

Effect of photobiomodulation on stress biomarkers levels in saliva, muscle strength and clinical signs in children with sleep bruxism: a randomized controlled trial

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Clinical Trial
Full Title:	Effect of photobiomodulation on stress biomarkers levels in saliva, muscle strength and clinical signs in children with sleep bruxism: a randomized controlled trial
Short Title:	Photobiomodulation in children with sleep bruxism
Corresponding Author:	Sandra Bussadori University Nove de Julho São Paulo, BRAZIL
Keywords:	photobiomodulation; laser; children; sleep bruxism.
Abstract:	Sleep bruxism diagnosis in children is difficult because there is no polysomnography protocol for them. The gold standard treatment (occlusal splints therapy) has some limitations like cooperation to use it full time. SB etiology can be related to stress factors. Cortisol salivary level is a biomarker that has been used as a noninvasive method to evaluate stress response. Besides physiological aspects, morphological aspects, such as muscle strength, are also important. The present study aimed to investigate the occurrence of bite marks on the buccal mucosa in children with sleep bruxism (SB), as a complement sign to diagnosis, and the effectiveness of photobiomodulation, as an alternative treatment for SB. Seventy six children, aged 6-12 years old, were divided in four groups: G1- With SB, Laser therapy in acupuncture points ($\lambda=786,94\text{nm}$, exposure time=20s per point, fluency=33.5Jcm ² , energy=1J, Irradiated spots=12); G2 - With SB, Occlusal Splint treated, G3 - With SB, Placebo; and G4 - Without SB, Control group. Before and after treatments, clinical signs, as bite marks on jugal mucosa and headaches, bite force and stress biomarkers on saliva were evaluated. Statistical analysis was performed, using Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk and Anova tests. Bite marks on jugal mucosa is a clinical sign with a positive association with SB presence ($p<0.001$). There was a statistically significant difference between the frequency of children with headache before and after treatment in G1 ($p=0.0005$) and G2 ($p=0.0001$), but there was no difference between the two groups (G1 and G2). G1 presented lower bite force when compared to the other groups on both sides. In an intra-groups analysis after treatments, all groups showed an increase in salivary cortisol levels. Photobiomodulation therapy had good response in children with SB, such as a decrease of headache report and reduction on bite force. Bite marks on jugal mucosa can be complement to clinical SB diagnosis.
Order of Authors:	Monica da Consolação Canuto Salgueiro Fernanda Yukie Kobayashi Lara Jansiski Motta Marcela Leticia Leal Gonçalves Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari Kristianne Porta Santos Fernandes Sandra Bussadori
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, protocol 2015/13180-2. http://www.fapesp.br/



Informações para membros externos de bancas

(Deve ser a última página do volume)

Informações para membros externos de bancas

Caro(a) professor(a), agradecemos ter aceitado nosso convite, ficaremos muito honrados com sua presença.

Para facilitar sua análise, esclarecemos que os trabalhos de dissertação e tese do Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde devem seguir a seguinte estrutura:

1. Contextualização do objeto de estudo com a respectiva justificativa;
2. Objetivos que devem estar alinhados aos artigos publicados;
3. Métodos. Toda metodologia utilizada no(s) artigo(s);
4. Resultados. Apenas a referência completa do(s) manuscrito(s) publicado(s) ou aceito(s) para publicação. Os resultados em sua totalidade estarão disponíveis nos respectivos artigos na seção "Anexos";
5. Discussão. Abordagem do conjunto dos resultados frente à literatura pertinente;
6. Conclusão. Descrição concisa do significado dos resultados;
7. Anexo. Informações adicionais não reportadas nas seções anteriores e o(s) artigo(s) publicado(s) ou submetido(s) a publicação.