



MARIA IVONE MENDES BENIGNO

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ULTRAESTRUTURAL DOS
MÚSCULOS MASSETER E PTERIGÓIDEO MEDIAL,
PÓS EXODONTIA UNILATERAL DOS MOLARES
INFERIORES: estudo experimental**

CAMPINAS

2014

i



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

MARIA IVONE MENDES BENIGNO

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ULTRAESTRUTURAL DOS
MÚSCULOS MASSETER E PTERIGÓIDEO MEDIAL,
PÓS EXODONTIA UNILATERAL DOS MOLARES INFERIORES:
estudo experimental**

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna **MARIA IVONE MENDES BENIGNO** e orientada pela **PROFA. DRA. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B437a Benigno, Maria Ivone Mendes, 1960-
Análise morfométrica e ultraestrutural dos músculos masseter e pterigóideo medial pós exodontia unilateral de molares inferiores : estudo experimental / Maria Ivone Mendes Benigno. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Eliane Maria Ingrid Amstalden.
Coorientador: Edson Aparecido Liberti.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibras musculares esqueléticas. 2. Fibra de colágeno. 3. Músculos mastigatórios. 4. Músculos pterigóides. 5. Músculo masseter. 6. Articulação temporomandibular. I. Amstalden, Eliane Maria Ingrid, 1957-. II. Liberti, Edson Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphjometrical and ultraestrutural analysis of masseter and pterigoid medial muscles after unilateral molar extraction : an experimental study

Palavras-chave em inglês:

Muscle fibers, Skeletal

Masticatory muscles

Collagen fiber

Pterygoid muscles

Masseter muscle

Temporomandibular joint

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Eliane Maria Ingrid Amstalden [Orientador]

Thelma Renata Parada Simão Marsola

Flavia de Oliveira

Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade

Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

Data de defesa: 04-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA IVONE MENDES BENIGNO

ORIENTADORA PROFA. DRA. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN

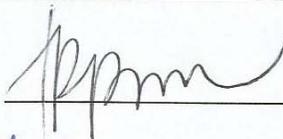
CO-ORIENTADOR PROF. DR. EDSON APARECIDO LIBERTI

MEMBROS:

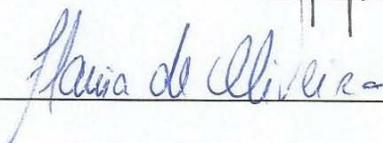
1. PROF(A). DR(A). ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN



2. PROF(A). DR(A). THELMA RENATA PARADA SIMÃO MARSOLA



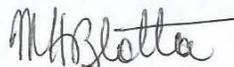
3. PROF(A). DR(A). FLAVIA DE OLIVEIRA



4. PROF(A). DR(A). LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE



5. PROF(A). DR(A). MARIA HELOÍSA DE SOUZA LIMA BLOTTA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 04 de junho de 2014

Ao meu pai,
Edmundo Mendes Benigno (*in memoriam*).
Exemplo de hombridade e perseverança
ante as adversidades da vida.

Ao meu marido
Lusimagno Guerra,
pela paciência e dedicação
na fase mais difícil da execução desse trabalho.

À minha filha
Marina Benigno e
meu neto
Mateus Benigno,
por entenderem minha ausência em suas vidas,
durante estes anos de curso.

À minha irmã
Luciana Mendes Benigno Eulálio e
meu cunhado
Waldeck Neiva Eulálio Filho,
pelo apoio e motivação dados
ao longo desse período.

Ao
Prof. Dr. Edson Liberti,
pela co-orientação e apoio incondicional à minha pesquisa e
por abrir as portas de seu laboratório.

À
Prof^a Dr^a Ingrid Amstalden
pela orientação precisa e apoio sincero.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. Arimatéia Dantas e da Vice-Reitora Prof^a Dr^a Nadir pelo incentivo à qualificação de seus docentes.

Ao DINTER- UFPI/Unicamp, pela oportunidade de qualificação, nas pessoas do Prof. Dr. Viriato Campelo e da Prof^a Dr^a Heloisa Blota.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí, em nome do chefe Airton Mendes Conde Júnior.

Ao meu amigo Francílio de Carvalho Oliveira pelo incentivo para ingressar no Curso de Doutorado, sem ele nada teria sido possível.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial Marta Maria da Silva Righeti, Sônia Regina Yakomiza de Almeida e Sebastião Aparecido Boleta, pela amizade e apoio técnico.

Aos meus amigos Maria do Carmo Gomes do Nascimento e Francisco Elias do Nascimento, mais uma vez presentes nas minhas lutas e conquistas. Agradeço de coração.

À secretária do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Maria do Carmo e a de pós-graduação Márcia Aguiar, agradeço a paciência que dispensaram e preciosa ajuda durante o curso do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) do Ministério da Educação e Cultura, que permitiu a realização desse curso de pós-graduação.

*“Nunca procedi tão bem como desejaria ter procedido,
mas fiz o melhor que pude,
com franqueza e retidão.
Não posso mais do que isso,
e não tenho o direito de fazer menos”.*

Cunha Bueno



RESUMO

Introdução: A mastigação é uma atividade sincrônica entre os músculos da mastigação e articulação temporomandibular (ATM). A perda de dentes é um importante fator que contribui para as disfunções do Sistema Estomatognático e consequentes danos aos músculos mastigadores. Considerando os poucos trabalhos sobre o assunto, a necessidade de maior compreensão e detalhamento quanto às alterações das fibras desta musculatura, especialmente na disfunção pela perda dentária, este estudo teve como objetivos: investigar as alterações morfológicas e ultraestruturais do músculo Pterigoideo Medial (PTM) e Masseter, além de analisar o invólucro fibroconjuntivo desses músculos, pós exodontia, através de um modelo experimental. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar, adultos, machos, com peso médio de 220g, sendo 24 ratos para microscopia de luz (ML) e 12 para microscopia eletrônica de transmissão (MET), contendo 5 animais experimentais e três controles por grupo para ML e 3 ratos para MET, com 1 controle por grupo. Foram divididos em três grupos experimentais: GI -15, GII-30 e GIII-60 dias, pós exodontia de molares inferiores esquerdos. Sob microscopia de luz foram realizados estudos morfométricos e a análise das fibras colágenas desses músculos, utilizando-se da técnica de picro-sirius e luz polarizada. A análise morfométrica baseou-se na medida da área das fibras, em cortes transversais, corados pelo H&E (40x.objetiva), com programa digital (software AXION-vision). Realizadas 240 medidas por animal/total de 1200 por grupo experimental e 200 medidas por animal/total de 600 por grupo controle. Também foram observadas, qualitativamente, alterações ultraestruturais dos filamentos de proteína constituintes das miofibrilas destes músculos, ipsilateral às exodontias. Teste ANOVA foi aplicado para a análise dos dados, com nível de significância $p < 0,05$. **Resultados:** A morfometria da área das fibras do músculo PTM, mostrou redução significativa, nos animais submetidos à exodontia, tanto ipsi quanto contralateral. Não foram detectadas diferenças quanto aos quesitos interação entre lados direito e esquerdo e grupos (GI, II e III), nem quando se comparou os lados entre si. Diferenças foram notadas quando se comparou o grupo experimental, nos distintos períodos evolutivos, detectando-se aumento progressivo das áreas das fibras, sendo a média maior no

Grupo GIII. Apesar do crescimento progressivo da área das fibras, elas não se tornam hipertróficas nesse estágio avaliatório, uma vez que, a média dos valores obtidos foi semelhante à do grupo controle. As fibras do músculo PTM parecem adaptar-se às mudanças. Nenhuma diferença foi detectada quanto à análise morfométrica do músculo Masseter. Ultraestruturalmente observou-se assimetria e desorganização da linha Z e banda I, apenas no grupo experimental GII, do músculo PTM. A análise das fibras colágenas mostrou que os fascículos musculares são revestidos por uma delicada rede de fibras colágenas do tipo I e do tipo III, com predomínio deste último (fibras reticulares), nos Masseteres, nos diferentes períodos evolutivos. **Conclusão:** A disfunção temporomandibular, promovida pela exodontia unilateral de molares inferiores em ratos, pode levar a alterações morfométricas ipsi e contralaterais, com redução de áreas de fibras, particularmente no PTM. Entretanto as fibras musculares parecem se adaptar às novas condições, ao longo do experimento. A linha Z e banda I são as mais sensíveis a essa disfunção, no músculo PTM, contudo efêmera, uma vez que foi observada apenas no grupo GII. O músculo PTM mostrou-se mais vulnerável, provavelmente pelas suas características funcionais próprias e maior participação na dinâmica dos movimentos mastigatórios, comparadas às do Masseter. O tecido fibroconjuntivo desses músculos parece não ser afetado nesse procedimento.

Palavras-chave: Fibra muscular esquelética; Fibra colágena; Músculos mastigadores; Músculo Pterigóideo Medial; Músculo Masseter; Alteração oclusal; Articulação temporomandibular; Desordens da articulação temporomandibular; Morfometria e Microscopia eletrônica de transmissão.



ABSTRACT

Introduction: The loss of dental elements is an important factor in stomatognathic system dysfunctions and consequential damage to the masticatory muscles. Considering the few works on this subject, and the necessity for better understand the consequences of this injury on the masticatory muscles, this study had the following objectives: to analyze the morphometric and ultrastructural changes of the pterygoid medial muscle (PTM) and Masseter, and to evaluate the fibroconnective tissue of these muscles, under occlusal defects, induced by unilateral left molar extraction, using an experimental model.

Material and methods: Thirty-six male Wister rats were used (average weight, 220g), 24 for light microscopy study (LM) and 12 for transmission electron microscopy study (TEM), divided into three experimental groups, according to the following periods: (GI-15; GII-30 and GIII-60 days), containing 5 animals each for LM and 3 for TEM. Each group had 3 control animals for LM, and one animal for TEM study, for each evolutionary period. The analysis of collagen fibers of these muscles, was used the picro-sirius technique, under polarized light microscopy. The morphometric analysis was based on measurement of area of fibers, in cross sections, stained by H&E (40x objective), using a digital program (AXION software-vision). Two hundred and forty measures were done per animal, (1200 total) of experimental group and 200 measures per animal (600 total) for control group. The protein filaments (constituents of myofibrils) of these muscles were also observed, ipsilateral to tooth extractions. The results were statistically compared using ANOVA test with significance level $p < 0.05$. **Results:** There was a reduction of area of PTM of animals undergoing tooth extraction, both ipsi and contralateral. Both sides were similar when compared with each other, as assessed in the various evaluative periods. Differences were observed in the fiber area, especially in the first group and these showed progressive increase, reaching their highest average in GIII. Despite the progressive growth of the fibers area, they do not become hypertrophic on the third stage, since the average of the values obtained was similar to the control group. Muscle fibers PTM seem to adapt to changes. No difference was detected on the Masseter muscle by morphometric analysis. The ultrastructure showed asymmetry and disorganization of the Z and I

bands in the PTM of GII. A delicate network of collagen fibers (types I and III) were found coating the muscle fascicles with a predominance of the reticular fibers (type III) only in Masseteres. **Conclusions:** Temporomandibular joint dysfunction, promoted by unilateral, inferior molar extraction can induce ipsi and contralateral morphometric changes, particularly of PTM, with reduction of the fiber area. However, these fibers seem to adapt to these conditions throughout the experiment. Z and I bands are the most sensitive structures to this dysfunction in PTM muscle, however these effects are transitory, since it was observed only in the GII group. The muscle PTM proved to be more vulnerable, probably for its own functional features and greater participation in masticatory function, compared to Masseter. The fibroconnective tissue, of these muscles, does not seem to be affected in this procedure.

Key words: Skeletal muscle fiber; Collagen fiber; Chewing muscles; Medial Pterygoid Muscle; Masseter Muscle; Occlusal damage; Temporomandibular joint; Temporomandibular joint disorders; Morphometry and Transmission Electron Microscopy.

LISTAS DE ABREVIATURAS

ATM	Articulação temporomandibular
DTM'S	Disfunções temporomandibulares
H&E	Hematoxilina e eosina
M	Músculo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	Microscopia de luz
MP	Microscopia polarizada
PTM	Pterigóideo medial

	Pág.
Tabela 1 Distribuição dos animais dos grupos experimental e controle nos diferentes períodos evolutivos.....	37
Tabela 2 Valores médios obtidos quanto à análise morfométrica de área em μm^2 , do músculo Pterigoideo Medial nos animais experimentais e controle, nos diferentes períodos evolutivos.....	51
Tabela 3 Valores médios obtidos em μm^2 , quanto à análise morfométrica de área do músculo Masseter nos animais experimentais e controle, nos diferentes períodos evolutivos.....	56

	Pág.
Figura 1 (A) diagrama da ultraestrutura da fibra muscular esquelética. (B) - Fotomicrografia em corte transversal da ultraestrutura do músculo Masseter.....	32
Figura 2 Dentes molares inferiores do rato wistar.....	39
Figura 3 Alicate utilizado nas exodontias dos molares Wengart®.....	39
Figura 4 Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo (A) e direito (B), grupo GI (15 dias).....	41
Figura 5 Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo (A) e direito (B), grupo GII (30 dias).....	41
Figura 6 Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo (A) e direito (B), grupo GIII (60 dias).....	42
Figura 7 Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo (A) e direito (B), grupo GI (15 dias).....	42
Figura 8 Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo (A) e direito (B), grupo GII (30 dias).....	43

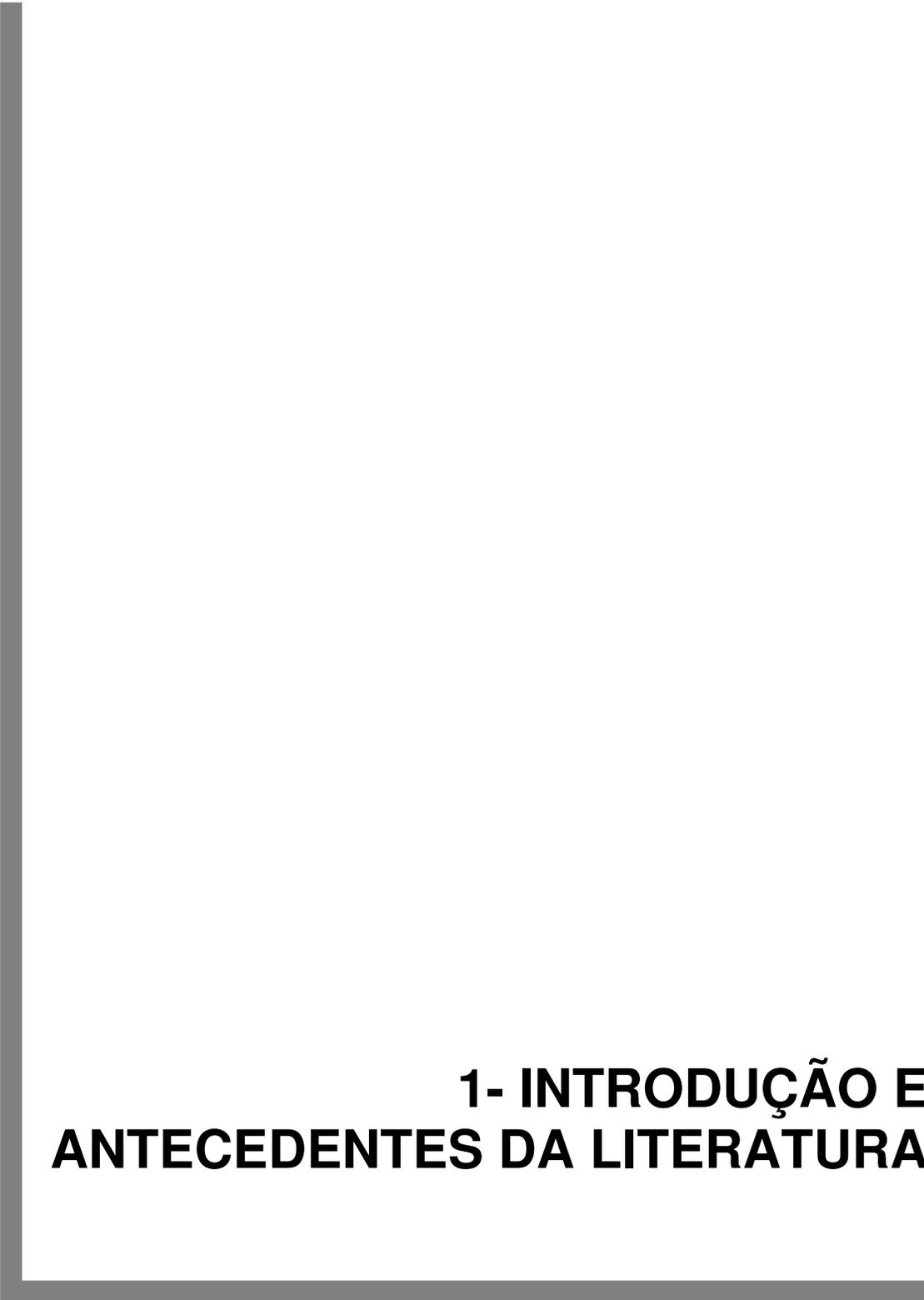
Figura 9	Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo (A) e direito (B) , grupo GIII (60 dias).....	43
Figura 10	Músculo PTM do grupo controle I (GCI), presença de fibras colágenas do tipo I (seta maior) e do tipo III (setas menores).....	45
Figura 11	Músculo Masseter do grupo I (GI), presença predominante de fibras colágena do tipo III (★).....	45
Figura 12	Ultraestrutura do músculo PTM esquerdo. (A) controle e grupo experimental GI (B) , GII (C) e GIII (D)	59
Figura 13	Ultraestrutura do músculo Masseter. (A) grupo controle e grupo experimental: GI (B) , GII (C) e GIII (D)	60
Figura 14	Músculo Masseter Direito, corte transversal do sob luz polarizada.....	61
Figura 15	Músculo Masseter Esquerdo, corte transversal do sob luz polarizada.....	62
Figura 16	Músculo Pterigóideo Medial Direito, corte transversal do sob luz polarizada.....	63
Figura 17	Músculo Pterigóideo Medial Esquerdo. Fibras colágenas dos tipos I (vermelho, laranja, amarelo) e III (verde).....	64

	Pág.
Gráfico 1 Valores obtidos em μm^2 das medidas correspondentes às áreas das fibras dos músculos pterigóideo medial dos grupos experimental (lado direito e esquerdo) e grupo controle C_E=Grupo Controle; O_D=Grupo Experimental/Operado Direito; O_E=Grupo Experimental/Operado Esquerdo.....	50
Gráfico 2 Resultados observados nos ratos submetidos ao experimento quanto à medida global de área dos lados direito e esquerdo do músculo PTM em relação ao tempo pós-exodontia (Grupos experimentais).....	50
Gráfico 3 Resultados observados da medida de área em μm^2 , entre o grupo experimental lados direito e esquerdo e o controle, nos diferentes períodos evolutivos.....	51
Gráfico 4 Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GI (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCI), correspondente ao período evolutivo de 15 dias (GI).....	52
Gráfico 5 Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCII), correspondente ao período evolutivo de 30 dias (GII).....	53

Gráfico 6	Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GIII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCIII), correspondente ao período evolutivo de 60 dias (GIII).....	53
Gráfico 7	Resultados observados quanto à média de área em μm^2 , das fibras musculares do Masseter nos grupos experimentais em relação ao tempo pós-exodontia nos lados direito (D) e esquerdo (E)	54
Gráfico 8	Resultados observados quanto à medida global de área em μm^2 , das fibras musculares do Masseter nos grupos experimentais em relação ao tempo pós-exodontia nos lados direito (D) e esquerdo (E)	55
Gráfico 9	Resultados observados da medida de área em μm^2 , entre o grupo experimental lados direito e esquerdo e controle, nos diferentes períodos evolutivos.....	55
Gráfico 10	Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GI (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCI), correspondente ao período evolutivo de 15 dias.....	57
Gráfico 11	Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCII), correspondente ao período evolutivo de 30 dias....	57
Gráfico 12	Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GIII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCIII), correspondente ao período evolutivo de 60 dias....	58

	Pág.
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES DA LITERATURA.....	23
1.1- Embriologia, morfologia, ultraestrutura e fisiologia dos músculos mastigatórios.....	30
1.2- Justificativa.....	33
2- OBJETIVOS.....	34
2.1- Objetivo geral.....	35
2.2- Objetivos específicos.....	35
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1- Caracterização da casuística e divisão dos grupos de animais.....	37
3.2- Procedimento cirúrgico.....	38
3.3- Eutanásia dos animais e remoção dos músculos masseter e ptergóideo medial.....	39
3.4- Técnica para microscopia de luz (ML).....	40
3.5- Morfometria - análise quantitativa.....	40

3.6- Técnica para microscopia de luz polarizada (MP).....	43
3.6.1- Caracterização das fibras colágenas no tecido muscular sob técnica de picro-sirius e polarização.....	44
3.7- Técnica para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	45
3.8- Análise estatística.....	47
4- RESULTADOS.....	48
4.1- Morfometria- análise quantitativa.....	49
4.2- Ultraestrutura das fibras musculares.....	58
4.3- Análise das fibras colágenas no tecido muscular.....	60
5- DISCUSSÃO.....	65
6- CONCLUSÃO.....	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73



1- INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES DA LITERATURA

A atividade mastigatória está fortemente associada à articulação temporomandibular (ATM) e aos músculos da mastigação. A maioria das desordens temporomandibulares (DTMs), tem como fatores predisponentes ou coadjuvantes, alterações a nível oclusal, as quais têm sido apontadas como responsáveis pelo comprometimento dos músculos mastigadores. A posição fisiológica postural mandibular é mantida pelos músculos elevadores da mandíbula contra a ação da gravidade, enfatizando a ação dos músculos Masseteres, Pterigóideos Mediais e Temporais.

Segundo Dawson⁽¹⁾, as alterações oclusais na dentição humana, podem acarretar sintomatologia dolorosa, devido ao acúmulo de toxinas resultantes da acumulação de produtos do metabolismo celular, particularmente dos resultantes da hidrólise do ATP (ADP, AMP, IMP, Pi, amônia), a perda da homeostasia do íon Ca^{2+} , o papel da cinética de alguns íons nos meios intra e extracelulares nomeadamente o K^+ , Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , no interior das fibras musculares dos músculos mastigadores.

Yemm⁽²⁾, em pesquisa com músculos mastigadores humanos, acrescenta que a idade, a postura da cabeça, a perda de dentes, dispositivos intra-orais, exercícios físicos, tensão emocional, postura dos lábios, sono e drogas, são fatores que alteram a posição de repouso da mandíbula. O comprimento ao qual o músculo fisiologicamente se adapta é aquele ocupado por ele na maior parte do tempo; assim na presença de mudanças no posicionamento mandibular, ocorrem alterações no comprimento das fibras dos músculos que participam da mastigação.

Hoppeler e Fluck⁽³⁾ estudaram músculos esqueléticos humanos, provenientes de biópsias e verificaram que estes têm a sua forma e função alterada em resposta a diversos estímulos que modificam a atividade contrátil (exercício, estimulação elétrica, desnervação), carga imposta sobre os músculos (exercício com sobrecarga, microgravidade) suprimento de substratos (intervenções nutricionais) ou fatores externos como hipóxia e estresse térmico.

Provavelmente pela reprogramação nuclear que as fibras esqueléticas possuem, determinando plasticidade às mesmas.

Cao et al.⁽⁴⁾, investigaram as alterações histológicas do músculo Masseter, concluíram que nas interferências oclusais, a dor muscular experimentalmente induzida, está associada a sensibilização periférica dos neurônios nociceptivos, ao invés de lesão muscular e inflamação.

Eriksson e Thornell⁽⁵⁾, estudaram os tipos de fibras do músculo Masseter e PTM humanos, relatam que no Masseter há predomínio de fibras do tipo I, e no PTM predomínio de fibras do tipo I na parte anterior e tipo II na parte posterior do músculo.

Os músculos PTM e Masseter atuam sinergicamente para elevar a mandíbula e contribuem para a protrusão da mesma. Na atividade mastigatória há uma sincronia entre os músculos mastigadores e a ATM, como relataram Iyomasa et al.^(6,7) que investigaram os efeitos ultraestruturais e histológicos sobre o músculo PTM de gerbis nas alterações oclusais induzidas por exodontia unilateral. Estes estudos mostraram, através de dados micrográficos, que a extração unilateral de dentes foi capaz de induzir modificações nas fibras e capilares do músculo PTM. As alterações histológicas foram encontradas no lado ipsilateral do grupo experimental, com uma localização central do núcleo e aspecto degenerativo das fibras, geralmente perto da aponeurose interna. Os diâmetros das fibras pareciam reduzidos e os fusos neuromusculares foram localizados perto da aponeurose interna, com aparência modificada.

Revisão bibliográfica realizada por Liu et al.⁽⁸⁾, quanto ao comprometimento do sistema estomatognático por traumas oclusais, concluiu que estes causam efeitos deletérios sobre vários órgãos do referido sistema, tais como tecido pulpar, tecido periodontal, ATM e músculos mastigadores, tanto em estudos clínicos como em modelos experimentais. Miede et al.⁽⁹⁾, analisaram as alterações dos músculos Masseter e PTM, de ratos wistar machos, após exodontia bilateral dos dentes molares,

submetidos a dieta pastosa e concluíram que esses músculos mastigatórios adaptam-se às novas condições experimentais.

Tsai et al.⁽¹⁰⁾, observaram que após a injeção de toxina botulínica do tipo A, houve redução do tamanho da fibra muscular dos músculos Masseter e Temporal de ratos wistar, após a redução da função mastigatória. Sciote et al.⁽¹¹⁾, avaliaram amostras do músculo Masseter humano em pacientes com alterações oclusais, pós osteotomia mandibular, concluíram que as propriedades das fibras mostraram alterações somente quanto à má oclusão vertical. As propriedades dos tipos de fibras estão intimamente associadas com variações no crescimento vertical da face. O aumento de fibra do tipo II e da área da fibra muscular é inversamente proporcional ao aumento da dimensão vertical da face.

Cvetko e Erzen⁽¹²⁾ estudaram as alterações das fibras MYHC (miosina pesada) do músculo Masseter humano, até vinte e quatro horas pós-mortem. Formaram dois grupos: um grupo com prótese total, e o outro grupo de dentados, com pelo menos vinte e quatro dentes e tendo uma relação maxilomandibular normal. Observaram que não houve diferença de fibras nos portadores de prótese total e nos dentados. Bakke⁽¹³⁾, em uma revisão de literatura constatou que apesar das diferenças de origem embriológica, organização nervosa central, e distribuição das fibras musculares, a fisiologia e a ação dos músculos elevadores da mandíbula são comparáveis aos dos músculos esqueléticos de outras partes do corpo humano. A pesquisa clínica comparando a extensão do contato oclusal em pacientes, bem como estudos epidemiológicos têm demonstrado que apoio oclusal reduzido, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios craniomandibulares. A extensão do contato oclusal afeta claramente a atividade elétrica muscular, força de mordida, os movimentos mandibulares e eficiência mastigatória. A estabilidade oclusal mantém os músculos em forma, e permite que o sistema mastigatório possa atender as suas exigências.

Vários fatores podem levar à desarmonia oclusal, tais como: perda dentária⁽⁰⁹⁾; Benigno et al.⁽¹⁴⁾; Bazan et al.⁽¹⁵⁾, contato prematuro na oclusão dentária⁽¹³⁾; utilização de aparelhos ortodônticos e próteses dentárias⁽¹²⁾ desgaste ou abrasão de face oclusal de dentes, Bani et al.⁽¹⁶⁾; Santiwong et al.⁽¹⁷⁾. Neste último estudo, os autores promoveram desgaste oclusal, através de modelo animal e constataram alterações nos fusos das junções neuromusculares do músculo Masseter.

Raros estudos discutem os efeitos da desarmonia oclusal no sistema estomatognático humano^(11,14); Korfage et al.⁽¹⁸⁾; Benigno et al.⁽¹⁴⁾, estudaram as alterações da zona bilaminar da ATM, em adultos jovens e idosos, verificando as alterações das fibras colágenas e elásticas nos diferentes grupos etários, onde observaram alterações morfológicas das fibras colágenas no grupo de idosos. Korfage et al.⁽¹⁸⁾, em revisão bibliográfica, descreveu a composição dos tipos de fibras dos músculos da mandíbula humana, observando que a grande variedade dos tipos de fibras dos músculos mastigadores é o que provavelmente lhes forneça a grande capacidade adaptativa nos diferentes movimentos e alterações da posição da mandíbula.

Modelos animais têm sido estimulados em decorrência das limitações dos experimentos em humanos.

Estudos têm sido realizados com distintos modelos animais e sob diversos aspectos quanto aos achados macroscópicos, microscópicos e ultraestruturais dos músculos mastigadores. Bani et al.⁽¹⁶⁾, avaliaram as alterações dos músculos mastigadores de ratos, após indução de alterações oclusais com amputação de cúspides de molares unilaterais. Os tecidos musculares foram analisados sob microscopia de luz, eletrônica de varredura e morfometria. Os resultados mostraram que as alterações oclusais causaram constrição dos vasos, danos morfológicos às fibras musculares e capilares sanguíneos; os músculos também mostraram fadiga e isquemia. As alterações musculares mais severas ocorreram nos músculos submetidos à injúria por um maior espaço de tempo e os músculos contra laterais apresentaram alterações leves e

reversíveis com o tempo, possivelmente devido à resposta adaptativa. Tsai et al.⁽¹⁰⁾, avaliaram com imuno-histoquímica, as fibras do músculo Masseter e Temporal de ratos wistar após injeção de toxina botulínica. Verificaram diminuição do tamanho das fibras do Masseter e predominância do tipo IIa, pela redução da função mastigatória. Iyomasa et al.^(6,7) com estudos em gerbil, mostraram após injeção de látex nos vasos do pescoço e cabeça, que a irrigação do PTM é feita pela artéria Carótida Externa. Hong e Chul⁽¹⁹⁾, analisaram o músculo Masseter de coelho, após osteotomia do ângulo da mandíbula. Verificaram uma diminuição na área média das fibras do músculo nas primeiras quatro semanas, e adaptação funcional das mesmas, seis semanas depois. Bazan et al.⁽¹⁵⁾, induziram alterações oclusais em cobaias, demonstraram alterações histológicas, ultraestruturais e histoquímicas no músculo Masseter e Pterigóideo Medial, após exodontia de molares superiores. Relatam que estes achados indicam ser o PTM um músculo com uma capacidade complexa de adaptar-se morfológica e funcionalmente às alterações à alteração oclusal. Miehe et al.⁽⁹⁾, avaliaram os efeitos da exodontia unilateral de molares em ratos wistar, nos músculos mastigadores e observaram que ocorre adaptação muscular. Macroscopicamente analisaram as adaptações pela redução do peso dos músculos, microscopicamente avaliaram as alterações através de imuno-histoquímica, observaram a predominância de fibras por fibras do tipo IIb. Easton e Car⁽²⁰⁾ estudaram as alterações funcionais da parte superficial do Masseter e do músculo Pterigoideo Lateral em ratos, após indução de protrusão da mandíbula. Concluíram que a área das fibras do tipo II diminuem e as das fibras de tipo IIb aumentam no primeiro. Já nos músculos pterigóideos laterais a área das fibras do tipo I sofre aumento e do tipo IIb diminuem. O tempo de contração aumentou em ambos os músculos, indicando que os músculos se tornaram mais lentos. Nishide et al.⁽²¹⁾, realizaram estudo histológico do músculo Masseter de ratos, após alteração oclusal por indução de contato prematuro entre molares. Observaram que a maioria das fibras musculares permanece intacta, embora tenham sido observadas alterações histológicas parciais, tais como prolongamento de tecido conjuntivo, aparecimento de células inflamatórias e existência de fibras musculares com núcleos centrais.

A morfometria como método de estudo quantitativo fornece dados mais precisos. Por isso este método tem sido utilizado na análise de músculos estriados esqueléticos. Andreo et al.⁽²³⁾, utilizaram a morfometria, na quantificação dos tipos de fibras musculares oxidativas rápidas e lentas, nos músculos: Masseter, Temporal e ventre anterior do Digástrico, em macacos prego. Demonstraram que existe uma predominância de fibras de contração rápida nos músculos Masseter e Temporal. Bani et al.⁽¹⁶⁾; Camargo Filho et al.⁽²²⁾ analisaram, através da morfometria, as alterações das fibras do músculo Sóleo de ratos submetidos a treinamento físico, verificaram alterações nas fibras musculares, caracterizadas por modificações no formato das fibras, presença de fibras atroficas e hipertróficas. Tanaka et al.⁽²⁴⁾, avaliaram as medidas de área das fibras do músculo Temporal de ratos, na porção superficial anterior e posterior do músculo, não verificaram diferença nos tipos de fibras que as compõem. Vreeke et al.⁽²⁵⁾, estudaram as alterações do músculo Masseter em coelhos e observaram que a redução da carga mastigatória afeta a velocidade de contração desse músculo, resultando na adaptação estrutural, com diminuição da área das fibras lentas.

Österlund et al.⁽²⁶⁾, analisaram a miosina pesada, no músculo Masseter e Bíceps Braquial, em cadáveres humanos jovens. Mostraram que a miosina das fibras musculares, de ambos os músculos, apresenta-se semelhante.

Os mecanismos fisiopatológicos da adaptação muscular continuam pouco compreendidos e trabalhos relacionados às alterações patológicas e morfofuncionais são escassos, em especial quanto ao músculo PTM, sob alterações oclusais. Gendrage et al.⁽²⁷⁾, induziram má oclusão em porcos, com acúmulo de material sobre os molares, provocando uma protrusão da mandíbula, para avaliar o comportamento dos capilares sanguíneos e das fibras do tipo I. Observaram aumento do fluxo sanguíneo, da densidade capilar e da quantidade de fibras do tipo I e sugeriram que estas modificações parecem ser uma adaptação complexa da atividade do músculo a longo prazo. Nakamura et al.⁽²⁸⁾, avaliaram a influência da doença de Parkinson nos músculos

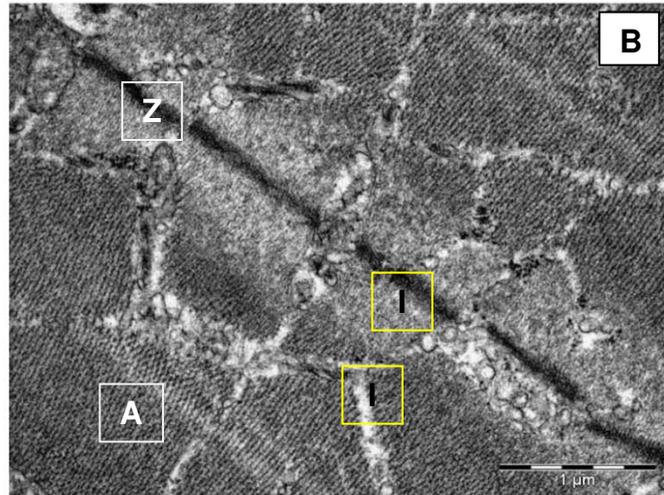
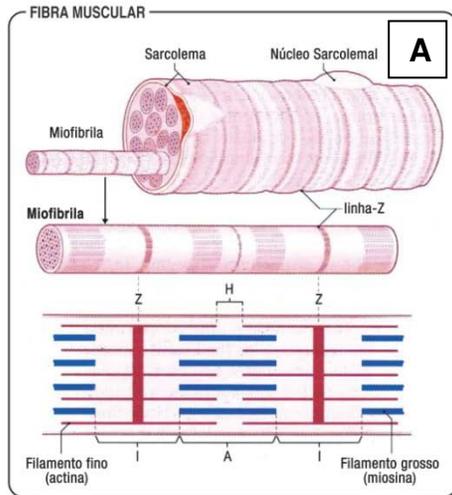
Digástrico e Masseter, através de um modelo experimental em ratos e concluíram que essa doença leva a alterações nos movimentos mandibulares mastigatórios, pois há um aumento de fibras lentas no músculo Digástrico. Grünheid et al.⁽²⁹⁾, através de revisão bibliográfica estudaram as respostas adaptativas dos músculos da mandíbula a vários estímulos oro-faciais e verificaram que essas mudanças nem sempre são uniformes e variam com a natureza, intensidade e duração do estímulo. Zhou et al.⁽³⁰⁾, investigaram as alterações ultraestruturais e proteômicas da parte superficial do músculo Masseter em ratos. Evidenciaram desregulação das miofibrilas acompanhadas de ruptura, entrelaçamento de miofilamentos, mudanças na quantidade e localização das mitocôndrias, estas localizavam-se em grande quantidade, tanto na região subsarcolemal como nas regiões entre as miofibrilas e aumento das vesículas das cisternas do retículo sarcoplasmático.

1.1- Embriologia, morfologia, ultraestrutura e fisiologia dos músculos mastigatórios

Os quatro músculos mastigadores: Temporal, Masseter, Pterigoideo Medial e Pterigóideo Lateral, se desenvolvem a partir do mesoderma do primeiro arco faríngeo embrionário, Moore KL e Persaud TVN⁽³¹⁾. Os músculos estriados esqueléticos são formados por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas, com um diâmetro que varia de 10 a 100µm. Essas fibras mostram estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. Ao microscópio de polarização, a faixa escura é anisotrópica e, por isso recebeu o nome de banda A, enquanto a faixa clara, ou banda I, é isotrópica. No centro de cada banda I, nota-se uma linha transversal escura, a linha Z, que é melhor observada através da ultraestrutura. Os feixes de fibras musculares não estão agrupados ao acaso, mas organizados em feixes envolvidos por uma membrana externa de tecido conjuntivo, chamada epimísio. Do epimísio partem septos muito finos de tecido conjuntivo, que se dirigem para o interior do músculo, dividindo-o em feixes. Esses septos são chamados de

perimísio. O perimísio envolve cada feixe de fibras musculares. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada muito fina, constituída pela lâmina basal da fibra muscular e por fibras reticulares do endomísio. O tecido conjuntivo relacionado ao músculo estriado esquelético é constituído por fibras colágenas tanto do tipo I como do tipo III,^(32,33). Estas fibras têm um importante papel na manutenção das fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro, contribuindo para a contração deste⁽³⁴⁾.

A ultraestrutura mostra que as células musculares esqueléticas têm uma organização muito complexa, que constitui um dos exemplos mais nítidos de adaptação morfofuncional e de conversão de energia química em trabalho mecânico do organismo. O sarcolema é circundado pela lâmina externa, em toda sua extensão há algumas invaginações tubulares que penetram perpendicularmente no citoplasma e estão separadas entre si por espaços relativamente regulares, são os túbulos T. As mitocôndrias também chamadas sarcossomas, distribuem-se entre as miofibrilas e por baixo do sarcolema⁽³⁵⁾. Existem filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, dispostos longitudinalmente nas miofibrilas e organizados numa distribuição simétrica e paralela. Essa organização dos filamentos miofibrilares é mantida por diversas proteínas, entre elas filamentos intermediários de desmina, que ligam as miofibrilas umas às outras. Da linha Z, partem os filamentos finos (actina) que vão até o bordo externo da banda H. Os filamentos grossos (miosina) ocupam a região central do sarcômero. Resultando uma banda I formada somente por filamentos finos, a banda A é formada por filamentos grossos e finos, e a banda H, somente por filamentos grossos (Figura 1A). Na região lateral da banda A, os filamentos finos e grossos interdigitam-se. Um corte transversal nessa região lateral (Figura 1B), mostra uma disposição simétrica tal que cada filamento grosso fica rodeado por seis filamentos finos, formando um hexágono⁽³⁴⁾.



- Figura 1(A)-** Diagrama da ultraestrutura da fibra muscular esquelética. Da linha “Z”, partem os filamentos finos (actina) que vão até a borda externa da banda” H”. Os filamentos grossos (miosina) ocupam a região central do sarcômero, resultando uma banda “I” formada somente por filamentos finos. A banda “A” é formada por filamentos finos e grossos e a banda “H”, somente por filamentos grossos.
- 1(B)-** Fotomicrografia em corte transversal da ultraestrutura do músculo Masseter. Ver correspondência do diagrama **(A)** na fotomicrografia em **(B)**.

O estudo das alterações nos dois músculos pesquisados se deve ao fato de que os mesmos surgem do primeiro arco faríngeo (mandibular), primórdio da mandíbula e da maxila, tendo, portanto as mesmas características embriológicas e funcionais, sendo o músculo Pterigóideo Medial considerado sinergista do músculo Masseter nos movimentos mandibulares⁽³⁶⁾.

A principal função do Masseter é o movimento de elevação da mandíbula, já o PTM, além de atuar como sinergista na elevação da mandíbula, também participa de sua protrusão, sendo portanto, mais ativo nos movimentos mastigatórios⁽³⁷⁾.

1.2- Justificativa

Considerando que as alterações oclusais são responsáveis pela maioria das disfunções da articulação temporomandibular; que a ausência ou perda dos dentes, especialmente os molares, predis põem a essas disfunções por alterações das fibras musculares do Masseter e Pterigóideo Medial; que há necessidade de maior compreensão e detalhamento das alterações morfológicas e ultraestruturais que ocorrem, nesses músculos; além da importante relação das fibras colágenas com as fibras musculares e os poucos estudos quanto à repercussão dessas alterações sobre as fibras colágenas nessas condições, justificamos o planejamento deste estudo.



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Analisar o músculo Masseter e Pterigoideo Medial na alteração oclusal pela exodontia dos molares inferiores esquerdos de rato wistar.

2.2- Objetivos específicos

Analisar o músculo Masseter e Pterigóideo Medial após exodontia dos molares inferiores esquerdos, através de um modelo experimental, em ratos wistar, em diferentes períodos evolutivos quanto:

- 1) À análise morfométrica da área das fibras musculares;
- 2) Às alterações ultraestruturais das fibras musculares e
- 3) À caracterização das fibras colágenas no tecido muscular.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Caracterização da casuística e divisão dos grupos de animais

Foram utilizados trinta e seis ratos da linhagem Wistar, com um mês de idade, pesando em média 220g, machos, procedentes do biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais, inicialmente, eram mantidos num ambiente próprio, distribuídos em gaiolas de acrílico de 30x19x16cm, contendo um animal cada e que recebia higienização diária. Todos os animais foram, previamente, submetidos à avaliação clínica para garantir estado de higidez. A dieta foi mantida normalmente à base de ração e água *ad libitum*. Vinte e quatro animais foram utilizados para o estudo de microscopia de luz (ML) e doze para microscopia eletrônica de transmissão (MET), divididos em três grupos de acordo com os distintos períodos evolutivos analisados: 15 dias (GI); 30 dias (GII) e 60 dias (GIII), pós exodontia de molares inferiores esquerdos, contendo 5 animais experimentais e três controles por grupo para ML e 3 para MET com 1 controle por grupo. Estes foram assim distribuídos conforme expresso na tabela 1:

Tabela 1- Distribuição dos animais dos grupos experimental e controle nos diferentes períodos evolutivos.

Estudo	Animais (N)	Períodos Evolutivos (dias)	Grupo Experimental (G)(N)	Grupo Controle(GC) (N)
Microscopia de Luz (ML)	24	15 (GI)	5	3
		30 (GII)	5	3
		60 (GIII)	5	3
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	12	15 (GI)	3	1
		30 (GII)	3	1
		60 (GIII)	3	1
Total	36		24	12

Os grupos controle não foram submetidos a nenhum protocolo farmacológico ou cirúrgico.

Todos os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais - CEEA/UFPI, aprovado sob o nº 072/11.

3.2- Procedimento cirúrgico

Os ratos dos grupos experimentais foram submetidos à exodontia dos molares inferiores esquerdos (Figura 2) para indução da disfunção da ATM. Para esse procedimento, os animais foram pré-medicados com opióide (tramadol 6mg/kg) por via intramuscular profunda para garantir a analgesia. Após dez minutos, foram submetidos à anestesia geral do tipo dissociativa, onde foi utilizada a associação anestésica ketamina (Dopalen) 50mg/kg/xilazina(Rompum) 0,5mg/kg na mesma seringa, injetados por via intramuscular. Uma vez realizados os procedimentos cirúrgicos (exodontias), os animais foram submetidos a antibioticoterapia preventiva (Penicilina/streptomicina - 40.000UI/kg) por via intramuscular profunda e anti-inflamatorio (Flunixin meglumine 1,0mg/kg) a cada vinte e quatro horas por um período de três dias. Para a realização das exodontias utilizou-se um alicate Weingart® 120E, adaptado (Figura 3). O pós-operatório foi avaliado diariamente e os animais mantidos sob cuidados técnicos do biotério, durante todo o período experimental. Somente um dos animais foi a óbito, por provável inanição. O experimento foi refeito em relação a este único animal.



Figura 2- Dentes molares inferiores extraídos do rato wistar.



Figura 3- Alicates utilizado nas exodontias dos molares (Wengart®).

3.3- Eutanásia dos animais e remoção dos músculos masseter e pterigóideo medial

No final de cada período: 15 dias (Grupo GI); 30 dias (Grupo GII) e 60 dias (Grupo GIII) foi realizada a eutanásia dos animais do grupo experimental com o correspondente grupo controle. A eutanásia, de cada animal utilizado,

para o estudo de ML, foi realizada administrando-se uma sobredose de anestésico (10 vezes a dose usada para anestesia convencional), levando o animal a óbito por parada cardio-respiratória. Já, para o estudo de ultraestrutura os animais foram eutanasiados com anestesia geral prévia e infusão intracardíaca do fixador (solução modificada de Karnovsky). Os músculos Masseteres e Pterigóideos Mediais (PTM) bilaterais de cada animal foram removidos inteiros e estendidos em superfície de papel pardo para facilitação do adequado plano de corte. Da parte profunda do Masseter e da porção média do PTM, foram obtidos de cada músculo, um fragmento em corte transversal, com cerca de 0,3cm de espessura. Cada fragmento foi etiquetado com os seus dados de identificação e acondicionado em solução fixadora adequada para cada técnica.

3.4- Técnica para Microscopia de Luz (ML)

O material obtido de cada animal foi fixado em formalina a 10% tamponada; mantido durante 24 horas, e posteriormente, processado através de técnica rotineira para inclusão em parafina. De cada bloco correspondente a cada um dos músculos Masseter e PTM direito e esquerdo do grupo experimental e Músculos esquerdos do grupo controle, foram confeccionadas lâminas contendo cinco cortes transversais, semi-seriados, com 5 μ m de espessura.

3.5- Morfometria - análise quantitativa

O estudo de morfometria baseou-se na análise da medida da área da fibra, utilizando-se de cortes transversais corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (H&E). Em aumento microscópico de 10x, o melhor campo contendo fibras com seus limites bem definidos, eram selecionados. Este campo era submetido a um aumento de 40x e fotografado em um fotomicroscópio (Leica DMRB, Germany), acoplado a um programa digital. Da imagem obtida, doze fibras eram selecionadas para a realização da medida de área. Essa mensuração era tomada,

circunscrevendo-se a fibra e seu valor era calculado através de um programa software AXION-vision. Um total de sessenta medidas por lâmina foi obtido no grupo experimental ou seja, 240 medidas por animal, totalizando 1200 medidas no grupo, considerando os três períodos experimentais (G1+GII+GIII) para cada músculo: PTM (Figura 4,5,6) e Masseter (Figura 7,8,9). Já, no grupo controle, um total de cem medidas por lâmina foi realizado, 200 medidas por animal e 600 medidas por grupo.

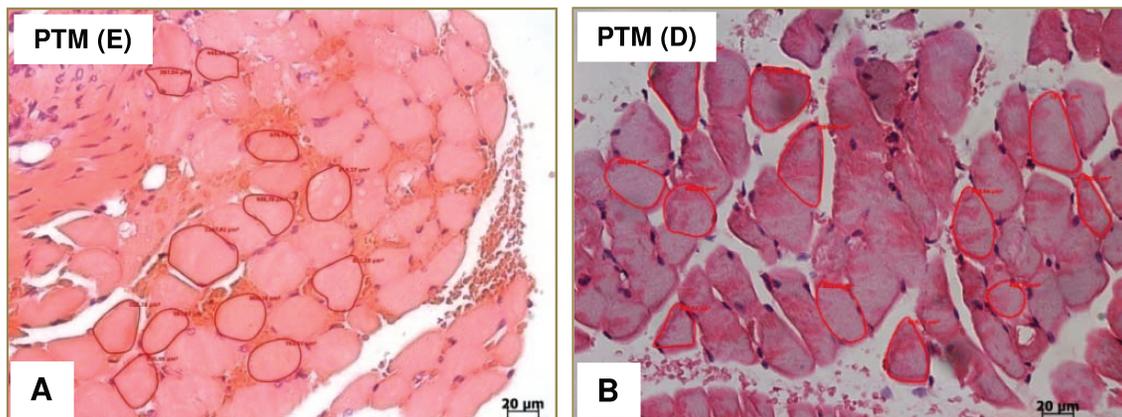


Figura 4- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo (A) e direito (B), grupo G1 (15 dias).

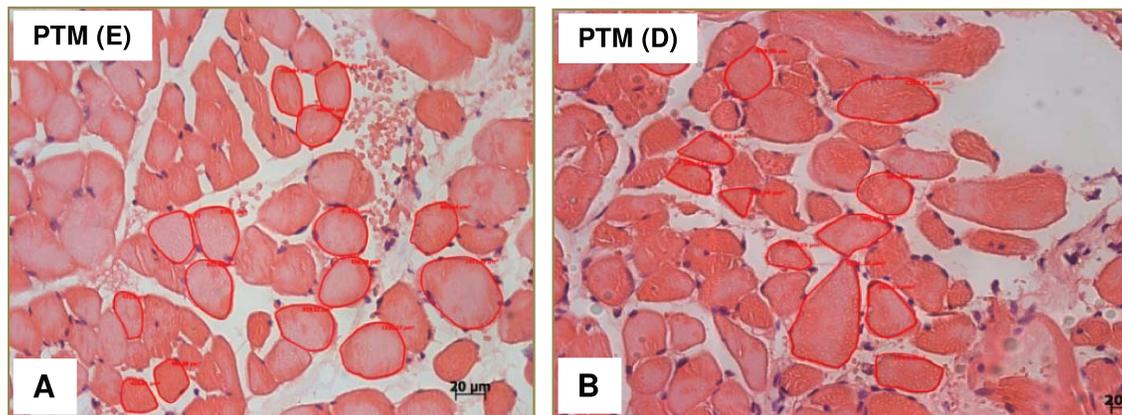


Figura 5- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo (A) e direito (B), grupo GII (30 dias).

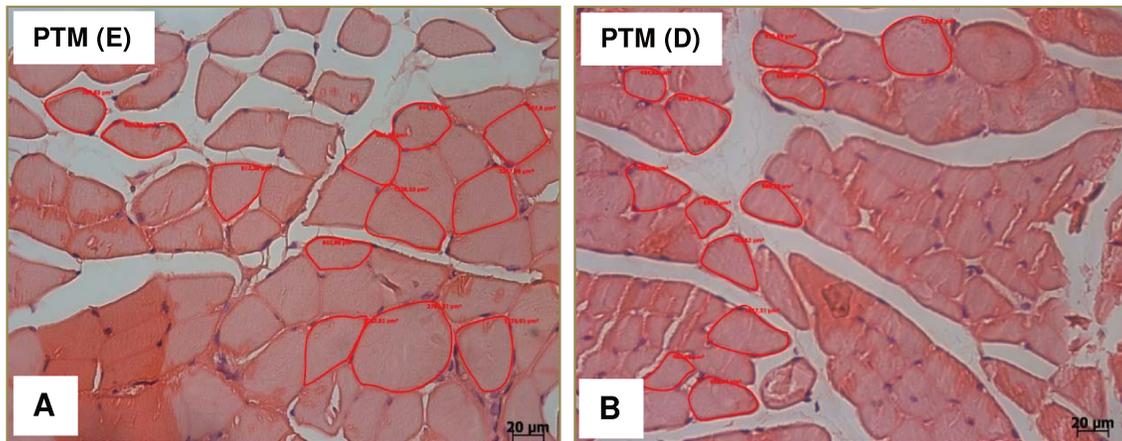


Figura 6- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo PTM esquerdo **(A)** e direito **(B)**, grupo GIII (60 dias).

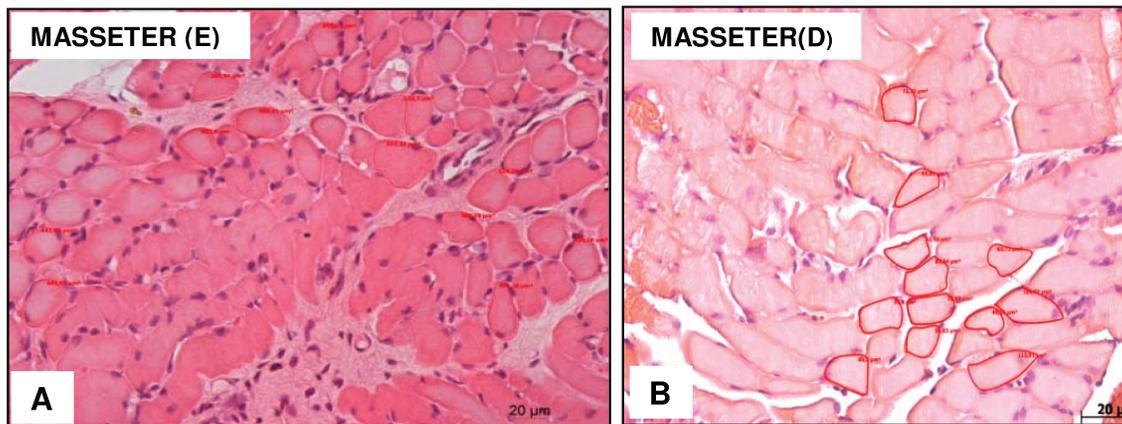


Figura 7- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo **(A)** e direito **(B)**, grupo GI (15 dias).

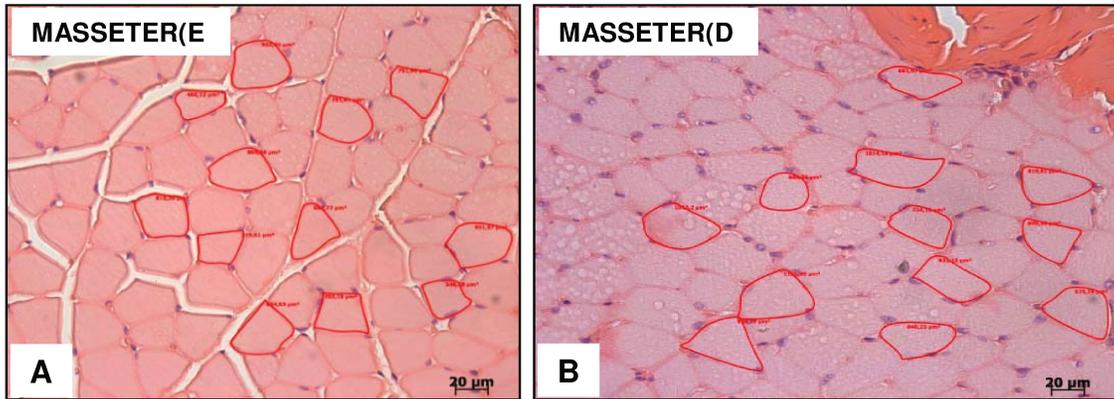


Figura 8- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo **(A)** e direito **(B)**, grupo GII (30 dias).

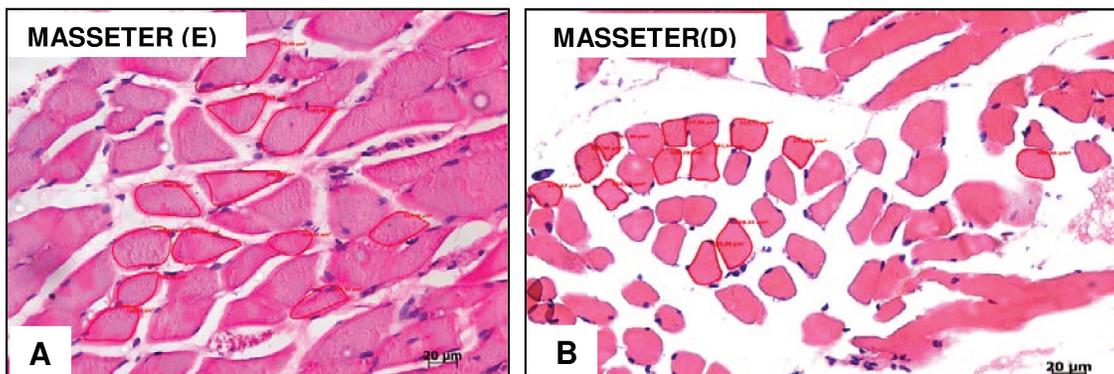


Figura 9- Circunscrição de fibras para medida de área em μm^2 , do músculo Masseter esquerdo **(A)** e direito **(B)**, grupo GIII (60 dias).

3.6- Técnica para Microscopia de Luz Polarizada (MP)

De cada bloco correspondente a cada um dos músculos Masseter e PTM, lados direito e esquerdo do grupo experimental e músculos esquerdos do grupo controle, foram confeccionadas lâminas contendo cinco cortes transversais,

semi-seriados, com 10µm de espessura, corados pelo método Picro-sirius⁽³²⁾, para a avaliação das fibras colágenas. A análise das lâminas foi realizada sob luz polarizada em aumentos de 40x e fotografadas (fotomicroscópio Leica DMRB, Germany). Esse estudo consistiu na avaliação qualitativa das fibras colágenas presentes nos envoltórios de tecido conjuntivo, das fibras dos músculos PTM e Masseter, segundo os tipos de fibras colágenas (vide descrição abaixo e Figuras 4 e 5).

3.6.1- Caracterização das fibras colágenas no tecido muscular sob técnica de picro-sirius e polarização

O colágeno constitui uma família de proteínas que se diferenciaram durante a evolução assumindo morfologia e patologia características. As fibras colágenas são birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas e paralelas. Desse modo, quando examinadas ao microscópio de polarização entre filtros polaroides cruzados, estas fibras aparecem brilhantes contra um fundo escuro⁽³⁴⁾. O músculo estriado esquelético possui membranas conjuntivas formadas por fibras colágenas. A camada de fibras colágenas que envolve o músculo é denominada epimísio, as que envolvem um grupo de fibras musculares formam o perimísio a que reveste cada fibra muscular é o endomísio. Existem distintos tipos de fibras colágenas, a saber: tipo I, II e III. Esses tipos podem ser mostrados através de coloração especial como Picro-sirius, que sob efeito de polarização revela diferentes cores. As fibras colágenas do Tipo I, podem se apresentar nas cores: amarela, laranja ou vermelha (Figura10), enquanto que o colágeno do tipo III (fibras reticulares) aparece em verde (Figura 11) o colágeno do tipo II (presente na cartilagem), apresenta uma variável coloração de acordo com o tecido e a espécie⁽³⁵⁾.

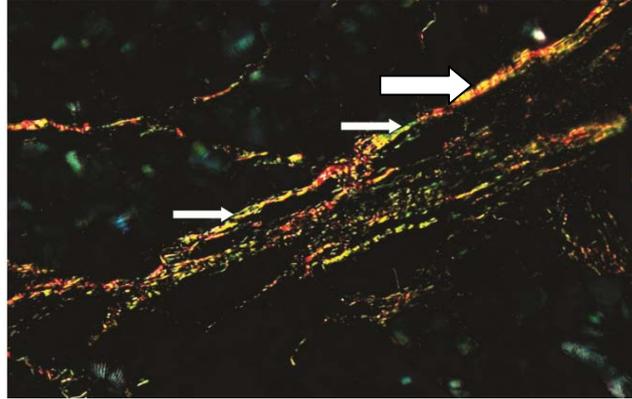


Figura 10- Músculo PTM do grupo controle I (GCI), presença de fibras colágenas do tipo I (seta maior) e do tipo III (setas menores). Picro- sirius - 40x.

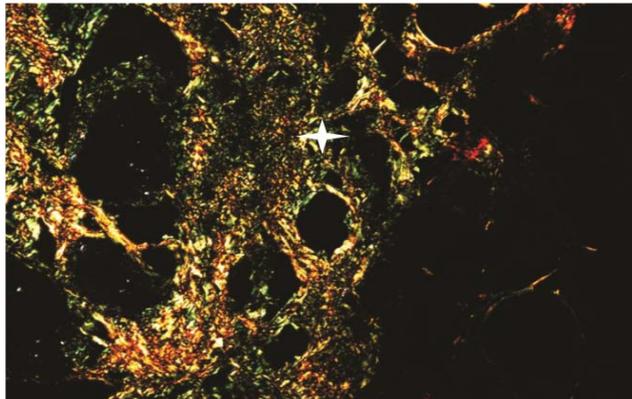


Figura 11- Músculo Masseter do grupo I (GI), presença predominante de fibras colágena do tipo III (☆). Picro-sirius (40x).

3.7- Técnica para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Essa técnica consistiu no seguinte protocolo: primeiramente os animais foram pré-medicados com opióide (tramadol 6mg/kg) por via intramuscular profunda, para garantir analgesia. Após dez minutos, realizou-se anestesia geral do tipo dissociativa, onde foi utilizado a associação anestésica ketamina (Dopalen)

50mg/kg/xilazina(Rompum) 0,5mg/kg na mesma seringa, injetados por via intramuscular. Foi feita a perfusão intracardiaca dos animais com a solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeido e 2% de paraformaldeido a 0,1M, tamponado com fosfato de sódio/pH=7,3). De cada animal, fragmentos com 0,3cm de espessura, em corte transversais, foram retirados da região profunda do Masseter e da porção média do PTM esquerdos. Estes foram refragmentados em múltiplos diminutos fragmentos, fixados em solução modificada de Karnovsky e em seguida mergulhados na solução de glutaraldeido, por duas horas. Seguiu-se com lavagem do material em solução salina e pós-fixação com Tetróxido de Ósmio (OsO₄) a 2%, por um período de 2 horas a 4°C. O material permaneceu em um terceiro pós-fixador o acetato de uranila, "overnight". Após este período iniciou-se a desidratação, passando o material por uma série crescente de etanol: 70°, 80°, 90° e 95° banhos de 15 minutos e etanol absoluto, quatro banhos de 15 minutos cada, mais dois banhos de óxido de propileno de 15 minutos cada. Finalizando esses banhos, iniciou-se a infiltração composta por uma mistura de resina e óxido de propileno, na proporção de 1:1, durante um período de 40 min, seguida da troca para 3:1, por 1:30h. Em seguida, mudou-se para resina pura, deixando "overnight", sempre no misturador rotatório. Após esse período, foi realizado o processo de inclusão do material, ficando na estufa por 3 dias a 60°C. Passado esse período, preparou-se o bloco para a trimagem, dos quais foram retirados cortes semifinos com 300nm, observados em microscópio óptico e selecionados os melhores para cortes ultrafinos, com 60nm. Utilizou-se de graticulas específicas de 200 mesh, para o suporte do material para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão.

Esse estudo consistiu na observação qualitativa dos achados ultraestruturais dos filamentos de proteínas constituintes das miofibrilas (linha Z e banda I) dos músculos Masseter e PTM, nos diferentes períodos evolutivos de 15, 30 e 60 dias.

3.8- Análise estatística

A análise estatística foi aplicada, nos dados obtidos quanto às medidas morfométricas de área, das fibras musculares dos músculos: Masseter e PTM, utilizando-se ANOVA. Para o PTM empregou-se ANOVA com dois fatores para comparar a área das fibras musculares de animais controle e operados utilizando-se o Intervalo de Bonferroni, pois este músculo apresentou nível de significância ($p < 0,05$). Para o Masseter a análise foi feita com intervalo de confiança. Fez-se a comparação entre as médias das medidas de área das fibras musculares dos músculos do grupo experimental e controle; entre as medidas de áreas dos músculos dos lados direito e esquerdo dos grupos experimentais e lado esquerdo do grupo controle.



4- RESULTADOS

4.1- Morfometria - análise quantitativa

O estudo morfométrico do músculo Pterigoideo Medial revelou que os ratos submetidos ao experimento mostraram, no período analisado, valores significativamente inferiores em relação ao grupo controle, quanto à medida média global de área dessas fibras musculares, tanto ipsi quanto contralateral à exodontia (Gráfico 1). Não foram detectadas diferenças, quando se comparou os lados entre si ($p=0,743$) bem como quando se avaliaram os quesitos interação entre lados e grupos ($p=0,926$) (Gráfico 2), ou seja, a área das fibras musculares dos lados Esquerdo e Direito, apresenta o mesmo comportamento em função do tempo pós exodontia (15 dias, 30 dias e 60 dias) (Gráfico 1 e Tabela 2). Esses dados apontam, que as fibras do músculo Pterigoideo medial, de ambos os lados sofrem alterações semelhantes após exodontia unilateral de molares. Também foram notadas diferenças quando se comparou os grupos experimentais: grupo GIII com os grupos GI e GII ($GIII \neq GI$, $p=0,022$ e $GIII \neq GII$, $p=0,043$), onde se observou aumento progressivo das áreas das fibras, sendo a média maior da área no Grupo GIII, correspondente a sessenta dias do experimento (Gráfico 2). Apesar dessa constatação do crescimento progressivo da área das fibras, não se pode afirmar, nesse estágio avaliatório (60 dias), que as fibras mostram-se hipertróficas, uma vez que a média dos valores obtidos é inferior à do grupo controle, para ambos os lados, no mesmo período (Tabela 2). Também se observa que não houve interação entre a média das áreas das fibras musculares do grupo experimental e controle, tanto do lado esquerdo quanto do lado direito, nos diferentes períodos evolutivos (Tabela 2 e Gráfico 3).

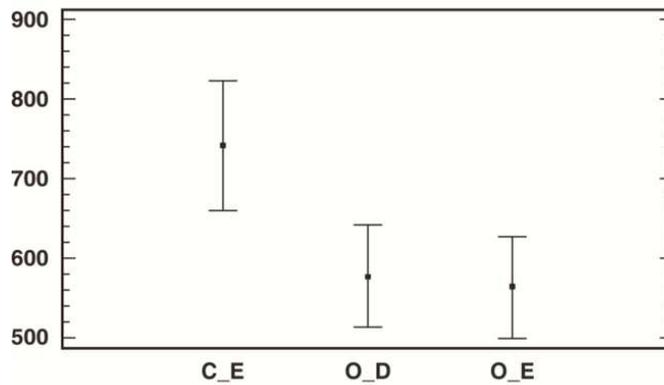


Gráfico 1- Valores obtidos em μm^2 das medidas correspondentes às áreas das fibras dos músculos pterigóideo medial dos grupos experimental (lado direito e esquerdo) e grupo controle C_E=Grupo Controle; O_D=Grupo Experimental / Operado Direito; O_E=Grupo Experimental / Operado Esquerdo. Lado direito X Controle ($p=0,012$). Grupo Experimental Lado Esquerdo X Controle ($p=0,012$). Grupo Experimental lado direito=lado esquerdo ($p=0,743$).

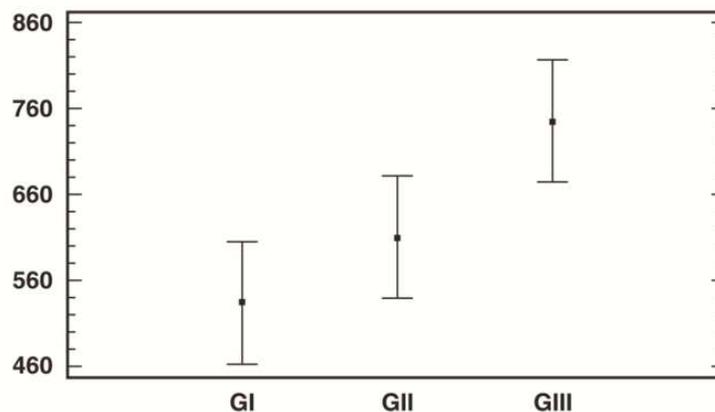


Gráfico 2- Resultados observados nos ratos submetidos ao experimento quanto à medida global de área dos lados direito e esquerdo do músculo PTM em relação ao tempo pós-exodontia (Grupos experimentais) $p=0,926$.

Tabela 2- Valores médios obtidos quanto à análise morfométrica de área em μm^2 , do músculo Pterigoideo Medial nos animais experimentais e controle, nos diferentes períodos evolutivos.

Músculo	Grupo I (GI)			Grupo II (GII)			Grupo III (GIII)		
	15 dias			30 dias			60 dias		
Pterigoideo Medial	E-d	E-e	C-e	E-d	E-e	C-e	E-d	E-e	C-e
	488,7	517,0	597,0	534,2	519,0	777,8	718,1	667,1	849,1
	$\pm 306,4$	$\pm 297,0$	$\pm 256,7$	$\pm 275,2$	$\pm 240,4$	$\pm 408,4$	$\pm 332,6$	$\pm 290,6$	$\pm 344,1$

Comparação entre os lados direito e esquerdo ($p=0,827$) e também lados direito e esquerdo nos diferentes grupos (períodos evolutivos) **GI=15**; **GII= 30** e **GIII=60dias**. **E-d**=músculo experimental direito; **E-e**= músculo experimental esquerdo; **C-e**=músculo controle esquerdo.

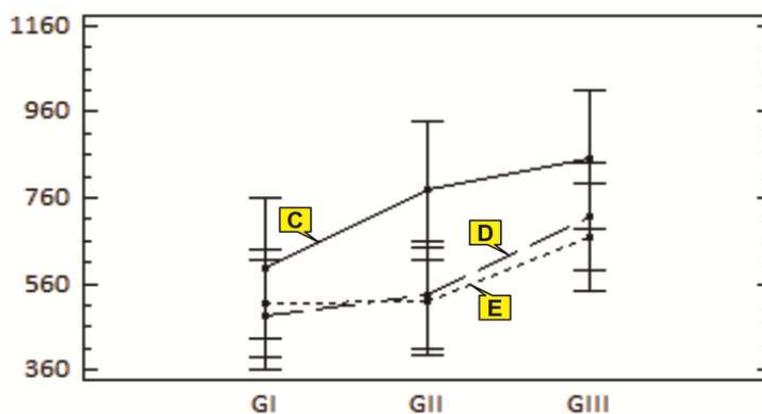


Gráfico 3- Resultados observados da medida de área em μm^2 , entre o grupo experimental lados direito e esquerdo e o controle, nos diferentes períodos evolutivos ($p=0,743$). **E**=esquerdo; **D**=direito e **C**=controle.

Quando se avalia a distribuição da área das fibras, nota-se que para o grupo GI, (lados direito e esquerdo), bem como o controle há uma maior concentração de fibras, entre os intervalos de 200 e 600 μm^2 em todos os grupos (Gráfico 4). Já para o grupo GII (lados direito e esquerdo) a concentração das

fibras foi entre os intervalos de 200 e 400 μm^2 e para o controle entre 400 e 800 μm^2 (Gráfico 5). O grupo GIII mostrou maior concentração no intervalo de 400 e 600 μm^2 , para o lado esquerdo, sendo de 400 a 800 μm^2 para o lado direito e controle (Gráfico 6).

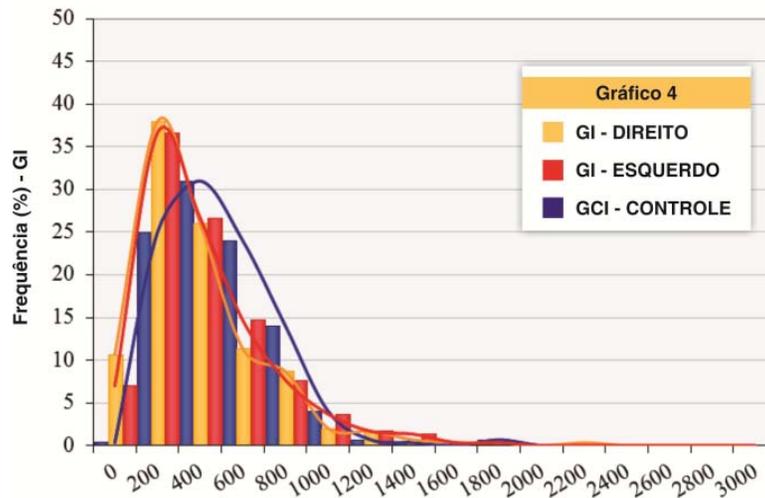


Gráfico 4- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GI (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCI), correspondente ao período evolutivo de 15 dias (GI).

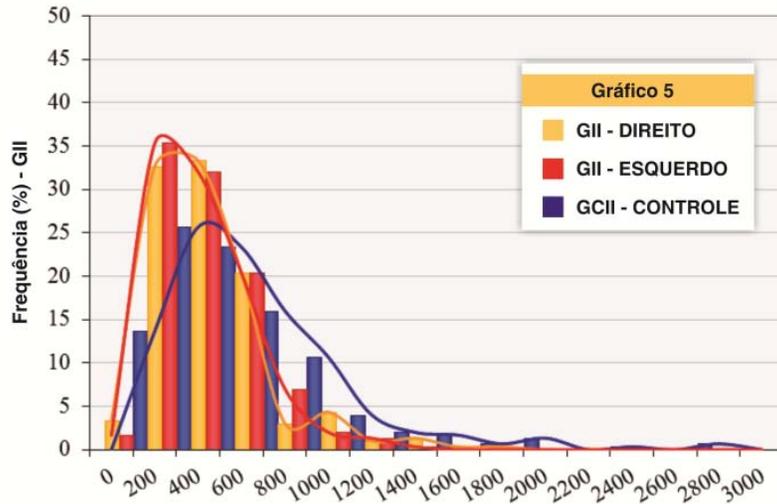


Gráfico 5- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCII), correspondente ao período evolutivo de 30 dias (GII).

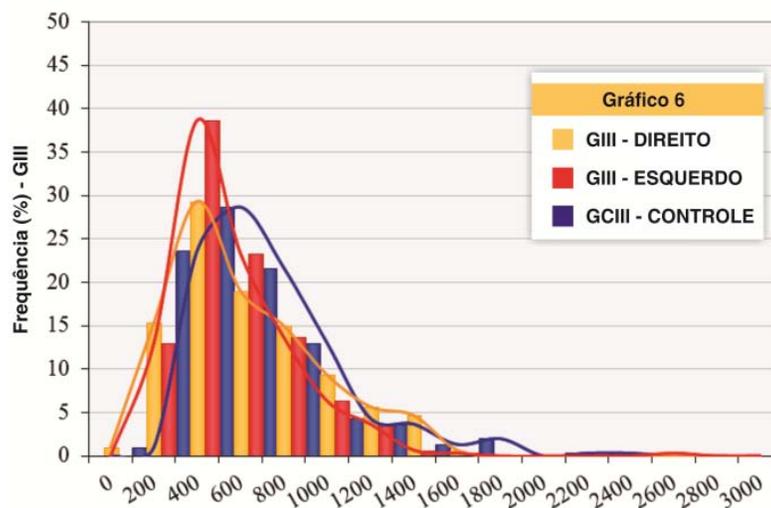


Gráfico 6- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Pterigóideo Medial do grupo GIII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCIII), correspondente ao período evolutivo de 60 dias (GIII).

A análise morfométrica do músculo Masseter, não mostrou diferença na comparação entre os ratos submetidos ao experimento e o grupo controle, quanto à medida média global de área dessas fibras, tanto ipsi quanto contralateral à exodontia, no período analisado, ($p=0,520$). Semelhanças foram observadas quando se comparou os lados entre si ($p=0,200$) (Gráfico 12), bem como quando se avaliaram os quesitos interação entre lados e grupos ($p=0,926$ e Gráfico 13), ou seja, a área das fibras musculares dos lados Esquerdo e Direito, apresenta o mesmo comportamento em função do tempo pós exodontia (15 dias, 30 dias e 60 dias). Também não houve interação entre a média das áreas das fibras musculares do grupo experimental e controle, tanto do lado esquerdo quanto do lado direito, nos diferentes períodos evolutivos (Tabela 3 e Gráfico 9).

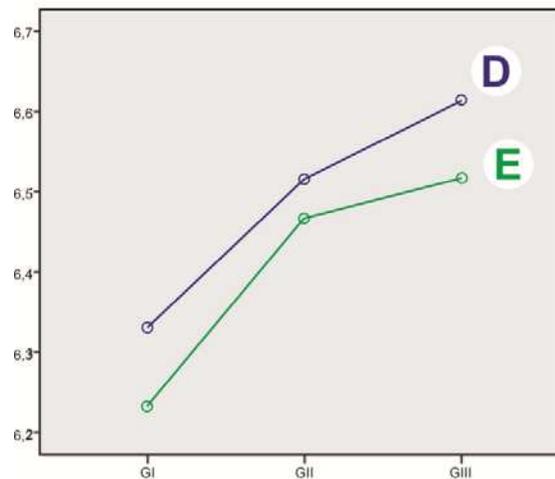


Gráfico 7- Resultados observados quanto à média de área em μm^2 , das fibras musculares do Masseter nos grupos experimentais em relação ao tempo pós-exodontia nos lados direito (**D**) e esquerdo (**E**) ($p=0,200$).

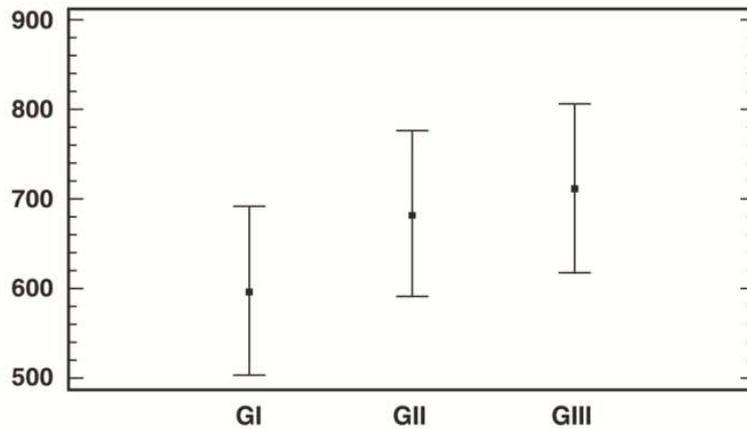


Gráfico 8- Resultados observados quanto à medida global de área em μm^2 , das fibras musculares do Masseter nos grupos experimentais em relação ao tempo pós-exodontia nos lados direito (**D**) e esquerdo (**E**) ($p=0,926$).

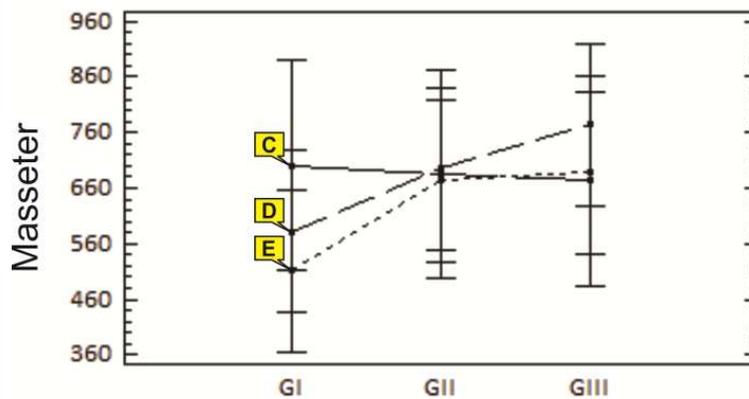


Gráfico 9- Resultados observados da medida de área em μm^2 , entre o grupo experimental lados direito e esquerdo e controle, nos diferentes períodos evolutivos ($p=0,671$). **E**=esquerdo; **D**=direito e **C**=controle.

Tabela 3- Valores médios obtidos em μm^2 , quanto à análise morfométrica de área do músculo Masseter nos animais experimentais e controle, nos diferentes períodos evolutivos.

Músculo	Grupo I (GI)			Grupo II (GII)			Grupo III(GIII)		
	15 dias			30 dias			60 dias		
	E- d	E-e	C- e	E-d	E-e	C-e	E-d	E-e	C-e
Masseter	701,2	582,5	512,3	684,6	694,8	672,6	673,4	773,9	687,0
	$\pm 240,1$	$\pm 225,7$	$\pm 198,0$	$\pm 288,8$	254,0	$\pm 298,6$	$\pm 250,0$	$\pm 311,7$	$\pm 230,9$

Comparação entre os lados direito e esquerdo ($p=0,200$) e também lados direito e esquerdo nos diferentes grupos (períodos evolutivos) **GI**=15; **GII**=30 e **GIII**=60dias. **E-d**=músculo experimental direito; **E-e**=músculo experimental esquerdo; **C-e**=músculo controle esquerdo.

Quando se avalia a distribuição da área das fibras, nota-se que para o grupo GI (lados direito e esquerdo), há uma maior concentração de fibras, entre os intervalos de 400 e 700 μm^2 (Gráfico 10) e para o grupo controle a maior concentração está no intervalo de 400 e 600 μm^2 , para todos os períodos evolutivos (Gráfico 10, 11 e 12). Para o grupo GII (lados direito e esquerdo) a concentração das fibras foi entre os intervalos de 400 e 600 μm^2 (Gráfico 11). O grupo GIII mostrou maior concentração no intervalo de 400 e 800 μm^2 , para os lados direito e esquerdo (Gráfico 12).

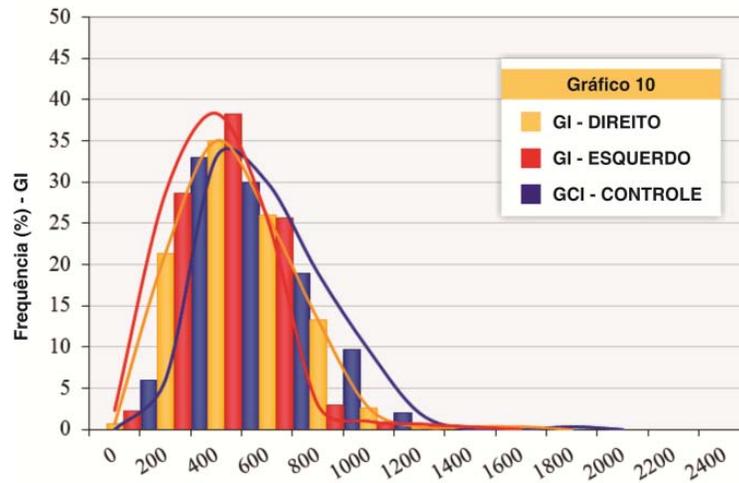


Gráfico 10- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GI (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCI), correspondente ao período evolutivo de 15 dias.

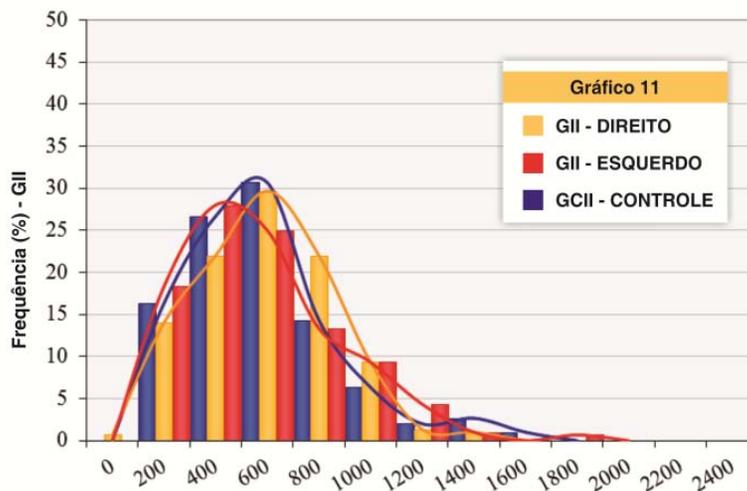


Gráfico 11- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCII), correspondente ao período evolutivo de 30 dias.

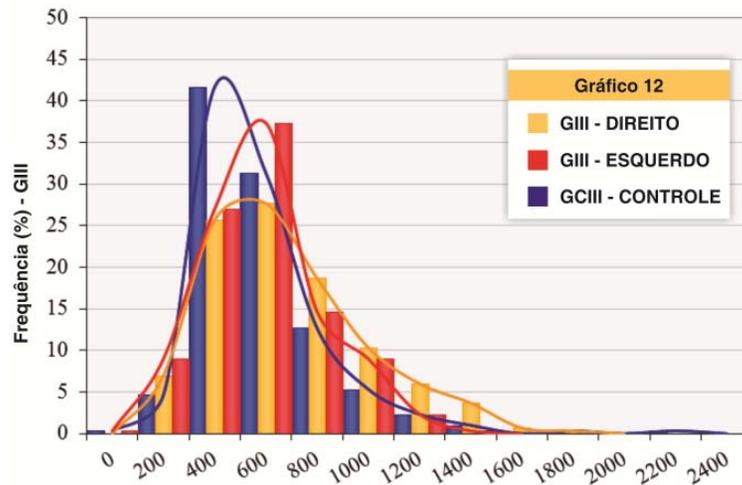


Gráfico 12- Valores médios referentes à área (μm^2) e respectivas curvas de distribuição das fibras do músculo Masseter do grupo GIII (lados direito e esquerdo) e grupo Controle (GCIII), correspondente ao período evolutivo de 60 dias.

4.2- Ultraestrutura das fibras musculares

Esta análise mostrou dano ultraestrutural ao nível do músculo PTM, no grupo GII, correspondente a 30 dias do experimento. Observou-se alteração das miofibrilas, caracterizadas pela desorganização e assimetria dos seus filamentos de proteínas, correspondentes a linha Z e banda I (Figura 12). No músculo Masseter tais estruturas mantiveram-se simétricas e organizadas, em todos os grupos examinados (Figura 13).

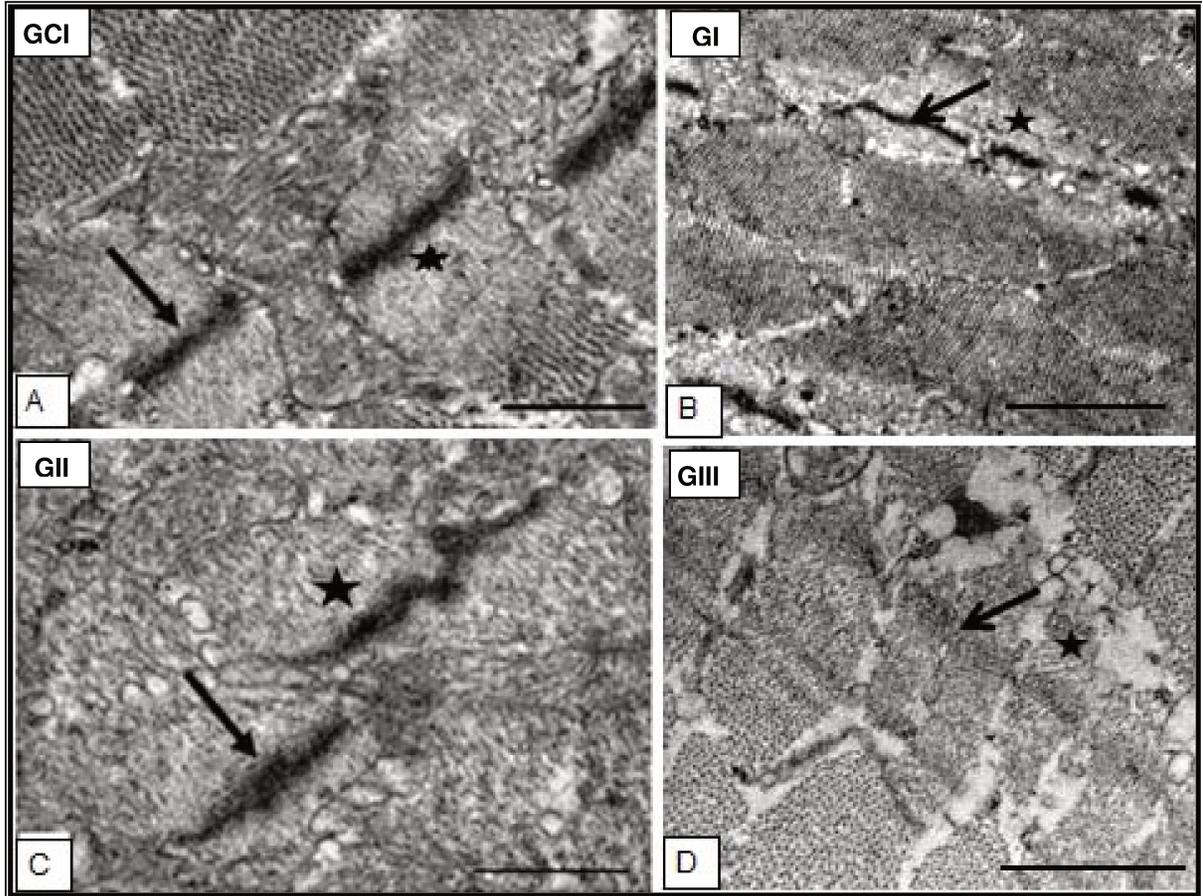


Figura 12- Ultraestrutura do músculo PTM esquerdo. **(A)** controle e grupo experimental GI **(B)**, GII **(C)** e GIII **(D)**. Notar no grupo GII **(C)** nítida desorganização das linhas Z (setas) entre as bandas I (*). Comparar com o controle **(A)** e grupo experimental **(B,D)**, onde essas linhas mostram disposição simétrica e organizada. (Barra de calibração: 1 μ m)

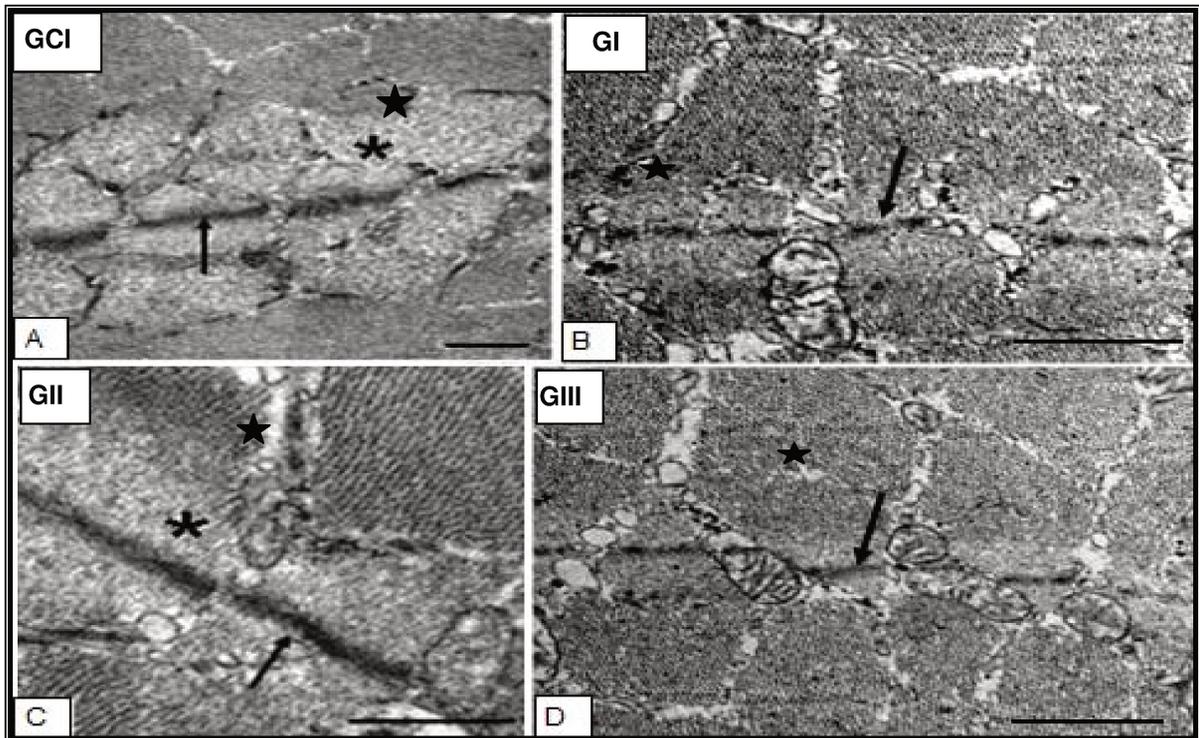


Figura 13- Ultraestrutura do músculo Masseter. **(A)** grupo controle e grupo experimental: GI **(B)**, GII **(C)** e GIII **(D)**. Notar que, em todos os grupos as linhas Z (setas) e bandas I apresentam-se com disposição simétrica e organizada. **(A-** Barra de calibração: 0,5 μ m) **(B-D-** Barra de calibração: 1,0 μ m).

4.3- Análise das fibras colágenas no tecido muscular

A análise das fibras colágenas, nos músculos mastigadores avaliados, mostrou que os seus fascículos são constituídos por delicada rede de fibras colágenas do tipo I (vermelho, laranja, amarelo) e do tipo III ou reticulares (verde), com predomínio do tipo III nos músculos Masseteres, nos diferentes períodos evolutivos (Figura 14). Exceto, em um único animal do grupo GI (15 dias), no Masseter esquerdo onde se observou aparente aumento de fibras colágenas do tipo I e do tipo III, sem predomínio de qualquer uma delas (Figura 15B). No grupo controle (Figura 14A), observou-se a presença de poucas fibras

colágenas ao redor dos fascículos musculares, com predominância de fibras do tipo III.

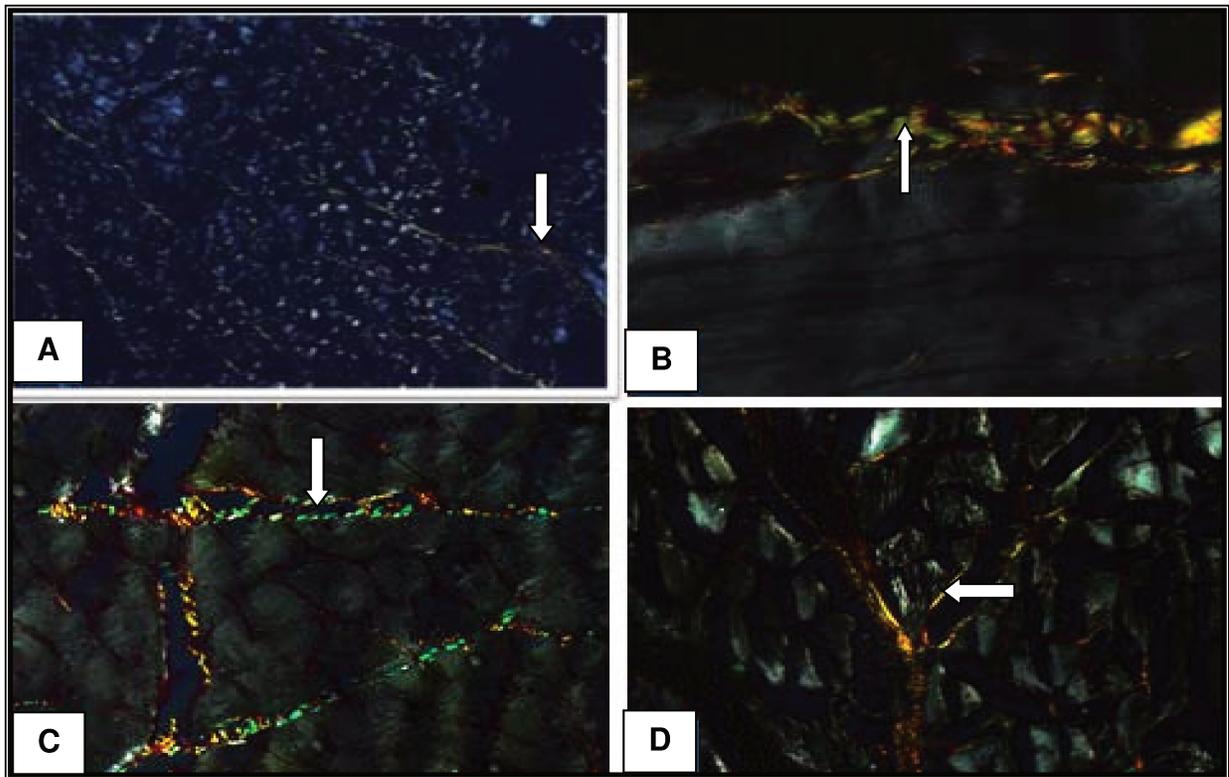


Figura 14- Músculo Masseter direito, corte transversal do sob luz polarizada. Notar as poucas fibras colágenas constituintes dos feixes musculares e predominância de fibras do tipo III (setas), tanto no controle **(A)**, como nos grupos G1 **(B)**; GII **(C)** e GIII **(D)**. Aumento de 40x.

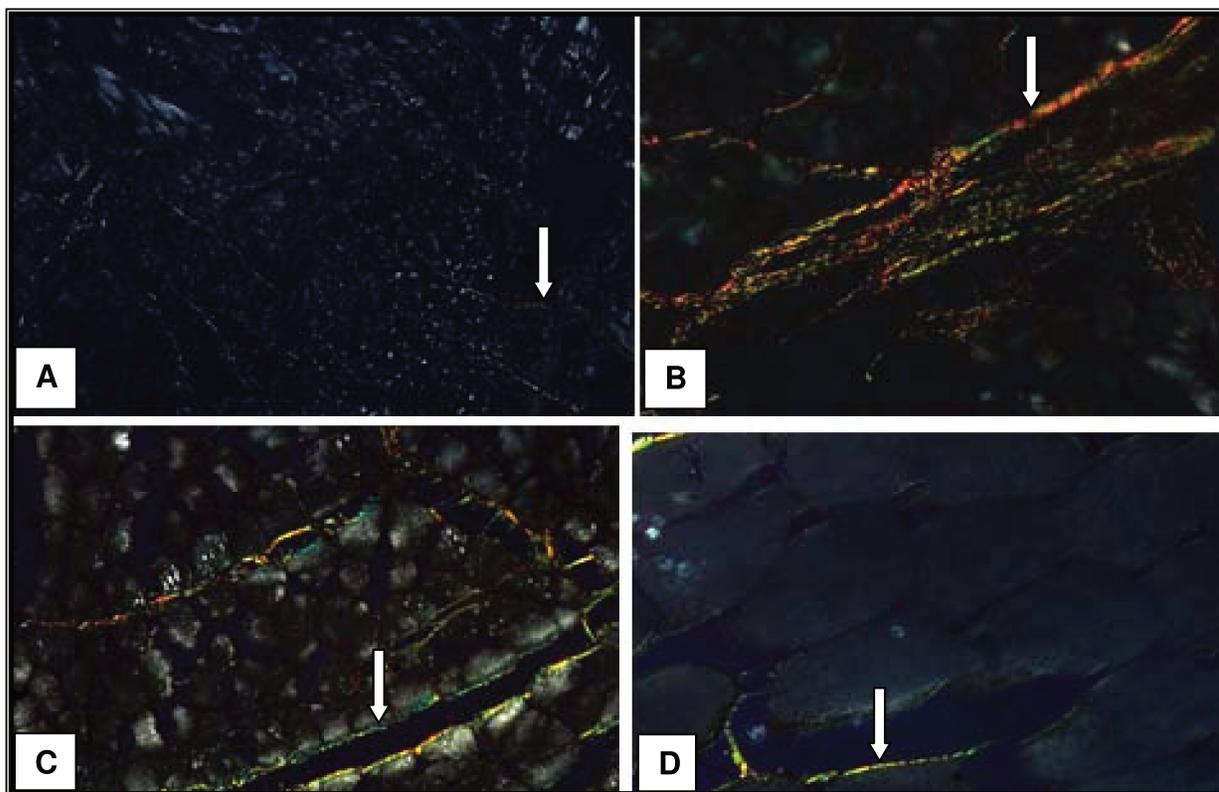


Figura 15- Músculo Masseter Esquerdo, corte transversal do sob luz polarizada. Notar as poucas fibras colágenas constituintes dos feixes musculares e predominância de fibras do tipo III (setas), tanto no controle **(A)**, como nos grupos GII **(C)** e GIII **(D)**. Observar aparente aumento de fibras do tipo I (setas), e III (estrela), de um rato do grupo I **(B)**. Aumento de 40x.

Com relação ao músculo Pterigóideo Medial, evidenciou fibras colágenas dos dois tipos I e III sem aumento ou predomínio destas, em ambos os lados, nos diferentes períodos evolutivos (Figuras 16 e 17).

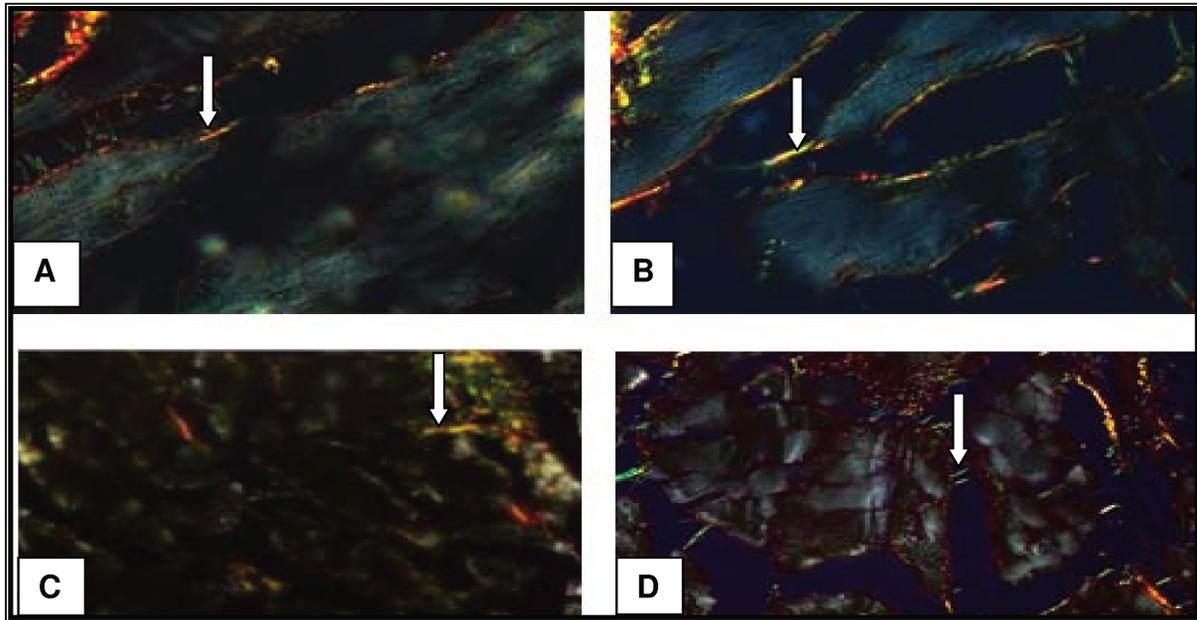


Figura 16- Músculo Pterigóideo Medial Direito, corte transversal do sob luz polarizada. Notar as poucas fibras colágenas constituintes dos feixes musculares e predominância de fibras do tipo III (setas), tanto no controle **(A)**, como nos grupos GI **(B)**, GII **(C)** e GIII **(D)**. Aumento de 40x.

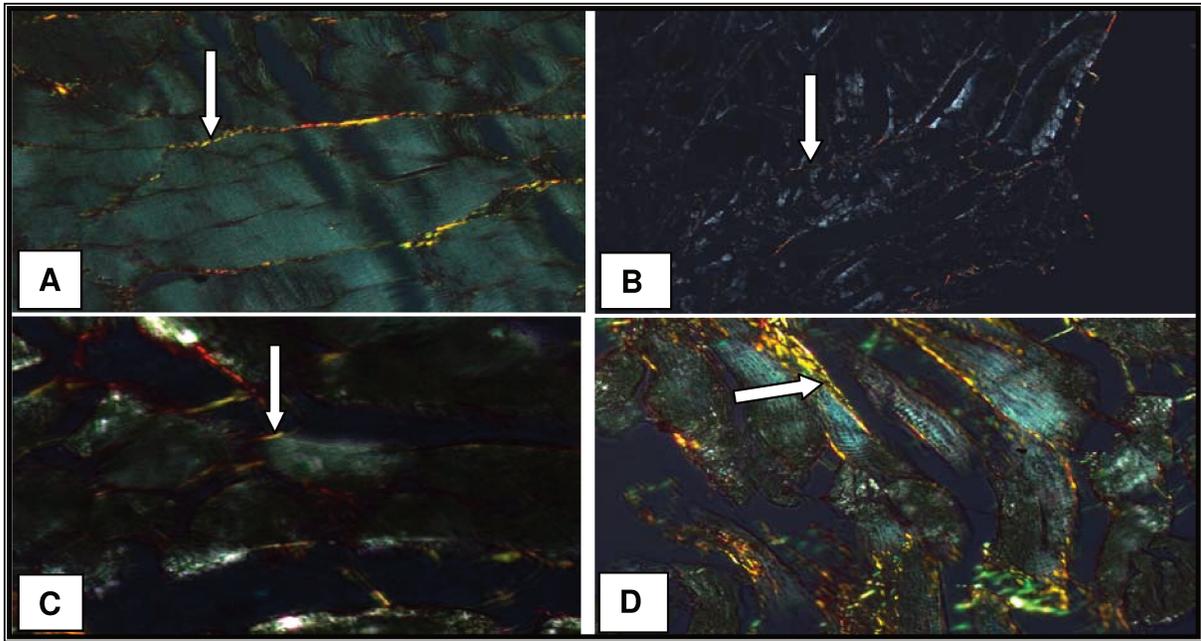


Figura 17- Músculo Pterigóideo Medial Esquerdo. Fibras colágenas dos tipos I (vermelho, laranja, amarelo) e III (verde). Característica da distribuição dos tipos de fibras no grupo controle **(A)**, com poucas fibras constituintes dos fascículos musculares (setas). O mesmo aspecto foi notado para o grupo experimental GI **(B)**, GII **(C)** e GIII **(D)**. Picro-sirius sob luz polarizada. (Barra de calibração: 20 μ m).

Não foi caracterizada proliferação evidente de fibras colágenas, com predomínio de fibras do tipo I, em nenhum dos músculos analisados, nos diversos grupos experimentais.



5- DISCUSSÃO

Os movimentos mastigatórios estão diretamente relacionados com os músculos mastigadores. Qualquer desarmonia do sistema estomatognático pode ter repercussão sobre essa musculatura. Raros estudos discutem os efeitos da desarmonia oclusal no sistema estomatognático humano^(11,14,18).

Estudo anterior do autor⁽¹⁴⁾, mostrou que a zona bilaminar da ATM humana, um dos componentes do sistema estomatognático, apresenta alterações morfológicas quando se compara qualitativamente a estrutura em indivíduos jovens (dentados) e pessoas idosas(edêntulas).

Modelos animais como os realizados por^(6,7,12,20,21), têm sido estimulados em decorrência das limitações desses experimentos em humanos.

No presente estudo, a escolha do rato wistar como modelo experimental se baseou na semelhança da anatomia, localização e arranjo arquitetural do músculo Masseter e PTM, ao de humanos, conforme descreveram⁽³⁸⁾.

A análise morfológica tem contribuído pouco na detecção de alterações das fibras musculares esqueléticas^(6,12,20,21). Já estudos, através da ultraestrutura têm sido motivo de investigação em músculos estriados esqueléticos^(7,15).

Os primeiros trabalhos que utilizaram a luz polarizada, na detecção e diferenciação dos subtipos de fibras colágenas, foram realizados, em tecido muscular esquelético⁽³²⁾, através da coloração de sirius red, seguida da utilização do picrosirius em 1979, o picrosirius mostrou-se mais eficiente, o que tornou seu uso mais frequente nas pesquisas com essas finalidades⁽³³⁾. Esses estudos, sob luz polarizada permitiram caracterizar o colágeno dos envoltórios das fibras musculares esqueléticas, técnica utilizada no presente estudo para a avaliação qualitativa das referidas fibras.

Devido à necessidade de um método de estudo mais objetivo e acurado, a morfometria tem sido cada vez mais utilizada na avaliação de fibras musculares esqueléticas^(6,9,15,16,22,23).

Dentre os trabalhos que utilizaram morfometria para a medida de área de fibra muscular esquelética, o que mais se assemelha, quanto ao método do presente estudo, foi realizado por⁽²²⁾, que constataram aumento da área das fibras do músculo Sóleo de rato, após exercício físico.

Andreo et al.⁽²³⁾, utilizaram a morfometria, na quantificação e medida de área dos tipos de fibras musculares oxidativas rápidas e lentas, nos músculos: Masseter, Temporal e Digástrico de macacos e verificaram que as fibras rápidas têm área maior e são mais frequentes em todas as regiões estudadas. Nenhuma diferença na frequência ou área de cada tipo de fibra foi detectada, considerando as regiões anterior e posterior dos músculos Masseteres e Temporais.

Em nosso estudo, a análise morfométrica do músculo PTM mostrou diferença entre os animais experimentais e controle, na análise global compreendendo os três períodos evolutivos. Esta diferença se caracterizou por redução da área das fibras musculares nos animais submetidos à exodontia, em ambos os lados do PTM. Já, o músculo Masseter não mostrou alterações, nessas condições.

Vreeke et al.⁽²⁵⁾, encontraram diminuição da área das fibras lentas do m. Masseter, com a redução na carga mastigatória. Também⁽³⁹⁾ avaliaram o músculo Masseter, através da medida de área das fibras, verificaram atrofia temporária do músculo e⁽²²⁾, ao contrário, constataram aumento da área das fibras do músculo Sóleo de rato, após exercício físico.

Miehe et al.⁽⁹⁾, avaliando o peso e o tipo de fibra dos músculos mastigadores, pós exodontia de molares, em ratos wistar, constataram redução de peso e aumento de fibras do tipo II.

Em nosso estudo, não foram detectadas diferenças, quando se comparou a medida média global de área das fibras do músculo PTM, lados direito e esquerdo entre si, bem como quanto ao quesito interação entre lados e grupos,

nos diferentes períodos evolutivos. Os mesmos achados foram observados quanto ao músculo Masseter. Esses dados apontam que as fibras desses músculos mastigadores sofrem alterações semelhantes, pós exodontia unilateral de molares.

Iyomasa et al.⁽⁶⁾, realizaram estudo morfométrico do músculo Pterigóideo Medial de roedor (gerbil), após exodontia dos molares superiores esquerdos. Verificaram que a borda anterior deste músculo apresentou encurtamento quando se comparou os lados esquerdos e direitos entre si, cada um dos lados com os respectivos controles.

Nesse trabalho, diferenças também foram notadas quando se comparou o músculo PTM do grupo experimental, nos distintos períodos evolutivos, detectando-se aumento progressivo das áreas das fibras, sendo a média maior da área no Grupo GIII, correspondente a sessenta dias do experimento. Apesar dessa constatação do crescimento progressivo da área das fibras, elas não se tornam hipertróficas nesse estágio avaliatório, uma vez que a média dos valores obtidos, nesse estágio, é semelhante à do grupo controle, no mesmo período. Ou seja, parecem adaptar-se às mudanças, conferindo medida de área semelhante ao controle, ao final do experimento.

Seiryu et al.⁽³⁹⁾, observaram atrofia temporária do músculo Masseter, enquanto se adaptava à nova posição da mandíbula e Miede et al.⁽⁹⁾, constataram adaptação e retorno das fibras ao seu padrão original, quanto ao peso e o tipo de fibra dos músculos mastigadores, tanto a nível macroscópico como microscópico, no final do experimento, mostrando capacidade de adaptação das mesmas. Essa capacidade adaptativa também verificada por⁽²²⁾, nas fibras do músculo Sóleo de ratos, que sofreram hipertrofia, após exercício físico.

A ultraestrutura das fibras musculares, em cortes transversais, no presente trabalho, se baseou na análise dos filamentos de proteína, constituintes das miofibrilas. Estas mostraram distribuição assimétrica e desorganização da linha Z e banda I, apenas no músculo PTM esquerdo do GII. Alterações ultraestruturais também foram observadas por Iyomasa et al.⁽⁷⁾,

que verificaram em cortes transversais do PTM do grupo controle, em gerbis pós exodontias de molares superiores, que a maior parte do citoplasma era composta de miofibrilas. Já no PTM ipsilateral do grupo experimental, encontraram baixa densidade de miofibrilas constituintes do citoplasma. Nenhuma alteração foi detectada a nível de Masseter.

Outros aspectos ultraestruturais foram observados^(7,15), os quais evidenciaram no PTM, mitocôndrias com distribuição irregular e concentradas junto ao subsarcolema e não entre as miofibrilas, como o habitual, após sessenta dias de exodontia. Também verificaram protrusão intraluminal das células endoteliais e numerosas vesículas pinocitóticas. Zhou et al.⁽³⁰⁾ na análise ultraestrutural do músculo Masseter de ratos, encontraram mudanças na quantidade e localização das mitocôndrias, estas localizavam-se em grande quantidade, tanto na região subsarcolemal como nas regiões entre as miofibrilas. Em nosso trabalho, esses componentes celulares analisados pelos autores acima não foram avaliados.

Nesse trabalho o músculo PTM mostrou-se mais sensível que o Masseter, à disfunção temporomandibular, especialmente quanto aos achados morfométricos.

Esse achado, provavelmente, está relacionado às suas características de biomecânica funcional própria, com maior dinâmica nos movimentos mastigadores comparadas às do Masseter⁽³⁷⁾.

A análise das fibras colágenas mostrou que os fascículos musculares analisados são revestidos por uma delicada rede de fibras colágenas do tipo I e do tipo III, com predomínio de fibras reticulares, nos Masseteres, nos diferentes períodos evolutivos. Exceto, no grupo I do Masseter esquerdo, um único animal mostrou aparente aumento dessas fibras colágenas (I e III), sem predomínio de qualquer um dos tipos, o que caracteriza um achado isolado, sem maior relevância^(32,34) descreveram os mesmos tipos de fibras colágenas do tecido muscular esquelético humano, sob coloração de Picro-Sirius,

à luz polarizada. Já, Vidal et al.⁽³³⁾, observaram a presença de fibras do tipo I e tipo III em tendões musculares de ratos.

É importante enfatizar, que durante o experimento, não houve aumento de fibras do tipo I, ou seja, este tipo de fibra colágena é aquele que classicamente prolifera nos processos de reparo. O que aponta a preservação da estrutura fibroconjuntiva dos envoltórios musculares, nessa indução de alteração oclusal, nos diferentes períodos evolutivos analisados.

Nenhum trabalho, na literatura avaliou as fibras colágenas dos músculos mastigadores, nessas condições. Mais trabalhos precisam ser realizados com o objetivo de entender a correlação entre as alterações das fibras colágenas dos músculos PTM e Masseter e as disfunções da ATM.



6- CONCLUSÃO

A disfunção temporomandibular, promovida pela exodontia unilateral de molares inferiores em ratos wistar, pode levar à alterações morfométricas ipsi e contralaterais, com redução de áreas de fibras, particularmente no PTM. Entretanto parecem se adaptar às novas condições ao longo do experimento.

A linha Z e banda I do citoesqueleto muscular são as mais sensíveis a essa disfunção, no músculo PTM, contudo efêmera, uma vez que foi observada apenas com 30 dias do experimento.

O músculo PTM mostrou-se mais vulnerável nesse modelo experimental, provavelmente pelas suas características funcionais próprias e maior participação na dinâmica dos movimentos mastigatórios, comparadas às do Masseter. Este parece ter uma reserva funcional maior.

As fibras colágenas do tipo I e do tipo III são os constituintes principais das estruturas fibroconjuntivas desses músculos, com predomínio do tipo III no Masseter, e parece não serem afetadas, a esse procedimento.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Dawson PE. Oclusão Funcional - Da ATM ao desenho do sorriso. São Paulo: Editora Santos. 2008;650p.
- 2- Yemm R. Comparison of the activity of left and right masseter muscles of normal individuals and patients with mandibular dysfunction during experimental. J Dent Res. 1971;50:1320-3.
- 3- Hoppeler H, Fluck M. Molecular basis of skeletal muscle plasticity - from gene to form and function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003;146:159-216.
- 4- Cao Y, Li K, Fu KY, Xie QF. Experimental occlusal interference induces the expression of protein gene products and substance P in masseter muscles of rats. Beijing Da Xue Xue Bao. 2010;42(1):50-5.
- 5- Eriksson PO, Thornel LE. Histochemical and morphological muscle-fibre characteristics of the human masseter, the medial pterygoid and the temporal muscles. Archs Oral Biology. 1983;28(9):781-95.
- 6- Iyomasa MM, Issa JPM, Oliveira F, Stuani MBS, Oliveira AM, Watanabe Is. Morphological and histological effects on the medial pterygoid muscle after unilateral exodontia in gerbils Micron. 2008;39:785-90.
- 7- Iyomasa MM, Issa JPM, Sosthines MCK, Oliveira AM, Stuani MBS, Motoyama AA, et al. Ultrastructural characteristics of the gerbil pterygoid medial muscle after experimental occlusal alteration. Micron. 2009;2:206-11.
- 8- Liu H, Jiang H, Wang Y. The biological effects of occlusal trauma on the stomatognathic system - a focus on animal studies. Journal of Oral Rehabilitation. 2012;40:130-8.
- 9- Miede B, Fanghänel J, Kubein-Meesenburg D, Nägerl H, Schwestka-Polly R. Masticatory musculature under altered occlusal relationships--a model study with experimental animals. Annals of anatomy - Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft. 1999;181(1):37-40.

- 10- Tsai CY, Lin YC, Su B, Yang LY, Chiu WC. Masseter muscle fibre changes following reduction of masticatory function. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012;41:394-9.
- 11- Sciote JJ, Horton MJ, Rowlerson AM, Ferri J, Close JM, Raoul G. Human masseter muscle fiber type properties, skeletal malocclusions, and muscle growth factor expression. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012;70(2):440-8.
- 12- Cvetko E, Karen P, Erzen I. Wearing of complete dentures reduces slow fibre and enhances hybrid fibre fraction in masseter muscle. *Journal of oral rehabilitation*. 2012;39(8):608-14.
- 13- Bakke M. Mandibular elevator muscles: physiology, action, and effect of dental occlusion. *Scand. J. Dent. Res*. 1993;101:314-31.
- 14- Benigno MIM, Azeredo RA, Lemos JLR, König Júnior B, Liberti EA. The structure of the bilaminar zone in the human temporomandibular joint: a light and scanning electron microscopy study in young and elderly subjects. *Journal Oral Rehabilitation*. 2001;28:113-9.
- 15- Bazan E, Issa JPM, Watanabe IS, Lacerda CAM, Del Bel EA, Iyomasa MM. Ultrastructural and biochemical changes of the medial pterygoid muscle induced by unilateral exodontia. *Micron*. 2008;39:536-43.
- 16- Bani D, Bani T, Bergamini M. Morphologic and Biochemical Changes of the Masseter Muscles Induced by Occlusal Wear: Studies in a Rat Model. *J Dent Res*. 1999;78(11):1735-44.
- 17- Santiwong P, Muramoto T, Soma Kunimichi, Takano Y. Growth-associated protein-43 immunohistochemical and ultrastructural changes in jaw muscle spindles of the rat following loss of occlusion Peerapong. *Archives of Oral Biology*. 2002;47:227-37.

- 18- Korfage JAM, Wang J, Lie SHJTJ, Langenbach GEJ. Intermuscular and intramuscular differences in myosin heavy chain composition of the human masticatory muscles. *Journal of the neurological sciences*. 2000;178:95-106.
- 19- Hong S, Park CG. Masseter muscle atrophy after ostectomy of the mandibular angle in rabbits. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;99(1):51-60.
- 20- Easton WJ, Carison D. Adaptation of the lateral pterygoid and superficial masseter muscles to mandibular protrusion in the rat. *J Orthod dentofac orthop*. 1990;97(2):149-58.
- 21- Nishide N, Baba S, Hori N, Nishikawa H. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. *Journal Oral Rehabilitation*. 2001;28(3):294-8.
- 22- Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Oliveira DAR, Oliveira Júnior AS, Dal Pai V, et al. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq. Ciências Saúde*. 2005;12(3):196-9.
- 23- Andreo JC, Oliveira JA, Navarro JAC, Roque DD, Roque JS, Buchain RL. Histoenzymology and Morphometry of the Masticatory Muscles of Tufted Capuchin Monkey (*Cebus apela* Linnaeus,1758). *Okagimas Folia Anat. Jpn*. 2002; 79(1):33-42.
- 24- Tanaka E, Sano R, Kawai N, Korfage JAM, Nakamura SI, Langenbach GEJ, et al. Regional differences in fiber characteristics in the rat temporalis muscle. *Journal of Anatomy*. 2008;213:743-8.
- 25- Vreeke M, Langerbach GEJ, Korfage JAM, Zentner A, Grünheid T. The masticatory system under varying functional load. Part 1: structural adaptation of rabbit jaw muscles to reduced. *European Journal of Orthodontics*. 2011; 33:359-64.

- 26- Osterlund C, Liu JX, Thornell LE, Eriksson PO. Intrafusal myosin heavy chain expression of human masseter and biceps muscles at young age shows fundamental similarities but also marked differences. *Histochem Cell Biol.* 2013;139:895-907.
- 27- Gendrange T, Luck O, Hesske G, Büttner C, Seibel P, Harzer W. Differential expression of myosin heavy-chain mRNA in muscles of mastication during functional advancement of the mandible in pigs. *Archives of oral biology.* 2001;46:215-20.
- 28- Nakamura S, Kawai N, Ohnuki Y, Saeki Y, Korfage JAM, Langenbach GEJ, Kitayama T, Watanabe M, Sano R, Tanne K, Tanaka E. Changes in activity and structure of jaw muscles in Parkinson's disease model rats. *Journal of oral rehabilitation.* 2013;40:205-13.
- 29- Grünheid T, Langenbach GEJ, Korfage JAM, Zentner A, Van Eijden TMGJ. The adaptative response of jaw muscles to varying functional demands. *European Journal of Orthodontics.* 2009;31:596-612.
- 30- Zhou D, Bai Y, Che X. Ultrastructural and proteomic alteration of superficial masseter muscle after lower jaw sagittal advancement in rat. *Archives of Oral Biology.* 2012;57:436-44.
- 31- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica.* 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013,345p.
- 32- Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of colagens type I, II and III by sirius red polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.* 1978;41:267-74.
- 33- Vidal BC, Mello ML, Pimentel ER. Polarization and microspectrophotometry of sirius red, picrosirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochemical Journal.* 1982;14:857-78.

- 34- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012;533p.
- 35- Di Fiore MSH. Atlas de histologia. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001;536p.
- 36- Marchesan IQ. Motricidade oral: visão clinica do trabalho fonoaudiológico integrado com outras especialidades. 2ed. São Paulo:Pancast,1999;21-28.
- 37- Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Anatomia orientada para a clinica. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007;1103P.
- 38- Satoh K, Iwaku F. Internal architecture, origin-insertion site, and mass of jaw muscles in old world hamsters. J. Morphol. 2004;260:101-16.
- 39- Seiryu M, Daimaruya T, Iikubo M, Watanabe K, Takano-Yakamoto T. Decreases of occlusal vertical dimension induce changes in masticatory muscle fiber composition. Orthodontic Waves. 2012;71:123-8.