



Yamba Carla Lara Pereira

**Efeitos do estresse crônico variado e da alteração
oclusal sobre o músculo masseter**

**Piracicaba
2014**



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

Yamba Carla Lara Pereira

**Efeitos do estresse crônico variado e da alteração
oclusal sobre o músculo masseter**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes
Coorientadora : Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iyomasa

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do Título de Doutora em Biologia Buco-Dental na Área de Histologia e Embriologia.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Yamba Carla Lara Pereira e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes.

Assinatura do Orientador

**Piracicaba
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello – CRB 8/6159

P414e Pereira, Yamba Carla Lara, 1981-
Efeito do estresse crônico variado e da alteração oclusal sobre
músculo masseter / Yamba Carla Lara Pereira. -- Piracicaba, SP:
[s.n.], 2014.

Orientador: Pedro Duarte Novaes.
Coorientador: Mamie Mizusaki Iyomasa
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Estresse. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3.
Imunoistoquímica. 4. Músculo masseter. I. Novaes, Pedro Duarte, 1960-
. II. Iyomasa, Mamie Mizusaki. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of varied chronic stress and occlusal alteration on the masseter muscle

Palavras-chave em inglês:

Stress

Microscopy, electron, transmission

Immunohistochemistry

Masseter muscle

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutora em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Pedro Duarte Novaes [Orientador]

Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva

Nádia Fayez Omar

Naiana Viana Viola Nícoli

Fernanda Klein Marcondes

Data de defesa: 14-04-2014

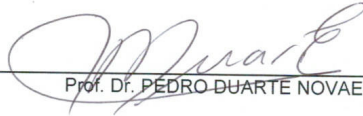
Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Abril de 2014, considerou a candidata YAMBA CARLA LARA PEREIRA aprovada.



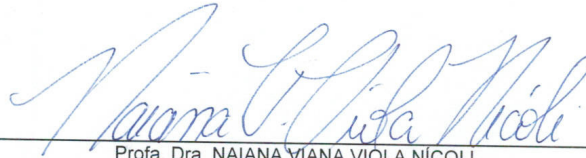
Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES



Prof. Dr. FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA



Profa. Dra. NÁDIA FAYEZ OMAR



Profa. Dra. NAIANA VIANA VIOLA NICOLI



Profa. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Resumo

O estresse e as perdas dentais têm impacto sobre os músculos da mastigação favorecendo a dor, no entanto, a patogênese envolvida ainda é pouco compreendida. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do estresse crônico variado em músculo masseter esquerdo de animais submetidos à alteração oclusal por exodontia unilateral, isolados ou associados, por meio de avaliação das atividades gelatinolíticas totais e da mieloperoxidase, análises morfológicas, imunoistoquímicas, histoquímicas e ultraestruturais ao Microscópio Eletrônico de Transmissão. Foram usados 20 ratos machos, *Wistar*, adultos jovens, pesando ± 200 g, divididos aleatoriamente em 04 (quatro) grupos: (n=5): GI controle, sem alteração oclusal e sem estresse crônico variado (EV), G II- alteração oclusal isolada, G III EV isolado e G IV- alteração oclusal associada ao EV. Nos grupos da exodontia (GII e G IV), animais previamente anestesiados, tiveram os molares superiores esquerdos extraídos. Os grupos dos estresses (G III e G IV) foram submetidos a diferentes estressores a partir do 14º dia após a exodontia. Todos os animais foram eutanasiados no 24º dia. No feixe superficial, a análise dos resultados revelou que o músculo masseter, a exodontia e o EV, isolados ou associados não promoveram a infiltração de polimorfonucleares analisados por meio da mieloperoxidase e não alteraram os níveis das metaloproteinasas (MMP-2) avaliados por meio da atividade de Gelatinase Total. No feixe anterior do músculo masseter profundo, a exodontia e o EV, isolados ou associados alteraram, em determinadas regiões, as características histológicas das fibras reveladas por coloração em hematoxilina e eosina; alteraram a ultraestrutura das mitocôndrias ao microscópio eletrônico de transmissão; revelaram regiões com lúmen reduzido, e outras com lúmen dilatado, em capilares marcados com anticorpo anti-laminina; revelaram uma tendência ao aumento da densidade de capilares imunomarcados por anti-alpha CD31 do endotélio, e não alteraram as escassas fibras imunomarcadas pela miosina do tipo I Neste mesmo feixe, diminuíram os níveis de espécies reativas de oxigênio no grupo exposto à exodontia (GII). No feixe médio posterior do músculo masseter profundo, os protocolos experimentais confirmaram a prevalência de fibras claras, por meio da reação histoquímica de succinato desidrogenase. Podemos concluir que o músculo masseter esquerdo manifestou alteração regional decorrente da exodontia e EV isolados ou associados, revelados por alterações morfológicas, ultraestruturais, hemodinâmicas e estresse oxidativo, em especial no feixe profundo anterior. Esses dados contribuem para a compreensão do desenvolvimento do ponto de gatilho. No entanto, novos estudos serão necessários para melhor entendimento da etiopatogenia da dor miofascial e da disfunção temporomandibular e sua relação com estresse e alteração oclusal.

Palavras-chave: alteração oclusal, estresse, imunoistoquímica, músculo masseter, histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão

Abstract

Stress and tooth loss have an impact on the masticatory muscles favoring the pain. However, the pathogenesis involved is still little understood. The aim of this study was to investigate the effect of varied chronic stress in left masseter muscle of rats subjected to unilateral alteration by occlusal tooth extraction, alone or associated, through evaluation of total gelatinolytic activities and myeloperoxidase, morphological analysis, histochemical, immunohistochemical labeling and transmission electron microscope. Twenty male Wistar rats, young adults, weighing ± 200 g, were divided randomly into four groups (n=5): G I control without occlusal alteration and without varied chronic stress (EV), G II-occlusal alteration isolated, G III EV isolated and G IV-occlusal alteration associated with the EV. The rats from groups of dental extraction (GII and G IV) were previously anesthetized and had the superior left molars extracted. The groups of stresses (G III and G IV) were submitted to different stressors from the 14th day after the tooth extraction. All the animals were euthanized on the 24th day. On the surface, the beam analysis of results showed that the masseter muscle, dental extraction and the EV, alone or associated with not promoted the infiltration of polymorphonuclear scanned through the myeloperoxidase and not altered levels of metalloproteinases (MMP-2) evaluated by means of Total Gelatinase activity. In the anterior bundle of masseter muscle located evaluated through the Total Gelatinase activity. In anterior bundle of the deep masseter muscle, the dental extraction and the EV, alone or associated with altered, in some regions, the histological characteristics of the fibers revealed by hematoxylin and eosin staining; the ultrastructure of mitochondria in the transmission electron microscope; revealed areas with reduced lumen, and lumen distended in other capillaries marked with anti-laminina antibody; showed a tendency to increase in the density of capillaries labelled by endothelium, CD31 anti-alpha and have not altered the scarce labelled fibers by myosin type I in the same bundle, decreased levels of reactive oxygen species in the group exposed to dental extraction (GII). The average bundle of deep masseter muscle later, experimental protocols confirmed the prevalence of clear fibers by means of Immunohistochemistry reaction of succinate dehydrogenase. We can conclude that the masseter muscle change resulting from regional expressed left dental extraction and EV alone or associated, revealed by morphological, ultrastructural, and hemodynamic oxidative stress, especially in deep beam. These data contribute to the understanding of the development of the trigger point. However, further studies are needed to better understanding of the pathogenesis of myofascial pain and temporomandibular joint dysfunction and its relation with occlusal stress and occlusal alteration.

Key words: occlusal alteration, stress, immunohistochemistry, masseter muscle, Histochemistry, transmission electron microscopy.

Sumário

Dedicatória.....	xv
Agradecimentos	xvii
1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	5
2.1 Dor miofascial e Desordens Temporomandibulares (DTM)	5
2.2 Estresse.....	6
2.3 Músculos da mastigação.....	7
2.4 Alteração oclusal (AO).....	8
2.5 Mieloperoxidase (MPO).....	10
2.6 Gelatinase Total (GT).....	11
2.7 Hematoxilina e Eosina (HE).....	13
2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	14
2.9 Imunoistoquímica (IHC).....	14
2.9.1 <i>Lamininas</i>	16
2.9.2 <i>Alpha CD 31- PECAM</i>	17
2.9.3 <i>Miosina (MyHC)</i>	17
2.10 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	18
2.11 Succinato desidrogenase (SDH).....	19
3 Proposição	21
4 Material e Métodos.....	23
4.1 Experimento.....	23
4.1.1 <i>Amostra/ Grupos experimentais:</i>	23
4.1.2 <i>Indução da alteração oclusal em animais:</i>	24
4.1.3 <i>Protocolo estresse variado</i>	25
4.1.4 <i>Delineamento experimental</i>	25
4.2. Técnica para dosar Mieloperoxidase - MPO.....	27
4.3 Técnica para atividade Gelatinolítica Total - GT.....	27
4.4 Hematoxilina e Eosina (HE) e Imunoistoquímica (IHC).....	34

4.4.1	<i>Obtenção de amostras para técnicas de hematoxilina e eosina (HE) e imunoistoquímica (IHC) anti- Miosina tipo I:</i>	34
4.4.2	<i>Técnica para imunoistoquímica em corte congelado- IHC para Alpha CD 31 e Laminina</i>	36
4.5	Técnicas para Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET	36
4.6	Técnica histoquímica para Espécies Reativas de Oxigênio – ROS	37
4.7	Técnica histoquímica para Succinato Desidrogenase - SDH	38
4.8	Análise Estatística	39
5	Resultados	41
5.1	Quantificação de polimorfonucleares por Mieloperoxidase – MPO	41
5.2	Expressão de metaloproteinases por Gelatinase Total - GT	42
5.3	Hematoxilina e Eosina - HE	45
5.3.1	<i>Análise qualitativa ao microscópio de luz</i>	45
5.3.2	<i>Análise quantitativa</i>	47
5.4	Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET	49
5.5	Imunoistoquímica - IHC	51
5.5.1	<i>Resultados Laminina</i>	51
5.5.2	<i>Resultados Alpha CD31- PECAM</i>	53
5.5.3	<i>Resultados para Miosina - MyHC</i>	56
5.6	Resultados para Espécies Reativas de Oxigênio - ROS	57
5.7	Resultados para atividade oxidativa das fibras por Succinato desidrogenase - SDH	60
6	Discussão	65
7	Conclusão	73
	Referências	75
	Anexo	89

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”
São Francisco de Assis

Dedicatória

“Sou como você me vê. Posso ser leve como uma brisa ou forte como uma ventania, depende de quando e como você me vê passar.”

Clarice Lispector

Deus, poucas são as palavras para agradecer todas as oportunidades que foram designadas por Ti a mim, neste caminho. Obrigada por iluminar minhas escolhas, cobrir de paciência aqueles que caminharam comigo e pelo privilégio de viver este momento.

Aos meus pais *Edmilson Lopes Pereira e Célia Imaculada Lara Pereira*, pelo seu imenso amor. Obrigada por serem meus apoiadores em todas as minhas decisões, mesmo que em silêncio. Também sou grata por sacrificarem suas vidas a mim e ao meu irmão. Palavras de agradecimento tornam-se insuficientes.

Ao meu irmão *Mark Augusto Lara Pereira*, permita-me agradecer por trazer à minha convivência meus três sobrinhos: Mark Filho, Mariana e Manoela. São, sem sombra de dúvidas, meus grandes motivadores e as principais razões para esta conquista.

Ao meu marido, *Ulisses Vilela Hipólito*, por todo o apoio e pela presença constante em cada fase dessa trajetória. Com seu exemplo, carinho, companheirismo e paciência, tudo isso foi possível. Você completa minha vida!

Agradecimentos

"Pode ser que um dia não mais existamos... Mas se formos amigos, nasceremos de novo, um para o outro."

Albert Einstein

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, obrigada pela oportunidade e pela confiança. Ter acreditado em mim desde o começo permitiu que eu convivesse com o grande ser humano que o senhor é. Tenho muito orgulho de fazer parte da sua equipe.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa**, por ter permitido que eu utilizasse seu laboratório, por ter dividido comigo este projeto e, por tantas vezes, ter me amparado e reconhecido minhas necessidades e limitações. Muito obrigada.

Agradeço **aos que compõem esta banca**, pela disponibilidade.

Aos professores que compuseram a banca de Qualificação: **Maria Bernadete Sasso Stuani, Juliana dos Santos Neves e Sérgio Roberto Peres Line**, meus sinceros agradecimentos às considerações sugeridas e ao apoio prestado até aqui.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo fomento durante a execução deste projeto.

Aos **professores, funcionários e colegas de pós-graduação**, pela boa convivência. Em especial à Ana, por sua imensa colaboração.

À técnica e “nossa mãe”, **Eliene Narvaes**, meus sinceros agradecimentos e a certeza, descrita aqui, de uma admiração imensa. Vou lembrar, por toda a minha vida, de

cada palavra, de cada abraço, de cada sorriso, e até de cada meia que você me emprestou nos frios de Piracicaba! Muito obrigada!

À amiga **Nádia Fayez Omar**, por todos os ensinamentos e todo o respeito dispensados a mim durante nossa convivência. Saiba que sua voz doce, suas boas palavras e minha admiração compuseram nossa amizade.

À amiga **Naiana Viana Viola Nícoli**, meu carinho e a certeza de que sempre estarei aqui, firme e forte, para acompanhá-la. Obrigada por ter me dado abrigo durante meu período em Piracicaba e por ter confiado em mim. Tenho em você um exemplo!

À amiga **Juliana dos Santos Neves**, pela sua doçura e atenção. Muito obrigada.

À amiga **Juliana Pires Lance Francisco**, registro minha admiração e meus votos de que sua convivência na FOP seja tão maravilhosa quanto a minha.

As boas amigas formadas à beira do Rio Piracicaba incluem meu carinho por: **Liza, Silvana, Cidinha, Ivani, Suzete, Adriano, Cristiano, Luciana e Danielle**. Obrigada pelo apoio e incentivo em vários momentos desta minha jornada “Fopiana”.

Aos amigos **Rodrigo Alberto Restrepo Fernandez e Daniela Mizusaki Iyomasa**, do Laboratório de Ciências Morfológicas (LCM) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- FORP, da Universidade de São Paulo- USP agradeço por terem compreendido minhas ausências quando precisei ir à Piracicaba, tolerado minhas cobranças e por terem permitido que nosso grupo fosse coeso. Vocês são grandes pessoas. Muito obrigada pela convivência.

Aos demais componentes do **LCM**, Nilce, Fernando Dias, Kelly Galisteu, Ricardo, Bruno, Bruna Melo, Júnia, João Paulo, meus sinceros agradecimentos pela cordialidade e amigável convivência.

Às amigas do *Laboratório de Neurofisiologia da Dor* da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- FORP da Universidade de São Paulo- USP, meu carinho e agradecimento, especialmente à Profa. Dra. Christie, à Glauce Crivelaro, Patrícia Basile, Amanha Desiderá, Bruna e Priscila. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos de todas as horas *Raphael Freitas de Souza, Carolina Chaves, Cássio Nascimento e Fabíola Mishima*, muito obrigada pelo carinho de sempre

1 Introdução

A literatura destaca que o estresse e a ansiedade tem potencial impacto sobre os músculos da mastigação, favorecendo a dor miofascial (Vedolin *et al.*, 2009), que é um sintoma comum, associado às desordens temporomandibulares (DTM) (Shiau and Chen, 1986) Estudos têm revelado que o estado emocional pode afetar a função oral, tanto em animais (Antonova, 2008), quanto em seres humanos (Carvalho *et al.*, 2008), bem como favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e interferir no processo da Síndrome Metabólica (Bove *et al.*, 2010). Segundo Schweinhardt *et al.*, 2008. O estresse precoce, prolongado ou grave, afeta os circuitos cerebrais moduladores da dor, sugerindo, por exemplo, que a fibromialgia, não seja um distúrbio primário do sistema nervoso central (Schweinhardt *et al.*, 2008). Além disso, estressores relacionados às guerras e conflitos armados (Uhac *et al.*, 2003), e outros suaves como a realização de exercícios de aritmética mental e soluções de anagramas simples, podem aumentar a atividade da musculatura mastigatória e estar associado às disfunções temporomandibulares (DTM) (Rao and Glaros, 1979).

Apesar de evidências clínicas revelarem que o estresse mental induz alterações fisiológicas e hemodinâmicas dos músculos da mastigação (Hidaka, O. *et al.*, 2004), e de que o estresse psicológico e o ambiente social promovem ativação desta musculatura em pacientes com sintomatologia dolorosa (Schmidt and Carlson, 2009), ainda é pouco estudado como os músculos da mastigação respondem ao estresse.

Algumas desordens funcionais acometem o Sistema Estomatognático, dentre elas a sensibilidade dolorosa à palpação nos músculos da mastigação e o desconforto da musculatura ao despertar (Carvalho *et al.*, 2008). A síndrome de dor miofascial é caracterizada pela dor difusa nos músculos associada à presença dos pontos gatilho (Haddad *et al.*, 2012).

Estes pontos são clinicamente descritos como áreas hiperirritáveis no músculo esquelético, associados a um nódulo palpável hipersensível (Simons Dg, 1999).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse dos pesquisadores em entender os mecanismos de ponto gatilho presentes na musculatura, bem como correlacionar a

existência dessas alterações às desordens temporomandibulares (Alonso-Blanco *et al.*, 2012). A dor local avaliada nos músculos temporal, masseter, elevador da escápula, esternocleidomastóideo, suboccipital e escaleno, foi correlacionada à pontos gatilho ativos (Fernández-Pérez *et al.*, 2012). Entre os tratamentos disponíveis em Odontologia relacionados à síndrome de dor miofascial a literatura cita as terapias com spray e o estiramento como as mais confiáveis, embora também sejam usadas, mesmo que menos frequentemente, a injeção de anestésico (Tecco *et al.*, 2012). O número de pontos gatilho ativos aos músculos faciais foi relacionado à maior intensidade da dor no pescoço, ao aumento no número de dias em que o paciente relatou hipersensibilidade à dor, à uma maior pressão sobre a coluna cervical além do comprometimento na amplitude do movimento cervical (Alonso-Blanco *et al.*, 2012).

As interferências oclusais também são correlacionadas com a dor em músculo da mastigação e despertam interesse, por parte dos pesquisadores, devido à controvérsia com relação ao seu fator etiológico. Com esse propósito os músculos da mastigação têm sido analisados em diversas condições como: aumento (Kawasaki *et al.*, 1997), ou diminuição da dimensão vertical, ou a exodontia unilateral (Maeda *et al.*, 1990) (Bazan *et al.*, 2008); (Iyomasa *et al.*, 2008); após o desgaste oclusal unilateral (Bani *et al.*, 1999), ou após colocação de um *splint* oclusal unilateral (Muller *et al.*, 2000). Estudos recentes, aplicados à clínica, descreveram haver uma redução de pedidos/ solicitação de tratamento para sintomas da dor após a realização de terapias oclusais, em pacientes com desordens temporomandibulares (DTM) (Kirveskari and Jämsä, 2009). Há relatos que a dor miofascial em músculo mastigatório analisado por ressonância magnética e por tomografia computadorizada, não apresentou associação com variações encefálicas (Imauchi *et al.*, 2002).

O decréscimo das funções musculares pode ser relacionado ao aumento do dimorfismo craniofacial e da maloclusão, em humanos (Abed *et al.*, 2007). A função mastigatória parece ser a chave determinante para o crescimento crânio facial que modula os diferentes componentes musculares. Apesar dessas evidências clínicas, correlacionando a dor do músculo da mastigação com o estresse ou a alteração oclusal, os mecanismos fisiopatológicos são pouco compreendidos (Abed *et al.*, 2007).

Várias metodologias podem ser usadas para a análise dos músculos submetidos às alterações funcionais, tais como: histoenzimologia (Maxwell *et al.*, 1981; Mieke *et al.*, 1999) e análise microscópica (Abe *et al.*, 1998; Nishida *et al.*, 1999). O efeito agudo das espécies reativas de oxigênio (ROS), por exemplo, sobre a função muscular está mediado por alterações na sensibilidade ao Ca^{2+} miofibrilar e pode contribuir para o desenvolvimento de fadiga muscular (Lamb and Westerblad, 2010), mas o mecanismo de ação da ROS permanece desconhecido (Luin *et al.*, 2010) e dados sobre sua atividade em músculos da mastigação são escassos na literatura. Da mesma forma, são escassos, os estudos que tratam das alterações morfológicas em músculos da mastigação, induzidas pela alteração oclusal e associadas ao estresse emocional. Portanto, nosso propósito é avaliar o efeito da alteração oclusal por exodontia e do estresse crônico variado sobre as características do músculo masseter, superficial e profundo, em ratos.

2 Revisão da Literatura

2.1 Dor miofascial e Desordens Temporomandibulares (DTM)

A dor nos músculos da mastigação é o principal sintoma relatado nas desordens temporomandibulares (DTM). Fatores como trauma, discrepância oclusal, estresse, parafunções, hipermobilidade, idade e hereditariedade também estão associados a essa desordem seguida de dor, mas ainda há controvérsias quanto à sua etiologia (Oral *et al.*, 2009).

A etiologia das desordens temporomandibulares é um ponto controverso, e pode ser reportado como multifatorial (Badel *et al.*, 2012). Assim como a etiologia, a patofisiologia das desordens temporomandibulares não é completamente conhecida. Embora diversos fatores de risco possam ser sugeridos, particularmente os vinculados aos parâmetros oclusais, estudos apontam a associação entre as disfunções temporomandibulares e os músculos mastigatórios (Michelotti and Iodice, 2010), assim como afirmam que o sistema estomatognático sofre alterações durante o processo de envelhecimento do indivíduo, submetidos ou não a diferentes tipos de estressores (Cuccia and Caradonna, 2009).

Recentemente, os sintomas da disfunção temporomandibular e a condição psicológica foram examinados em pacientes adultos com mordida profunda, submetidos a tratamento ortodôntico. Este grupo experimental foi comparado, de acordo com idade e gênero, a um grupo controle de pacientes com oclusão normal (Sonnesen and Svensson, 2008). Este grupo de pesquisadores indicou que pacientes com mordida profunda tem mais sensibilidade dolorosa frente a injeções de glutamato em mandíbula (músculo masseter) e braço, levando, inclusive, a importantes distúrbios somáticos e sensoriais (Sonnesen and Svensson, 2011).

Em pacientes , uma dor inexplicável irradiada a partir de um ponto de disparo muscular, às vezes distante do próprio ponto de disparo, foi identificada e submetida a tratamento. Há uma variação na metodologia de diagnóstico desses pontos-gatilho assim

como uma carência de teorias que ajudem a explicar como eles surgem e por que eles produzem padrões específicos de dor referida (Simons Dg, 1999).

A compressão de um ponto gatilho favorece um aumento da sensibilidade local, a uma dor referida ou mesmo, a resposta de contração no local (Mcpartland, 2004). O diagnóstico e a terapia do ponto disparador tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. Profissionais de saúde, tais como treinadores, terapeutas ocupacionais, fisioterapeutas, acupunturistas, massoterapeutas e integradores estruturais também estão cientes da existência desses pontos musculares sensíveis e fazem uso de terapêuticas para os pontos de gatilho em seu trabalho clínico (Alvarez and Rockwell, 2002). A remodelação morfológica acontece a partir de cada célula, coordenada por um conjunto de mediadores, deste modo, o estudo das funções, assim como das para- funções do sistema estomatognático, permite que tenhamos mais dados sobre o assunto, favorecendo a melhora na avaliação e na terapêutica.

2.2 Estresse

A exposição a longos períodos de estresse ou mesmo depressão causam um aumento de corticosterona, em modelo animal (Chen and Su, 2013). Este é um hormônio da classe dos glicocorticóides liberado pelo córtex das adrenais de animais (Livingstone *et al.*, 2000). Em humanos, os equivalentes a este hormônio é o cortisol.

Estes glicocorticóides estão relacionados às respostas ao estresse, além da regulação do metabolismo lipídico, proteico e glicídico, implicando em uma menor atividade de ramos do sistema imunológico de ratos, levando à diminuição da vigilância imunológica a tumores e ao câncer (Mei and Li, 2013). Essa regulação hormonal está vinculada ao eixo hipotálamo-hipófise chegando às adrenais. São os núcleos paraventriculares do hipotálamo os responsáveis pela liberação do CRH (hormônio liberador de corticotropina), que segue para a adenohipófise, onde será liberado o ACTH (hormônio adenocorticotrópico), que age, por sua vez, no córtex adrenal, estimulando a zona fasciculada a liberar corticosterona (Dalwadi and Uht, 2013).

Em relação ao metabolismo lipídico, a relação entre o estresse e a obesidade, vem acompanhada do exemplo clássico da Síndrome de *Cushing*. Nesta síndrome, os níveis de cortisol estão elevados e são associados à obesidade fenotípica. Nesses pacientes, o alto índice de cortisol liberado está associado com elevados índices de adipócitos viscerais (Duclos *et al.*, 2001). Como o músculo esquelético representa 40% da massa corporal, os seus mecanismos celulares relacionados à termogênese muscular, sua função mitocondrial bem como os índices de cálcio cíclico aparecem alterados em resposta à obesidade (Lee *et al.*, 2013).

Estudos prévios realizados em outros músculos mastigatórios têm utilizado metodologias de estresse físico ou psicológico, as quais reproduzem os eventos fisiológicos que ocorrem nos humanos durante situações estressoras. Nestes modelos foram usados estressores descritos há duas décadas por (Murua Vs, 1992) e, posteriormente, por (Gomez *et al.*, 1998) e outros autores (Willner, 2005; Chen *et al.*, 2010). Deste modo, escolhemos o estresse crônico variado visando reproduzir eventos cotidianos vivenciados pela população, em que são expostos a essa diversidade de situações estressoras.

2.3 Músculos da mastigação

Os músculos esqueléticos são bastante heterogêneos, composto por unidades motoras, e podem diferir em relação ao tamanho, ao tipo de inervação e às demais propriedades motoras (Ciciliot *et al.*, 2013). Há três tipos de fibras musculares esqueléticas: tipo 1 - lentas, tipo 2a - rápidas fadigáveis, e tipo 2b – rápidas, pouco resistentes à fadiga. Estas fibras diferem também de acordo com o metabolismo glicolítico/ oxidativo. As fibras tipo 1 e 2a são mais oxidativas e as 2b são tidas como glicolíticas (Smerdu *et al.*, 1994).

A composição das diferentes tipos de fibras determinam as propriedades funcionais, a velocidade de contração e resistência à fadiga de cada músculo (Linnane *et al.*, 1999). Uma fibra muscular pode contrair até um terço do seu comprimento, durante o tempo de 1 a 2 milissegundos, após isto, ocorre um total relaxamento, até que esta se prepare para uma nova contração (Basmajian *et al.*, 1985).

A mastigação é considerada a função mais importante do sistema estomatognático, sendo a fase inicial do processo digestivo, que começa na boca e recebe o auxílio dos músculos mastigatórios para a execução dessa função (Kossioni and Dontas, 2007). O Masseter é um músculo mastigatório, com grande espessura, em formato retangular, composto por duas partes ou feixes: ântero-lateral ou superficial, e póstero-medial ou profundo. É um tipo de músculo esquelético, vinculado à mastigação, que possui um neurônio motor, localizado no núcleo motor do nervo trigêmeo, que é responsável por inervar centenas de fibras (Manktelow *et al.*, 2006).

A relação entre a função do músculo masseter e a ocorrência de má oclusão foi analisada em amostras de músculo de indivíduos que foram submetidos às osteotomias mandibulares. O tamanho e a proporção de fibras do tipo II (rápidas) diminuíram à medida que houve o aumento da altura facial, além disso, pacientes com assimetria mandibular tiveram mais fibras do tipo II do lado do seu desvio (Sciote *et al.*, 2013).

O foco primário deste estudo foi avaliar as características do músculo esquelético masseter esquerdo, relacionados à mastigação, frente à alteração oclusal por exodontia dos molares superiores esquerdos, diante das diferentes situações de estresse crônico variado.

2.4 Alteração oclusal (AO)

A maloclusão pode influenciar no desempenho dos músculos mastigatórios, gerando excesso de trabalho e fadiga (Pereira *et al.*, 2009). A relação entre a maloclusão e os aspectos morfofuncionais do sistema mastigatório ainda não é completamente conhecido (Bani *et al.*, 1999). A alteração oclusal causada por exodontias unilaterais, abrasão oclusal ou inserção de *splint* unilateral tem demonstrado a adaptação do músculo masseter, em modelos experimentais animais (Bazan *et al.*, 2008).

A dor crônica orofacial aumenta com a atividade muscular (Bani and Bergamini, 2001). Em pacientes com atrofia de músculo mastigatório, devido ao hábito funcional unilateral, há relatos de queixas como: dor de cabeça, dor facial e otalgia ipsilateral (Imauchi *et al.*, 2002).

A disfunção temporomandibular consta na literatura como associada à dor crônica nos músculos da mastigação. A relação entre a oclusão imprópria e a dor muscular foi estudada por Cao e colaboradores, em ratos. Estes autores elevaram a superfície mastigatória de dentes molares dos ratos e creditaram a esta interferência oclusal o aumento da resposta dolorosa em experimentos de comportamento (Cao *et al.*, 2009). A etiologia das disfunções temporomandibulares inclui: traumas oclusais, hábitos para funcionais, estresse, fatores psicológicos, sistêmicos e hereditários e infecções. Entretanto, a oclusão é amplamente citada como potencial fator etiológico (Lisboa *et al.*, 2010).

A dor mastigatória está diretamente relacionada à interferência oclusal e acrescenta o papel da sensibilização de mecanismos centrais favorecendo essa hiperalgesia (Cao *et al.*, 2009). Estudos anteriores afirmam que a interferência oclusal em animais pode resultar em remodelação do côndilo mandibular (Gazit *et al.*, 1987), mudanças patológicas nos músculos da mastigação, na polpa dental e no periodonto (Kvinnsland e Heyeraas, 1992). A oclusão é uma importante variável no tratamento restaurador, definida como uma relação estática entre as superfícies mastigatórias dos dentes maxilares e mandibulares análogos (Cao *et al.*, 2009) Sinais clínicos de dor mastigatória são frequentemente reportados, depois de mudanças oclusais (Hagag, Yoshida e Miura, 2000).

Durante a fadiga muscular, ocorre o aumento substancial do fosfato inorgânico, que entra no retículo sarcoplasmático e combinado com o cálcio, gera um precipitado insolúvel: o fosfato de cálcio, que diminui o desempenho muscular (Fryer *et al.*, 1995). O maior tipo de fadiga é a metabólica, causada diretamente ou indiretamente pelo acúmulo de metabólitos como o fosfato inorgânico, a adenosina difosfato, íons magnésio e espécies reativas de oxigênio (Allen and Westerblad, 2001). Por isso, novos métodos de avaliar tecidos em nível molecular têm sido utilizados para diagnóstico em amostras biológicas (Lisboa *et al.*, 2010).

Lisboa *et al* 2010 estudaram os níveis de cálcio em músculos masseter de ratos, após a alteração oclusal e o uso da fototerapia à laser. Utilizaram três grupos experimentais, e avaliaram os resultados através da espectroscopia após 14 e 30 dias da alteração oclusal. Concluíram não haver alteração na morfologia das fibras do músculo nestes períodos

experimentais, embora tenha havido alteração nos níveis de fosfato de cálcio, menos presente quando aplicada a luz do laser (Lisboa *et al.*, 2010).

Os músculos esqueléticos mudam contratilidade em resposta aos mecanismos de estimulação crônica, implicando em mudanças fenotípicas que criam uma nova condição mastigatória (Ohnuki *et al.*, 2009). Em humanos, o aumento da oclusão vertical leva a espasmos musculares, acompanhados de dor e de disfunção do sistema estomatognático. Ohnuki *et al.* 2009, estudaram o efeito do aumento da dimensão vertical na composição dos tipos de fibras dos músculos onde a duração da atividade diária foi relacionada ao tipo de cadeia pesada de miosina dos músculos masseter e digástrico. Afirmaram que, a miosina do músculo digástrico consiste em uma mistura, rápidas e lentas, enquanto que no músculo masseter estão presentes miosinas do tipo rápidas (Ohnuki *et al.*, 2009).

A dor é reconhecidamente o sinal e sintoma das alterações temporomandibulares, reduzindo a mobilidade da mandíbula (Sonnesen and Svensson, 2008). A oclusão humana e de ratos tem intrínseca relação anatômica, mas comportamentos diferentes, o que torna importante o cuidado com a extrapolação de estudo em ratos para humanos (Lisboa *et al.*, 2010).

Neste trabalho utilizamos a alteração oclusal por exodontia dos molares superiores. Seguem revisões acerca das metodologias propostas.

2.5 Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) surgiu como um promissor marcador molecular, já que sua atividade em organismos vivos pode prever várias doenças, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Shazeeb *et al.*, 2012). A atividade da mieloperoxidase pode também ser monitorada nos tecidos durante as fases iniciais e de progressão de doenças, como a aterosclerose e a encefalite autoimune (Chen *et al.*, 2008).

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, e tem papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Existem evidências que alguns produtos gerados a partir de reações catalisadas por MPO tenham papel na sinalização celular. O acúmulo de leucócitos é

observado quando em presença do exercício muscular excêntrico, causando injúria e inflamação (Paulsen *et al.*, 2013).

Shazeeb *et al.* 2012 estudaram a síntese e a caracterização da MPO como um sensor que antecipa alterações termodinâmicas. Usaram um precursor natural da serotonina (HTrp), que compartilha de espécies reativas de oxigênio (ROS) capaz de formar um composto paramagnético, a hidroxindolamida (DTPA), baseado em diâmido-substrato, possível de ser visualizado, e verificaram que seus aumentos, estavam associados à alterações patológicas (Shazeeb *et al.*, 2012).

Nesta mesma perspectiva, Gottfried *et al.* 2008, isolaram isoformas de CD68, um marcador para as enzimas lisossomais e mieloperoxidase, em cultura de fibroblastos e em células endoteliais de pele e veia umbilical. Evidenciaram que quando em presença deste marcador, há um fechamento dos capilares no tecido correspondente (Gottfried *et al.*, 2008).

Consideráveis evidências suportam a hipótese de que a presença altos níveis da enzima mieloperoxidase são um importante fator de risco para múltiplas doenças inflamatórias (Davies, 2011). Esta enzima está também correlacionada a outras patologias em humanos, como artrite, fibrose cística e dano renal (Davies *et al.*, 2008). A MPO catalisa a reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com íons haleto, como Cl^- , Br^- , I^- e SCN^- formando ácidos hipoclorosos, que são potentes oxidantes (Van Dalen *et al.*, 1997). Estes oxidantes, derivados de MPO, desempenham um papel bactericida importante em patógenos invasores (Weiss and Lobuglio, 1982).

Assim, foi objetivo de nosso trabalho conhecer os níveis da enzima mieloperoxidase em músculo masseter superficial, submetidos aos protocolos de estresse crônico variado e alteração oclusal por exodontia unilateral.

2.6 Gelatinase Total (GT)

As metaloproteinases (MMP) compõem uma extensa família de enzimas proteolíticas, que atuam na dependência do zinco e são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC). Essa manifestação enzimática acontece tanto em processos

normais quanto em manifestações patológicas dos vários tecidos do corpo humano (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). As MMPs são produzidas por vários tipos celulares, incluindo os fibroblastos, as células musculares lisas, os miócitos e as células endoteliais (Dollery *et al.*, 1999). As alterações na atividade das MMPs podem interferir no equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC, promovendo mudanças na morfologia e nas propriedades mecânicas do tecido (Panchenko *et al.*, 1996).

São descritas na literatura mais de 25 tipos de MMPs e estas são divididas em quatro grupos. As collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), as estromalinas (MMP-3, MMP-7, MMP10, MMP-11 e MMP12), todas secretadas no espaço extracelular como pró-enzimas. Uma vez ativadas, as MMPs são reguladas por inibidores teciduais endógenos denominados inibidores de metaloproteinases (TIMP) (Zhang *et al.*, 2005). As TIMPs são frequentemente produzidas pelas mesmas células que liberam MMPs (Maccacini *et al.*, 2009). Atualmente, são conhecidos quatro TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), que são capazes de inibir a função das MMPs, pela formação de um complexo na proporção de 1:1 (Souza-Tarla *et al.*, 2005). Cada MMP tem a capacidade de quebrar um tipo específico de matriz extracelular (MEC).

As collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) estão envolvidas nos primeiros passos da degradação do colágeno, agindo pelo desarranjo da hélice natural da rede de colágeno fibrilar. As gelatinases, MMP-2 e MMP-9, atuam quebrando substratos, incluindo a gelatina, elastina, proteoglicanos, colágeno e fragmentos de colágenos (Sabeih *et al.*, 2004). O balanço entre TIMP e MMP é importante no remodelamento de tecidos, normais e alterados, sendo que nos normais as MMP são expressas em níveis muito baixos (Disatian *et al.*, 2008).

As metaloproteinases estão associadas, por exemplo, aos episódios de invasão do câncer. Autores afirmam que o alto número de enzimas do tipo degradadoras de matriz extracelular, fazem com que as plaquetas envolvam as células neoplásicas, impedindo que estas sejam reconhecidas pelo sistema imunológico do paciente, facilitando a aderência deste “trombo neoplásico” ao endotélio, disseminando a doença (Davidson *et al.*, 1999).

Partindo do pressuposto que o remodelamento de tecidos, normais e alterados, é feito em presença de MMP (Disatian *et al.*, 2008), foi objetivo deste trabalho conhecer os

níveis de MMP-2 em músculo masseter superficial, submetidos aos diferentes protocolos experimentais propostos.

2.7 Hematoxilina e Eosina (HE)

O tecido muscular estriado é formado por fibras musculares cilíndricas, finas e que podem medir vários centímetros de comprimento. Os miócitos são as células do músculo e apresentam sua morfologia alongada. Encontram-se presas aos ossos pelos tendões. Suas fibras apresentam estrias transversais com contração rápida e voluntária, com comando consciente (Boncompagni, 2012).

A quantidade de células musculares está relacionada à genética, aos fatores ambientais e nutricionais, associados à sinalização, as características estruturais e à produção de energia. Assim, o número de mitocôndrias é muito grande, uma vez que necessita gerar grande quantidade de energia (ATP) para poder executar sua função de contração (Sawosz *et al.*, 2013).

A literatura sugere que a interferência oclusal resulta em disfunções dos músculos mastigatórios (Nishide *et al.*, 2001b). As interferências oclusais estão relacionadas com os sinais e sintomas dos músculos mastigatórios que são a dor e a fadiga (Christensen and Rassouli, 1995). Nishide *et al* 2001 estudaram as alterações histológicas de músculo masseter de ratos, com aumento unilateral da oclusão, onde os molares dos animais receberam *splints* e após 4 semanas, o músculo masseter profundo, na sua porção anterior, foi removido e submetido à reação de SDH (succinato desidrogenase), HE (hematoxilina e eosina) e ATPase miofibrilar. Os resultados afirmam que a interferência oclusal gerou alterações morfológicas significativas, como o aumento do espaço entre os tecidos, aparecimento de células inflamatórias e núcleos centrais, características que diminuiram os níveis de energia do masseter durante, por exemplo, a mastigação (Nishide *et al.*, 2001a).

Fisher *et al* 2013, demonstraram que nos casos de alterações patológicas das fibras musculares, há a prevalência de moléculas específicas, como a iNOS, que são marcadores de estresse celular relevantes em pacientes com miopatias, associados à degeneração. Os dados sugerem que uma resposta de estresse celular pró-inflamatória associado ao aumento

da expressão de α B-CRYGS e iNOS no músculo, em situações extremas, precede a degeneração muscular com acúmulo de β -amilóide (Fischer *et al.*, 2013), que são peptídeos precursores das proteínas (Lahiri and Maloney, 2010).

Fato que nos levou a conhecer a morfologia das fibras musculares esqueléticas, frente aos diferentes protocolos experimentais propostos.

2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão permite analisar diferentes campos científicos. A mitocôndria é a organela responsável pela respiração celular, e este processo ocorre na presença de um conjunto de enzimas e coenzimas, dentre estas a desidrogenase succínica que é definida como uma flavoenzima exclusivamente mitocondrial (Grivennikova *et al.*, 2010). Análises ultraestruturais mostram que a alteração oclusal, induzida por desgaste unilateral das cúspides de molares, altera a morfologia das mitocôndrias no músculo masseter (Bani and Bergamini, 2002); assim como a exodontia unilateral aumentou a área de secção transversal das mitocôndrias (Iyomasa *et al.*, 2009), indicando aumento da atividade enzimática mitocondrial (Sato *et al.*, 1998).

As imagens obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) são possíveis graças a um feixe de elétrons, emitidos em direção à amostra ultrafina. Esses elétrons são transmitidos através da amostra, o que forma uma imagem que é ampliada e detectada por um sensor com uma câmera. Um microscópio eletrônico de transmissão é capaz de exibir imagens com uma resolução maior, em comparação aos microscópios óticos, devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons (Tumolva *et al.*, 2012).

Deste modo, utilizamos a MET neste estudo, visando avaliar as condições ultraestruturais das mitocôndrias e das cisternas do retículo sarcoplasmático dos músculos nos diferentes grupos experimentais.

2.9 Imunoistoquímica (IHC)

A imunoistoquímica é definida como um conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos, presentes em células

ou tecidos (Coons and Kaplan, 1950). Os antígenos representam constituintes celulares normais como, por exemplo, uma glicoproteína de membrana como a laminina, ou um elemento estranho à célula como, por exemplo, um vírus (Gold and Freedman, 1965). Embora métodos quantitativos possam ser aplicados em preparações imunoistoquímicas, para se determinar o número de elementos presentes ou a intensidade da reação, seu objetivo fundamental é o encontro e localização de antígenos nos tecidos ou células (Thal *et al.*, 1995). A imunoistoquímica é uma técnica com características qualitativas (Saxena *et al.*, 2011), por isso o produto da reação deve sempre ser interpretado conjuntamente aos achados morfológicos (Huppertz *et al.*, 1999).

Em músculo, a técnica de imunoistoquímica aparece na literatura em estudos da década de 40. Em 1956, o grau de proteinúria, que é a perda excessiva de proteínas pela urina, foi estudado, em seis crianças com Síndrome Nefrótica, por Gitlin e cols. O precipitado destes pacientes foi inserido em coelhos para avaliação da relação antígeno-anticorpo, formados a partir da amostra humana (Gitlin *et al.*, 1956).

McCormick e cols, em 2007, utilizaram placentas de mulheres grávidas, para testes de imunoistoquímica por técnica de fluorescência, onde determinaram a existência de vários tipos de imunoglobulinas, como a IgG, IgA, IgM e IgD (McCormick *et al.*, 2007). Basearam-se no estudo clássico de imunofluorescência de Coons e Kaplan, datado de 1950, no qual localizaram os antígenos pretendidos no tecido, por meio de técnica de imunofluorescência.

Estudos estão descritos na literatura, desde então, com objetivos muito diversos, fazendo uso da reação de imunoistoquímica. Desde o uso da mesma para avaliar os tipos de Alzheimer (Serot *et al.*, 1992), ou na descoberta de sinalizadores, que inibem o câncer de próstata (Sanchez *et al.*, 2004). Outros trabalhos detalharam o papel das reações de imunoistoquímica em casos de avaliação da evolução da Doença de Chagas, em camundongos. Neste caso, os animais foram infectados com *Trypanosoma cruzi*, permitindo avaliar o grau de comprometimento das miosinas, nos diversos tipos e graus de contaminação pelo protozoário (Leon *et al.*, 2001).

Em 1989, um estudo apontou o uso da técnica de imunoistoquímica para avaliar a presença e o desenvolvimento da elastina, que é a maior proteína do sistema de fibras

elásticas, em pulmões e em aorta de ratos, submetidos a tratamentos preliminares diversos. Os resultados apontaram a presença da elastina em diferentes superfícies, como a pele, em cartilagens e órgãos. Estes estudos permitiram sinalizar as vias de desenvolvimento da elastina na pele (Farquharson and Robins, 1989).

Seguindo esta técnica de marcação de antígenos, Yin e cols, em 2003, estudaram a ação da laminina nos neurônios centrais. Seus resultados apontaram que as lamininas do tipo beta e gama são expressas no hipocampo neuronal (Yin *et al.*, 2003).

Assim, foi objetivo deste trabalho avaliar qualitativamente e quantitativamente as proteínas Laminina e Alpha CD31 no endotélio vascular e da Miosina tipo I, frente aos diferentes protocolos experimentais.

2.9.1 Lamininas

As lamininas são uma família de glicoproteínas que constituem o arcabouço estrutural em tecidos do organismo. Elas são secretadas e incorporadas às células da matriz extracelular. São glicoproteínas importantes e biologicamente ativas da lâmina basal, agem influenciando a diferenciação celular, a migração, a adesão, bem como o fenótipo e a sobrevivência (Timpl *et al.*, 1979). As lamininas formam redes independentes e estão associados com colágeno tipo IV, através de redes como as de fibronectina e os perlecan (Ockleford, Bright, *et al.*, 1993; Ockleford, Malak, *et al.*, 1993). Através destas interações, as lamininas contribuem para a ligação celular e para a diferenciação, influenciando na forma da célula e no seu movimento. Atuam, deste modo, na manutenção do fenótipo de tecido e na sobrevivência do mesmo (Colognato and Yurchenco, 2000). Algumas destas funções biológicas da laminina têm sido associadas com frações específicas de aminoácidos. Por exemplo, o peptídeo sequência [GTFALRGDNGDNGQ], que está localizado na cadeia alfa da laminina, promove a adesão de células endoteliais (Beck *et al.*, 1990).

A propriedade funcional do fornecimento de sangue através de capilares pode ser alterada por variações no padrão de sucção para a mastigação durante o desenvolvimento dos sistemas vasculares, no músculo masseter (Sato *et al.*, 2008), assim analisamos a

imunomarcção da Laminina em fibras musculares e endotélio vascular de músculo masseter esquerdo de animais expostos aos diferentes protocolos experimentais.

2.9.2 Alpha CD 31- PECAM

Hidaka e colaboradores, em 2004, afirmaram que a vasodilatação e a vasoconstrição são fundamentos fisiológicos no ajuste do metabolismo dos tecidos, e que distúrbios no volume de sangue intramuscular contribuem para dor (Hidaka, O *et al.*, 2004). Essas mudanças hemodinâmicas afetam o Sistema Nervoso Simpático (SNS) que alteram, por sua vez, a fisiologia do músculo (Maekawa *et al.*, 1999). Desta forma, surgiu a necessidade de estudar a molécula alpha CD31, também denominada molécula de adesão de plaquetas e de células endoteliais (PECAM), conhecida como aglomerado de diferenciação 31 (CD31). É uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene PECAM1, encontrado no cromossomo 17 (Newman *et al.*, 1990).

O PECAM (CD31) é um importante marcador das células endoteliais vasculares e células linfáticas. Baseado nisso, Sato e cols, em 2008, estudaram a distribuição de CD31 em 15 ratos *Wistar* machos, na idade pós-natal (3,5 e 7 dias). Amostras congeladas de músculo masseter foram seccionadas coronalmente, e submetidos à técnica de imunistoquímica por fluorescência com dupla marcação (CD31 e LYVE1). Os resultados apontaram uma rede vascular capilar com elevada densidade, entre os diferentes grupos experimentais (Sato *et al.*, 2008).

Como os capilares constituem uma vasta superfície de trocas de O₂, substratos e metabólitos entre o sangue e órgãos e participam na contração do músculo esquelético (Poole *et al.*, 2013), estudamos a imunomarcção da proteína CD31, nos diferentes protocolos experimentais propostos.

2.9.3 Miosina (*MyHC*)

A terceira classe de proteínas a ser estudada neste trabalho foi a miosina. Sua forma microscópica lembra um taco de golfe (Hayashida *et al.*, 1991). A miosina é uma proteína, que se movimenta ao longo da actina, em presença de ATP, sendo ambas responsáveis pela contração muscular (Rhee and Hoh, 2008). Estas proteínas são as principais componentes

dos miofilamentos que, por sua vez, constituem o "esqueleto" das células musculares (Jacobelli *et al.*, 2004).

A miosina é considerada uma enzima do tipo mecanoquímica, ou seja, capaz de converter a energia química em mecânica, e por isso é também chamada de proteína motora (Deng *et al.*, 1999). Estudos de sequência de DNA mostram mais de 10 classes de genes para miosina. Entretanto, três são os mais conhecidos: miosina I, miosina II, e miosina V. A estrutura molecular de todas mostra um sítio de ligação com ATP e com a actina (Stedman *et al.*, 2004).

A fim de investigar o efeito de uma redução da carga mastigatória sobre o masseter superficial, o temporal superficial e o músculo digástrico de coelhos Vreeke e colaboradores, em 2011, estudaram a composição de miosina (MyHC) e a área transversal de fibras correspondente. Analisaram os animais que tinham sido submetidos a uma dieta macia de 8 a 20 semanas e dos controles de uma dieta normal. A proporção e a área de seção transversal de fibras expressando co MyHC-I foram significativamente menores nos músculos masseter dos animais que tinham sido alimentados comida macia, que aqueles dos controles (Vreeke *et al.*, 2011).

Foi propósito, deste trabalho, marcar, por meio de reação imunoistoquímica para fibras musculares tipo I - lentas, as fibras musculares de masseter esquerdo, na presença do estresse crônico variado e da alteração oclusal por exodontia unilateral, isolados ou associados.

2.10 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas em presença de O₂ por mitocôndrias, células fagocitárias, peroxissomos e citocromo P450 em condições fisiológicas, e podem apresentar-se com uma dupla função no organismo humano (Wojcik *et al.*, 2010). Tanto elas participam das cascatas de transdução de sinal celular, levando a ativação de alguns fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão dos genes relevantes para o crescimento e diferenciação celular (Melo *et al.*, 2011), quanto elas causam dano oxidativo ao DNA celular, proteínas e lipídios, resultando no início ou no

desenvolvimento, de numerosas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, *Diabetes mellitus* tipo 2, catarata, artrite reumatóide ou doenças neuro-degenerativas diferentes (Milaeva, 2011).

A ativação muscular repetida aumenta os radicais livres de oxigênio e afeta a função contrátil (Reid, 2008). Neste sentido, a exposição de músculos intactos, à água oxigenada (H₂O₂) permite a variação na sensibilidade de Ca²⁺, o que afeta a função das miofibrilas, (Allen *et al.*, 2008). Esse mecanismo pode agir nos genes das células. Assim, Allen *et al.* 2008 buscaram avaliar quais fatores poderiam corroborar na adaptação do músculo esquelético, frente aos diferentes agentes externos. Os estresses abióticos, ou seja, aqueles que podem influenciar nos seres vivos, tais como seca, por exemplo, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas (Jubany-Marí *et al.*, 2010). Um aumento nos níveis de ROS pode provocar uma oxidação parcial ou severa dos componentes celulares, induzindo alteração nas células, e no metabolismo, o que é decisivo em condições de estresse. Este estado pode ser indicativo da participação do estresse oxidativo nos mecanismos celulares, pelos quais o organismo responde aos agentes estressores (Wojcik *et al.*, 2010).

Os compostos endógenos como a glutathione, ubiquinol, urato, bilirrubina assim como enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase são ditas antioxidantes, e estão envolvidas na desintoxicação de ROS (Afanas'ev, 2011). Além disso, numerosos componentes dietéticos como vitamina C, a vitamina E, os carotenóides e os polifenóis, têm sido associados ao sistema de defesa antioxidante (Mcginley *et al.*, 2009).

Como as espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes para a função do músculo nas condições fisiológicas e patológicas (Reid, 2008) avaliamos a manifestação destas em músculo masseter profundo, expostos aos diferentes protocolos experimentais.

2.11 Succinato desidrogenase (SDH)

A etiologia das desordens temporomandibulares é multifatorial. A maloclusão pode afetar os músculos da mastigação causando fadiga. O maior tipo de fadiga é a metabólica, causada pelo aumento de metabólitos, como os fosfatos inorgânicos (Lisboa *et al.*, 2010).

As alterações nos músculos mastigatórios foram descritos por Akagawa et al 1983, onde após aumento do dimensão vertical de oclusão em ratos, foi possível perceber uma sequência de reações teciduais: inflamação aguda, destruição de miofibrilas e pouca regeneração das células musculares (Akagawa *et al.*, 1983). As alterações oclusais induzidas pela instalação de *splints*, para elevar a dimensão de oclusão, reduzem os níveis de energia durante os movimentos mastigatórios e são considerados como resultado do metabolismo oxidativo (Nishide, 1997).

Larsson et al 1991 afirma que há diferentes tipos de fibras e que estas têm sido associadas às propriedades fisiológicas motoras do músculo, variando quanto ao tipo de contração: lenta (I), rápidas resistentes à fadiga (IIa) e rápidas não resistentes à fadiga (IIb) e manifestam-se com diferentes colorações após a reação histoquímica para succinato desidrogenase (SDH) (Dias *et al.*, 2012). O tipo IIb é o tipo de fibra menos recrutado, mais rápido e mais fatigantes (Larsson *et al.*, 1991).

As fibras dos músculos mandibulares, como o masseter e o digástrico, são conhecidas pela sua adaptação aos fenótipos, diante de diferentes demandas funcionais (Arai *et al.*, 2005). Assim, a adaptação do músculo masseter esquerdo, de ratos submetidos ao estresse crônico variado e à alteração oclusal por exodontia unilateral, isolados ou associados, tornou-se objeto deste estudo.

3 Proposição

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do estresse crônico variado e da alteração oclusal por exodontia em músculo masseter esquerdo, de ratos.

O feixe superficial do músculo masseter esquerdo foi:

- Fracionado ao meio no sentido ântero-posterior, congelado em gelo seco e triturado para: extrair e dosar:
 - ✓ MPO – Mieloperoxidase
 - ✓ Avaliar a atividade Gelatinolítica Total (GT);

As características do feixe profundo anterior foram analisadas:

- Após coloração, por Hematoxilina e Eosina (HE).
- Ultraestruturalmente ao Microscópio Eletrônico de Transmissão
- Imunoistoquimicamente:
 - ✓ Com o anticorpo anti Laminina e α -CD31 do endotélio capilar;
 - ✓ Com o anticorpo anti- cadeia pesada da miosina (MyHC);
- Histoquimicamente para Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)
- Histoquimicamente para Succinato desidrogenase (SDH) visando demonstrar a capacidade metabólica da fibra e sua resistência à fadiga.

4 Material e Métodos

4.1 Experimento

4.1.1. Amostra/ Grupos experimentais:

Para este estudo foram utilizados 20 ratos machos *Wistar*, pesando aproximadamente 200 g, distribuídos aleatoriamente em 04 grupos (Tabela 01):

Tabela 01: Grupos experimentais dispostos de acordo com o tratamento experimental proposto.

<i>Grupos Experimentais (n=20)</i>	
<i>G I – Controle (n=5)</i>	<i>Animais sem alteração oclusal e sem estresse crônico variado</i>
<i>G II – Alteração Oclusal (AO) (n=5)</i>	<i>Animais com alteração oclusal e sem estresse crônico variado</i>
<i>G III – Estresse Variado (EV) (n=5)</i>	<i>Animais sem alteração oclusal e com estresse crônico variado</i>
<i>G IV – AO + EV (n=5)</i>	<i>Animais com alteração oclusal e com estresse crônico variado</i>

Os animais foram procedentes do biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Campus Ribeirão Preto, mantidos em temperatura ambiente, controlada entre 22 à 24°C e com timer programado para 12 horas de iluminação diários. Os animais receberam ração e água filtrada "*ad libitum*". Protocolo CEUA 11.1.130.53.5.(anexo).

4.1.2 Indução da alteração oclusal em animais:

Inicialmente (Figura01-Dia 0) os animais do grupo experimental com alteração oclusal (GII e GIV), foram submetidos à anestesia Xilazina (10mg/kg) e Cetamina (70mg/kg), intraperitonealmente. Após assepsia e antisepsia do local cirúrgico com *PVPI – Iodo Polvidini*, os animais foram submetidos à exodontia de todos os molares superiores esquerdos, com o auxílio de uma *Pinça anatômica infantil* e de um *Holleback 3S*, previamente esterilizados e banhados com *Polivinilpirrolidona iodo* (PVPI). Como medida profilática, os animais receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico veterinário pequeno porte - "*Fort Dodge*") na dosagem 24000 UI por Kg de peso corporal, e uma dose de anti-inflamatório-analgésico (Diclofenaco sódico - "*Voltaren*") na dose de 0,004ml/100g peso corpóreo. Os animais sem alteração oclusal (GI e GIII) foram submetidos ao mesmo tipo de estresse operatório para exodontia, ou seja: anestesia, uma dose única de antibiótico (Pentabiótico veterinário pequeno porte - "*Fort Dodge*") na dosagem 24000 UI das penicilinas por Kg de peso corporal, e uma dose de antiinflamatório-analgésico (Diclofenaco sódico - "*Voltaren*") na dose de 0,004ml/100g peso corpóreo; e posição cirúrgica em decúbito dorsal com boca aberta e mandíbula tracionada, porém, sem a exodontia propriamente dita.

Parâmetros avaliados: indução da alteração oclusal por exodontia

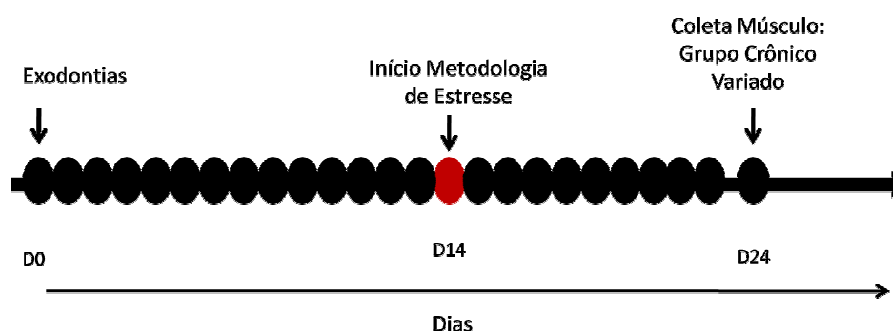


Figura 01: Tempo em dias e intervenções realizadas.

4.1.3 Protocolo estresse variado

O estresse crônico variado foi realizado no laboratório de Fisiologia, supervisionado pela Prof^ª. Dr^ª. Christie Ramos Andrade Leite Panissi. Os ratos foram submetidos ao protocolo a partir do 14^º. dia (Figura 01: Dia 14) após o tempo zero, com ou sem exodontia (Figura 01: D0)). O estresse crônico variado (G III e GIV) foi realizado durante tempo total de 10 dias, sem interrupção, com estressores diferentes em cada dia, adaptado de (Murua Vs, 1992; Gamaro *et al.*, 2003). As situações estressoras foram as seguintes:

Dia 01 e Dia 06: Caixa de agitação: Esse sistema está associado a um agitador orbicular onde os animais foram colocados individualmente em uma caixa sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos.

Dia 02 e Dia 07: Frio- Os animais foram colocados em refrigerador a uma temperatura de 4^º. C por 10 minutos.

Dia 03 e Dia 08: Nado Forçado: foi realizado em um tanque circular em acrílico transparente com 50 cm de altura e 35 cm de diâmetro, preenchido com água até uma altura de 22 cm, evitando o contato do animal com o chão ou com a borda superior quando este permanece em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo deste procedimento foi de 15 minutos.

Dia 04 e Dia 09: Restrição Forçada: foi realizada utilizando estrutura metálica, de 15 cm de comprimento e 05 cm de diâmetro onde os animais (n=10) foram colocados neste aparato, que possui ventilação adequada ao longo do seu comprimento, e as suas extremidades fechadas, ficando em situação de restrição física, já que não foi permitido seu movimento

Dia 05 e Dia 10: Privação de Água: foi removido o bebedouro por 24 horas. Das 9 horas do dia anterior até às 9 horas da manhã do dia seguinte.

4.1.4 Delineamento experimental

Os animais, com e sem alteração oclusal, submetidos ou não ao estresse crônico variado e seu respectivo controle, foram pesados, anestesiados, tiveram o fragmento de músculo removido e então foram submetidos à eutanásia por decapitação. O músculo masseter esquerdo foi fragmentado em partes: superficial (superior e inferior) e profundo (anterior, médio e posterior) (Figura 2).

- a) O feixe superficial dividido ao meio no sentido ântero-posterior, foi congelado em gelo seco e posteriormente, triturado no *polytron*, para extrair e dosar mieloperoxidase (MPO), que é diretamente proporcional ao número de polimorfonucleares (PMNs) e dosar a Atividade Gelatinolítica Total;
- b) O fragmento anterior do feixe profundo foi congelado em nitrogênio líquido, fazendo uso de rolhas e talco inerte para as técnicas de imunistoquímica anti-laminina e anti alpha CD31 e ROS;
- c) Em outros animais, submetidos ao mesmo tratamento experimental, o fragmento anterior do feixe profundo foi coletado em Paraformaldeído 4%, para as técnicas de hematoxilina-eosina, imunistoquímica anti-miosina, realizados em corte obtidos de amostras incluídas em parafina.
- d) O fragmento médio-posterior do feixe profundo foi congelado fazendo uso de rolhas, nitrogênio líquido e talco inerte para a técnica histoquímica de SDH.
- e) O feixe anterior/médio anterior foi destinado para MET, onde o fragmento foi imerso em fixador de Karnovsky, preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2.

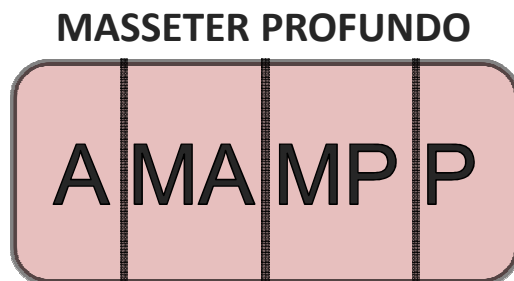


Figura 02: Ilustração da divisão do músculo masseter profundo. **A** = Anterior (HE, IHP Laminina, IHP Alpha CD31, Miosina e ROS), **MA** = média anterior (mais para anterior) para MET, **MP**= porção média posterior (SDH) e **P**= posterior (não foi utilizado).

4.2. Técnica para dosar Mieloperoxidase - MPO

O feixe superficial do músculo masseter foi coletado, cortado ao meio no sentido ântero - posterior, e a porção superior armazenado em criotubo e congelado em gelo seco para a técnica de MPO. A amostra foi triturada no *polytron*, visando extrair e dosar mieloperoxidase (MPO), que é diretamente proporcional ao número de polimorfonucleares (PMNs) presentes no tecido. A quantidade de MPO, em cada amostra de músculo triturado, foi medida enzimaticamente pela suspensão do material em 2.0ml de Hixadeciltrimetilamônio e 0,5% brometo (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo USA) em 50mM de tampão de fosfato de potássio, pH 5.4 para solubilizar MPO (Brandley and Schnaar, 1985). Depois disso, a MPO foi avaliada espectrofotometricamente pela adição de 1.6mM de tetrametil benzidina (Sigma Chemical Co) diluído em δ -dianisidina dicloridrato (Sigma Chemical Co) e 0.5mM peróxido de hidrogênio em placas Costar de 96 poços (Corning Inc., New York, NY, USA). A leitura colorimétrica foi realizada em um comprimento de onda de 450nm após a adição de 4M H₂SO₄, e as placas foram lidas usando micro placas leitoras μ Quanttm (Bio-Tek instruments Inc, Winooski, VT, USA). Uma curva padrão foi gerada usando Polimorfonucleares (PMNs). Os PMNs foram isolados a partir do sangue, pelo gradiente-densidade da centrifugação (Bozeman *et al.*, 1990) e suspensos para 1×10^6 células/ ml em PBS.

Parâmetros avaliados: número de polimorfonucleares (PMNs) presentes no tecido.

4.3 Técnica para atividade Gelatinolítica Total - GT

O músculo masseter superficial inferior, de cada grupo, foi coletado, acomodado em gelo seco e, armazenado em freezer -80° C. O músculo foi então triturado com auxílio de tampão de extração de proteína (Tris-CaCl₂ contendo Phenatrolina e PMSF a 5 mM) e adicionado na proporção de 100 ul para cada 0,1g de tecido em seguida 60 ug de proteína desse extrato e misturado com tampão não redutor, e levado ao gel de corrida. O gel de corrida utilizado foi preparado no próprio laboratório contendo poliacrilamida a 12% e gelatina a 0,1% (detalhes da confecção estão na forma de filme), no site da FORP, no link Videoteca, www.forp.usp.br. O gel de corrida consiste em uma eletroforese em um sistema

SDS/PAGE, o qual inclui um substrato da enzima (gelatina) aplicada no gel de separação, permitindo assim a observação e a quantificação da atividade das metaloproteínas (Gerlach *et al.*, 2005) (Souza-Tarla *et al.*, 2005). O padrão de comparação (soro fetal bovino) foi aplicado na primeira canaleta, no intuito de possibilitar comparações entre os animais. Na separação de proteínas pelo sistema SDS-PAGE, cada molécula de proteína se ligou a um grande número de moléculas do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, superando a carga intrínseca da proteína, migrando em direção ao eletrodo positivo, quando a voltagem foi aplicada. As proteínas, do mesmo tamanho, migraram, através do gel, com velocidades similares, pois sua estrutura nativa foi completamente desdobrada pelo SDS. Após a corrida, o gel (zimograma) foi submetido a dois banhos de solução renaturante de Triton X-100 a 2% e, incubados em tampão Tris-CaCl₂ por 18 horas a temperatura de 37° C. Em seguida o gel foi corado com Comassie Blue G-250 (Figura 3 A) e descorado com uma solução de metanol e ácido acético (Figura 3 B).

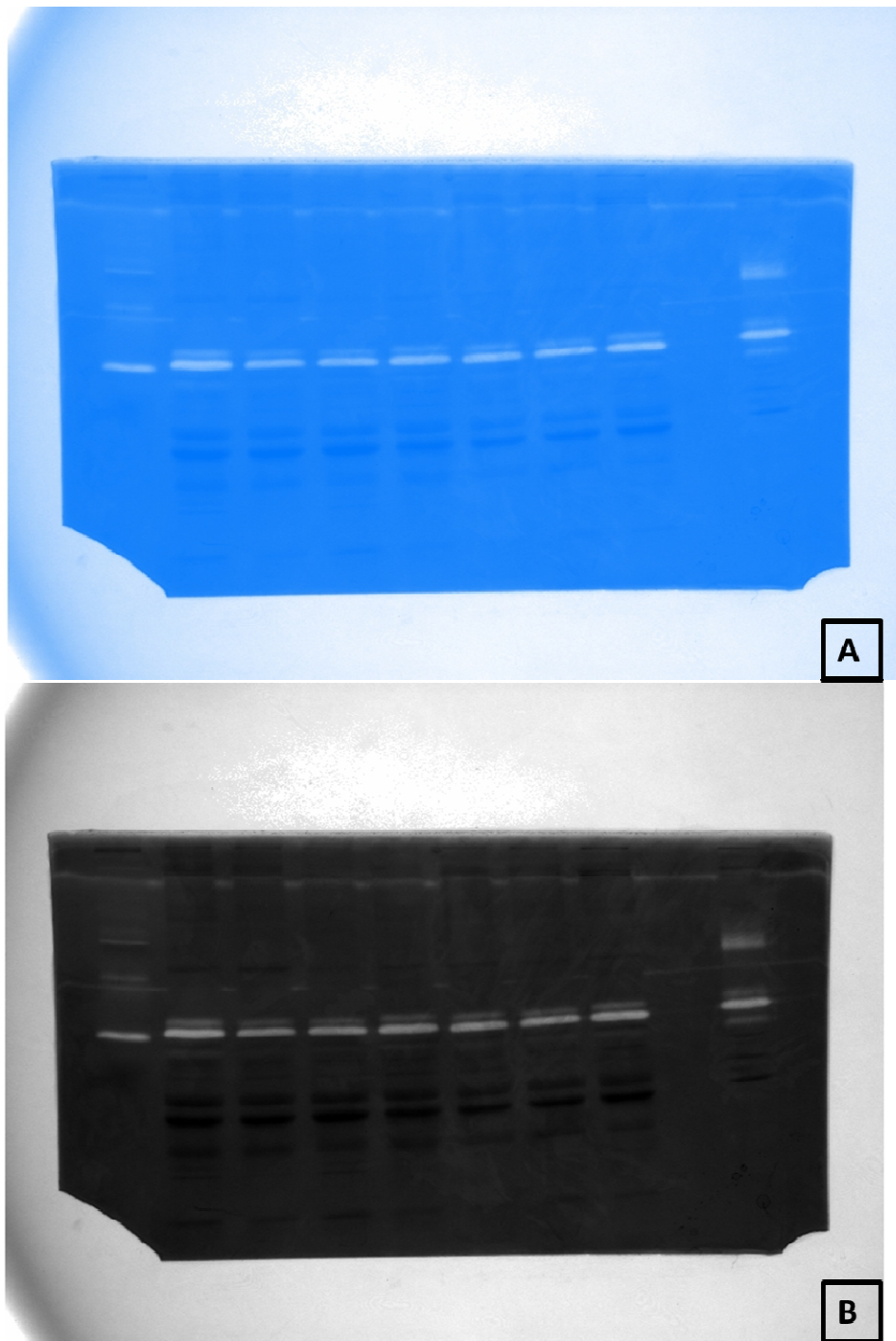


Figura 03: Fotografias de géis de poliacrilamida com as amostras de músculo masseter de ratos, submetidos ao protocolo de Gelatinase Total, **A-** gel corado em Coomassie Blue **B-** a fotografia do gel obtida em software Kodak EDAS290.

A atividade gelatinolítica foi detectada como bandas descoradas sobre o fundo de gelatina corada com Comassie Blue (Figura 3- A). A avaliação da atividade enzimática foi feita através do software Kodak EDAS290 (Figura 4- B) e quantificadas através do software GeneTools (Figuras 4,5 e 6).

Parâmetros avaliados: atividade gelatinolítica em músculo masseter superficial inferior.

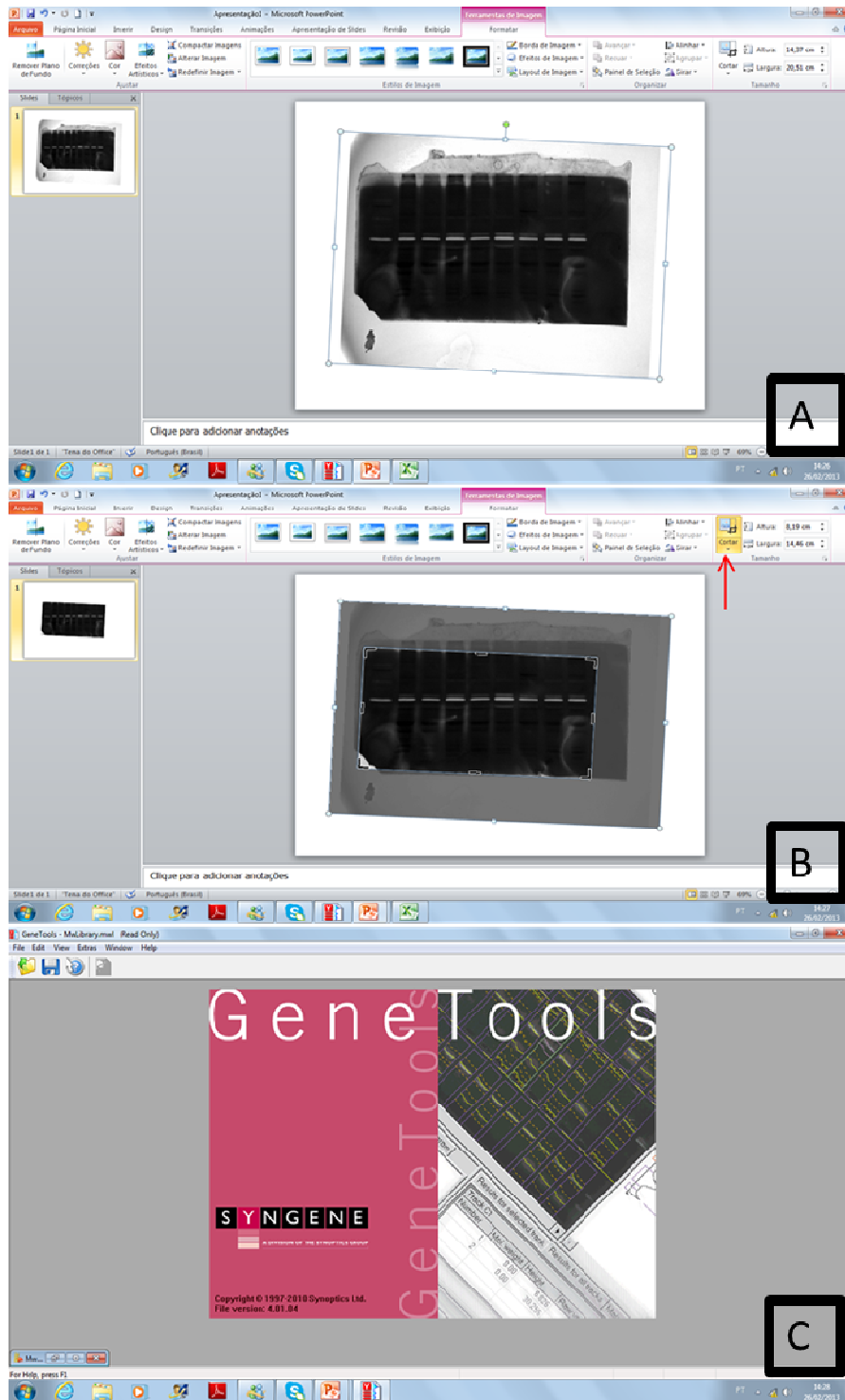


Figura 04: Sequência esquemática do uso do software GeneTools para quantificação das bandas dos diferentes grupos experimentais propostos. **A-** a imagem fotografada do gel aberta em Power Point, **B-** imagem cortada/editada de modo a ficar restrita a área de gel e **C-** Tela inicial do programa Gene Tools.

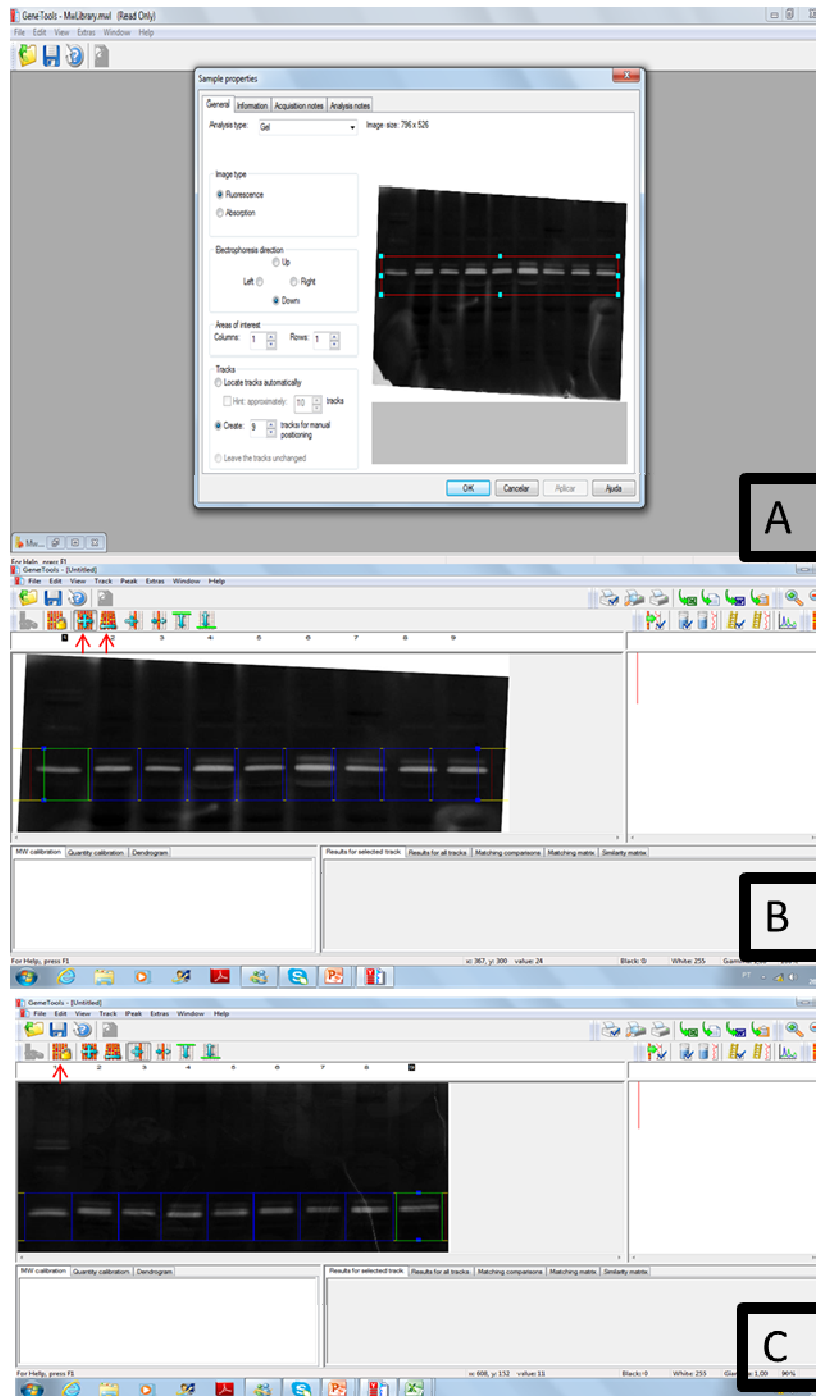


Figura 05: Sequência esquemática do uso do software GeneTools para quantificação das bandas dos diferentes grupos experimentais propostos. **A-** área de bandas a serem quantificadas no programa é selecionada, **B-** Seleciona e alinha a primeira banda (padrão) e **C-** Selecionada e alinhada a última banda do gel.

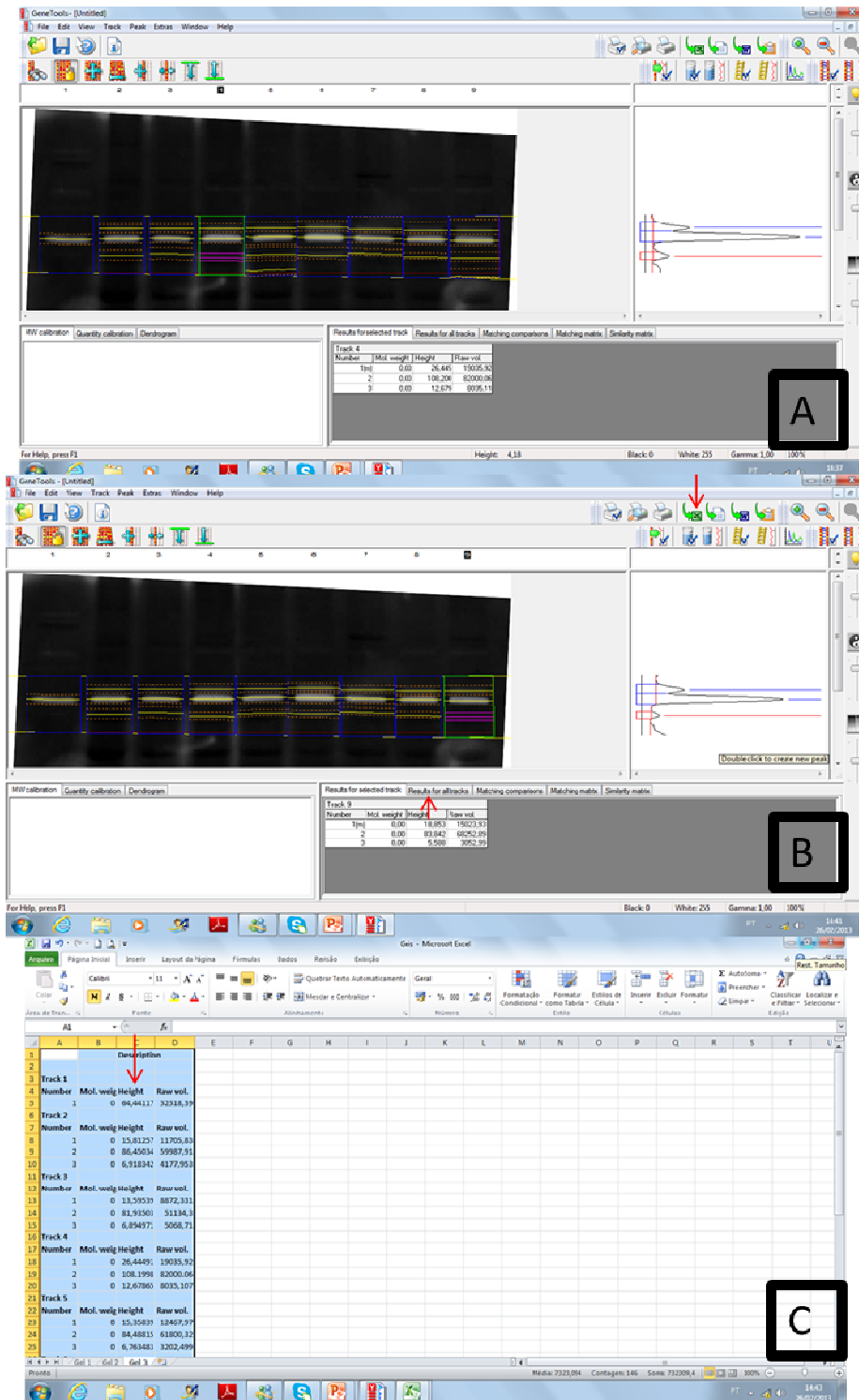


Figura 06: Sequência esquemática do uso do software GeneTools para quantificação das bandas dos diferentes grupos experimentais propostos. **A-** alinhada a quarta banda, **B-** Alinhada a última banda e **C-** resultado oferecido pelo programa banda a banda.

4.4 Hematoxilina e Eosina (HE) e Imunoistoquímica (IHC)

4.4.1 Obtenção de amostras para técnicas de hematoxilina e eosina (HE) e imunoistoquímica (IHC) anti- Miosina tipo I:

O fragmento anterior do feixe profundo do músculo masseter foi coletado e, rapidamente, imerso em Paraformaldeído 4%, e submetido ao protocolo de rotina para inclusão das peças em parafina. As peças foram cortadas em 5µm de espessura e coletados em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma Aldrich, USA), dois a quatro cortes por lâmina.

Técnica de Hematoxilina e Eosina - HE

As lâminas foram processadas de acordo com a técnica histológica de rotina para cortes em parafina, coradas por imersão em hematoxilina e eosina, seguido pela passagem em álcool 95% rapidamente; álcool absoluto I por 3 minutos; álcool absoluto II por 3 minutos; álcool absoluto III por 3 minutos; xilol I por 3 minutos; xilol II por 3 minutos; xilol III por 3 minutos e montadas com Entellan.

As lâminas coradas em HE foram analisadas em microscopia de luz, para avaliação qualitativa e quantitativa da morfologia geral do músculo em situações de estresse crônico variado e alteração oclusal por exodontia unilateral, em relação ao controle. Foram obtidas 03 imagens (Mandarim-De-Lacerda, 2003) de cada animal em aumento de 200x para quantificação em fotomicroscópio Olympus BX61 Essa análise permitiu verificar se as fibras musculares e o tecido conjuntivo de sustentação se alteram nas diferentes condições experimentais.

Parâmetros avaliados: morfologia do tecido, corado em HE.

Técnica para imunoistoquímica em parafina– IHC para miosina (MyHC)

As peças, inclusas em parafina, foram cortadas em 05 µm de espessura e coletados em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma Aldrich, USA), dois a quatro cortes por lâmina, em três profundidades diferentes. A cada lâmina completada, 50 cortes

de 5um foram descartados, até a coleta para a próxima lâmina. A imunistoquímica foi realizada, utilizando o método indireto com sistema de amplificação (biotina - streptavidina - peroxidase). Em uma cubeta de vidro, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em uma série decrescente de álcool (absoluto, 80% e 50%) e água. Em seguida foram imersos em H₂O₂, 20 volumes (Dinâmica, Brasil) - 2x por 6 min, para inativar a atividade da peroxidase endógena, existente no tecido, e lavados em água destilada e tampão PBS. Para o bloqueio de outras proteínas inespecíficas presentes no tecido, os cortes foram incubados em câmara úmida com uma solução de BSA 3% (Pentex, USA) em tampão PBS por 30 min à temperatura ambiente, para diminuir a reação de fundo (marcação inespecífica).

Após breve lavagem em tampão PBS, os cortes foram incubados em anticorpo anti-miosina (Anti-Slow Skeletal Myosin Heavy chain antibody AB11083). O anticorpo foi diluído em solução de BSA 1% em PBS. As diluições e o tempo de incubação foram otimizados em 1:1000 overnight. Passado o tempo de incubação no anticorpo primário anti-Miosina, os cortes foram lavados em PBS e submetidos ao “Kit” DAKO LSAB 690 (Cytomation, Dinamarca) de amplificação, por 2 horas. Após cada reagente os cortes foram lavados em PBS. As reações foram reveladas por 3 minutos à 37°C em uma solução contendo DAB (3,3 diaminobenzina, Sigma Aldrich, USA) – a revelação se dá pela reação química entre o DAB, a peroxidase do anticorpo secundário e o peróxido de hidrogênio adicionado na solução de revelação, formando um precipitado marrom, insolúvel e permanente. Ao final da revelação, os cortes foram lavados em água destilada, contra corados com hematoxilina de Harris (Dinâmica, Brasil) por 1minuto e 30 segundos, e desidratados em sequência crescente de álcoois. Por fim, as lâminas foram montadas com Entelan.

Como controle negativo, em todas as reações realizadas, o corte localizado mais superiormente, foi submetido ao mesmo tratamento, omitindo-se somente os anticorpos primários, utilizando no lugar destes a solução de diluição (BSA 1% em PBS). Deste modo, cada lâmina, destinada à imunistoquímica, teve seu próprio “controle negativo”.

Todas as lâminas processadas foram analisadas por completo, e a quantidade de fibras tipo I imunomarcadas foram quantificadas a partir de imagens obtidas no fotomicroscópio Olympus BX61.

Parâmetros avaliados: marcação imunoistoquímica das fibras lentas compatíveis com miosina tipo I.

4.4.2 Técnica para imunoistoquímica em corte congelado- IHC para Alpha CD 31 e Laminina

O fragmento anterior do músculo masseter profundo (ver Figura 05) foi congelado por imersão, em nitrogênio (-150°C), durante 1 minuto, protegido com talco inerte e acomodado em uma rolha (Figura 10). Após esse tempo, o material foi acondicionado em papel alumínio, identificado e levado ao freezer à -80°C. Após isso, foi transferido para a câmara de um micrótomo criostato à -20°C, visando a realização de cortes transversais de 05 µm de espessura.

As reações de imunoistoquímica tanto para Alpha CD31 (anti- CD31 antibody ab28364) quanto para Laminina (anti-laminin antibody ab11575) foram padronizadas em uma concentração de 1: 100. Os cortes foram expostos ao bloqueio da peroxidase endógena por 6 minutos, ao bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 3% por 20 minutos e ao anticorpo primário overnight. Passado o tempo de incubação no anticorpo primário anti-alpha CD31 e anti- Laminina, os cortes foram lavados em PBS e submetidos ao “Kit” DAKO 0411 (Cytomation, Dinamarca) de amplificação, por 2 horas.

Após a reação, 05 imagens de cada animal (Mandarim-De-Lacerda, 2003) foram obtidas em aumento de 400x e quantificadas.

Parâmetros avaliados: endotélio capilar imunomarcado com anticorpos anti- laminina e anti-alpha CD31.

4.5 Técnicas para Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Um fragmento da porção anterior do feixe profundo do músculo masseter de cada animal foi coletado, e, rapidamente, imerso em solução fixadora contendo fixador de

Karnovsky. Após o período de fixação, as peças foram processadas e incluídas em resina. Os fragmentos de músculo masseter profundo esquerdo destinados à MET, foram fixados durante 6 horas a uma temperatura de 4 °C, por imersão, em fixador de Karnovsky preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2, por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona P.A (50, 70, 80, 90%) e 03 trocas em acetona P.A pura. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas gradualmente com resina Spurr. As amostras foram incluídas na resina pura em moldes de silicone, e levadas em estufa 60 °C, por 48 horas, onde foram polimerizadas.

Cortes semi- finos, com 1 µm de espessura, foram obtidos. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina 1% em borato de sódio e observados em microscópio de luz, para seleção da área de interesse. Em seguida, os blocos foram trimados e cortes de 70 – 90 nm de espessura obtidos em um ultramicrotomo, equipado com navalha de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre (200 mesh) e contrastados com acetado de uranila (solução alcoólica) e citrato de chumbo. As grades contendo os cortes foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM 1400- Japão).

Parâmetros avaliados: características ultraestruturais das mitocôndrias e das cisternas do retículo sarcoplasmático.

4.6 Técnica histoquímica para Espécies Reativas de Oxigênio – ROS

As amostras foram cortados em criostato, a 5 µm de espessura, e incubados com Diidroetídeo (DHE -Dihydroethidium) por 15 minutos em câmara úmida e escura a uma concentração de 10⁻⁵ µg/mL. Após a incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em PFA 4% por 15 minutos. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Olympus BX61) acoplado a câmera fotográfica (Olympus DP72), as imagens dos cortes (n=10) foram obtidas em um aumento de 400x.

Parâmetros avaliados: quantidade de espécie reativa de oxigênio, em músculo masseter submetidos aos diferentes protocolos experimentais.

4.7 Técnica histoquímica para Succinato Desidrogenase - SDH

O fragmento do terço médio posterior do músculo masseter profundo foi congelado por imersão, em nitrogênio (-150°C), durante 1 minuto (Figura 07). Após esse tempo, o material foi acondicionado em freezer à -80°C e depois transferido para a câmara de um micrótomo criostato à -20°C, para a realização de cortes transversais de 5 µm de espessura.

A técnica histoquímica para demonstração da succinato desidrogenase (SDH) foi realizada em lâminas contendo cortes de músculos incubando-as solução de succinato de sódio e nitroblue tetrazolium (NBT – Sigma Aldrich), a 37°C, por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com água destilada, fixadas em formol Cálcio Backer, por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada, e por fim montadas com Bálsamo do Canadá. A partir de cada secção transversal de músculo, 5 imagens (Mandarim-De-Lacerda, 2003) foram sistematicamente capturadas com a objetiva de 20x.

As quantidades de fibras claras, intermediárias e escuras foram obtidas a partir da reação histoquímica (SDH). Esta análise permitiu avaliar se a atividade enzimática das fibras variam sob as diferentes condições experimentais e, desta forma compreender se alteram as funções musculares.

Parâmetros avaliados: atividade metabólica de secções de músculo masseter expostos aos diferentes protocolos.

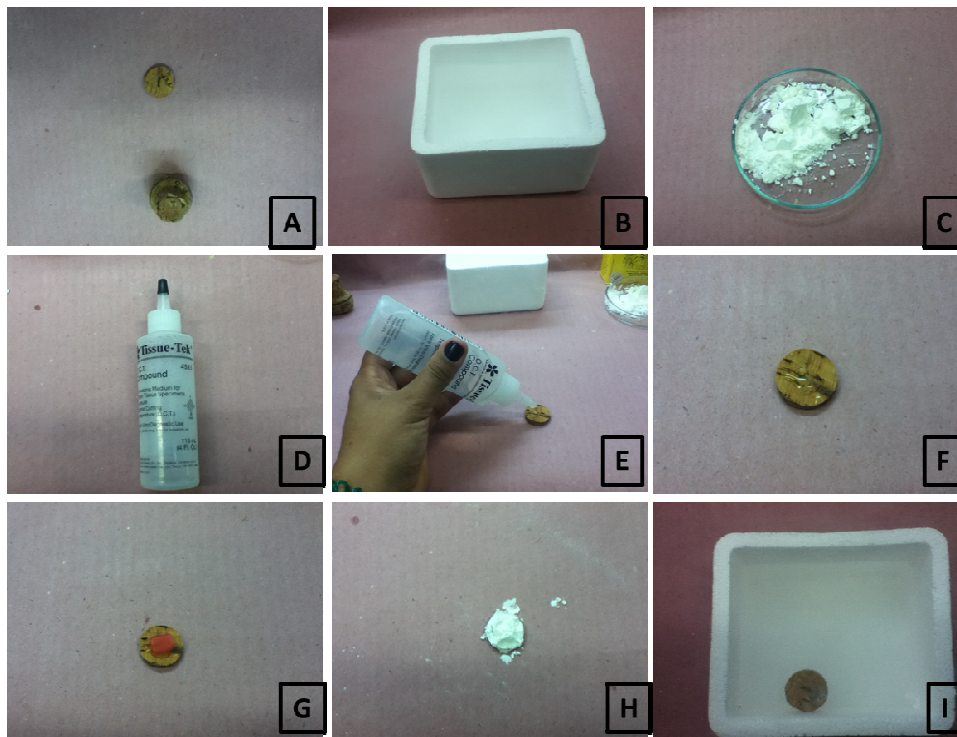


Figura 07: Simulação da Técnica de Congelamento com Nitrogênio líquido e rolha. Em **A** –Rolha que foi cortada transversalmente; **B**- Isopor contendo nitrogênio líquido; **C**- Talco inerte; **D**- OCT- Tissue Tek; **E**- Tissue Tek sendo acomodado sobre a rolha; **F**- Rolha com Tissue Tek; **G**- Amostra acomodada sobre a rolha com Tissue Tek; **H**- Amostra envolta em talco inerte; **I**- Congelamento do conjunto (H) em nitrogênio líquido (B).

4.8 Análise Estatística

Observada a normalidade dos dados, a média e o erro padrão da média (SEM) foram obtidos, para posterior análise estatística em Anova fatorial seguido de Tukey test, com nível de significância de $p < 0,05$.

5 Resultados

O feixe superficial do músculo masseter ipsilateral à exodontia foi dividido no sentido ântero-posterior e analisado por meio de MPO e GT.

5.1 Quantificação de polimorfonucleares por Mieloperoxidase – MPO

O número de polimorfonucleares não revelou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes protocolos experimentais propostos, quando comparados iguais quantidades de tecido, em miligrama (Figura 08 e tabela 02).

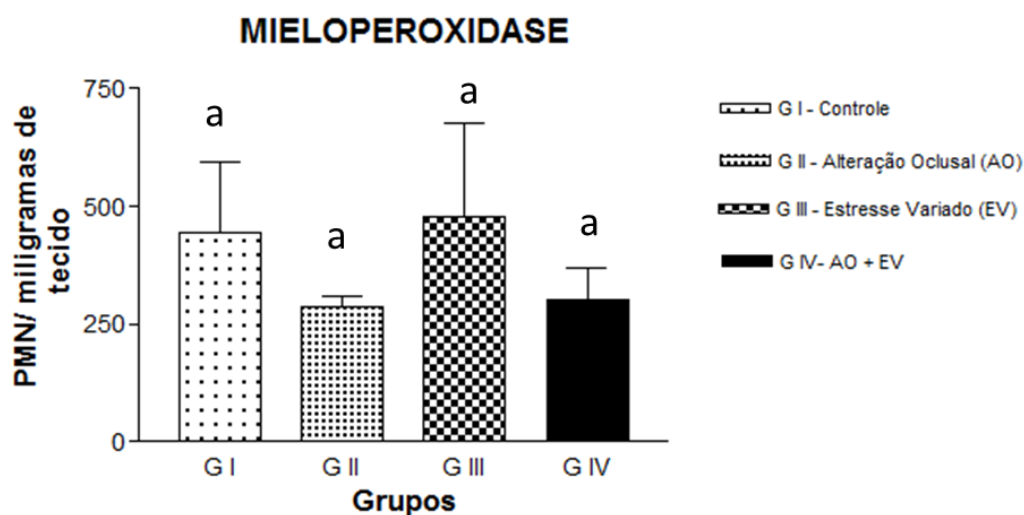


Figura 08: Representação gráfica dos resultados estatísticos dos grupos experimentais propostos após reação de Mieloperoxidase (MPO), dispostos de acordo com quantidade de polimorfunucleares por miligrama de tecido. Não houve diferença estatisticamente significante. Anova e Tuckey. Prisma 3.0.

Tabela 02: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos, com relação ao número polimorfunucleares por miligrama (mg) de tecido, submetidos à reação de mieloperoxidase (MPO).

MPO			
	MEDIA	SEM	N
G I - Controle	445.6	149,9	5
G II – Alteração Oclusal (AO)	285.6	22.4	5
G III – Estresse Variado (EV)	476.8	201.3	5
G IV – AO + EV	301.2	69.4	5

5.2 Expressão de metaloproteinases por Gelatinase Total - GT

As amostras, devidamente diluídas e preparadas, do feixe superficial inferior do músculo masseter foram reveladas em gel de poliacrilamida (Figura 09) e coradas com Comassie Blue G-250 e apresentaram bandas compatíveis com a MMP-2 reconhecidas como 72 Kda, as quais não foram diferentes estatisticamente entre os grupos (Figura 10 e Tabela 03).

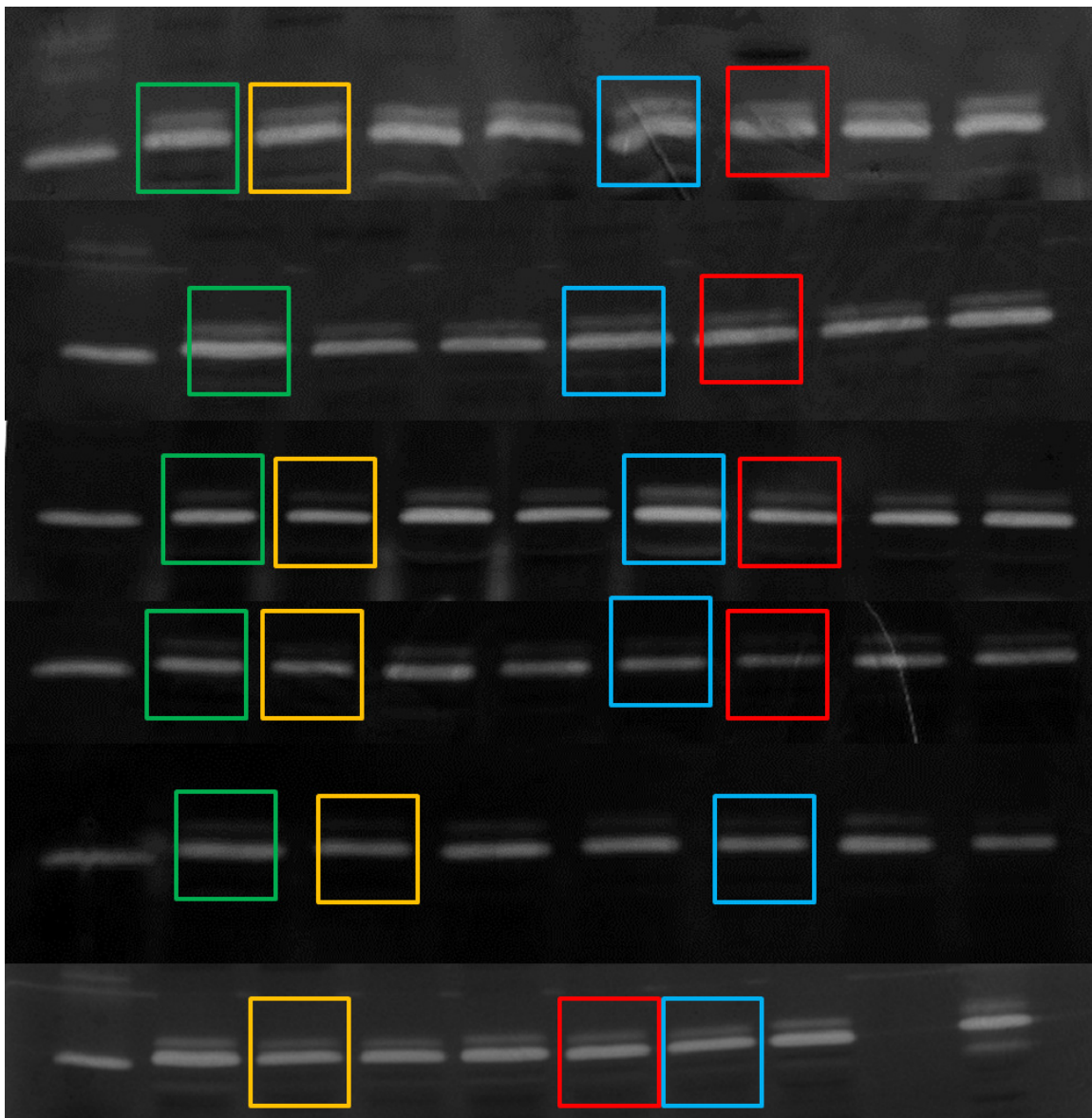


Figura 09: Fotografias dos géis após reação para quantificação da gelatinase total. Em **vermelho** está representado o grupo controle **GI**- sem estresse e sem alteração oclusal, em **amarelo** o grupo **G II** com alteração oclusal e sem estresse, em **azul** os animais do grupo **G III** sem alteração oclusal e com estresse e em **verde** grupo **G IV**- com alteração oclusal e com estresse.

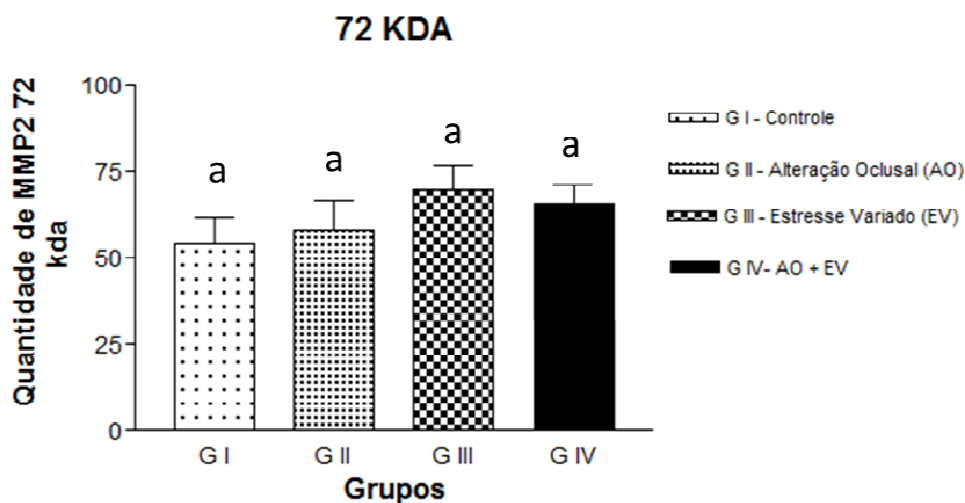


Figura 10: Representação gráfica dos resultados estatísticos dos grupos experimentais propostos após reação de Zimografia para Gelatinase Total (GT), dispostos de acordo com quantidade de proteínas com peso molecular de 72 kilodaltons (Kda).

Tabela 03: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos, com relação às bandas relativas aos pesos moleculares de 72 Kda.

GELATINASE TOTAL – GT -72 KDA			
	MEDIA	SEM	N
G I - Controle	54.2	7.7	5
G II – Alteração Oclusal (AO)	58.1	8.8	5
G III – Estresse Variado (EV)	69.6	7.2	5
G IV – AO + EV	65.7	5.3	5

Diferentes porções do músculo masseter profundo, ipsilateral à exodontia, foram analisadas por meio de Hematoxilina Eosina (HE), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), Imunoistoquímica (IHC) e reação histoquímica de Succinato Desidrogenase (SDH).

5.3 Hematoxilina e Eosina - HE

5.3.1 Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar o efeito do estresse e da alteração oclusal por exodontia, nas características histológicas do feixe profundo anterior do músculo masseter, bem como na quantidade de fibras musculares por área nos diferentes grupos experimentais (Figura 11). Foram capturadas imagens no aumento de 400X utilizando um microscópio de luz Olympus BX61 acoplado a uma câmera digital.

No grupo controle - GI foram observadas fibras musculares arredondadas, de tamanhos ligeiramente diferentes, com núcleos periféricos regularmente distribuídos nos fascículos. O tecido conjuntivo entre estes fascículos revelou vasos sanguíneos, feixes de fibras nervosas, fusos neuromusculares e especificamente o endomísio com capilares evidentes. Essas características caracterizam o aspecto normal do tecido (Figura 11-A). No grupo GII, submetidas à exodontia, as fibras apresentaram diâmetros variados e contornos angulados, com núcleos de localização central, ou em deslocamento restritos a determinadas regiões. O endomísio apresentou características dos capilares semelhantes ao controle e ausência de células inflamatórias (Figura 11-B).

O grupo GIII, de animais submetidos ao estresse crônico variado isolado, revelou, em alguns fascículos, fibras com grandes diâmetros, arredondadas e isoladas, entre fibras de pequeno diâmetro e contorno angulado. Foram notáveis as discrepâncias entre os tamanhos das fibras. O endomísio mostrou aspecto normal (Figura 11-C).

Por fim, no grupo GIV, cujos animais foram submetidos à exodontia associada ao estresse crônico variado, nota-se fascículos isolados, com a grande maioria das fibras de contorno angulado e núcleos localizados na porção central ou em deslocamento. Há fibras de diâmetros muito menores que as demais fibras, e também é marcante seu contorno angulado. O endomísio aparece com aspecto de normalidade, mas espesso entre as fibras em atrofia (Figura 11-D).

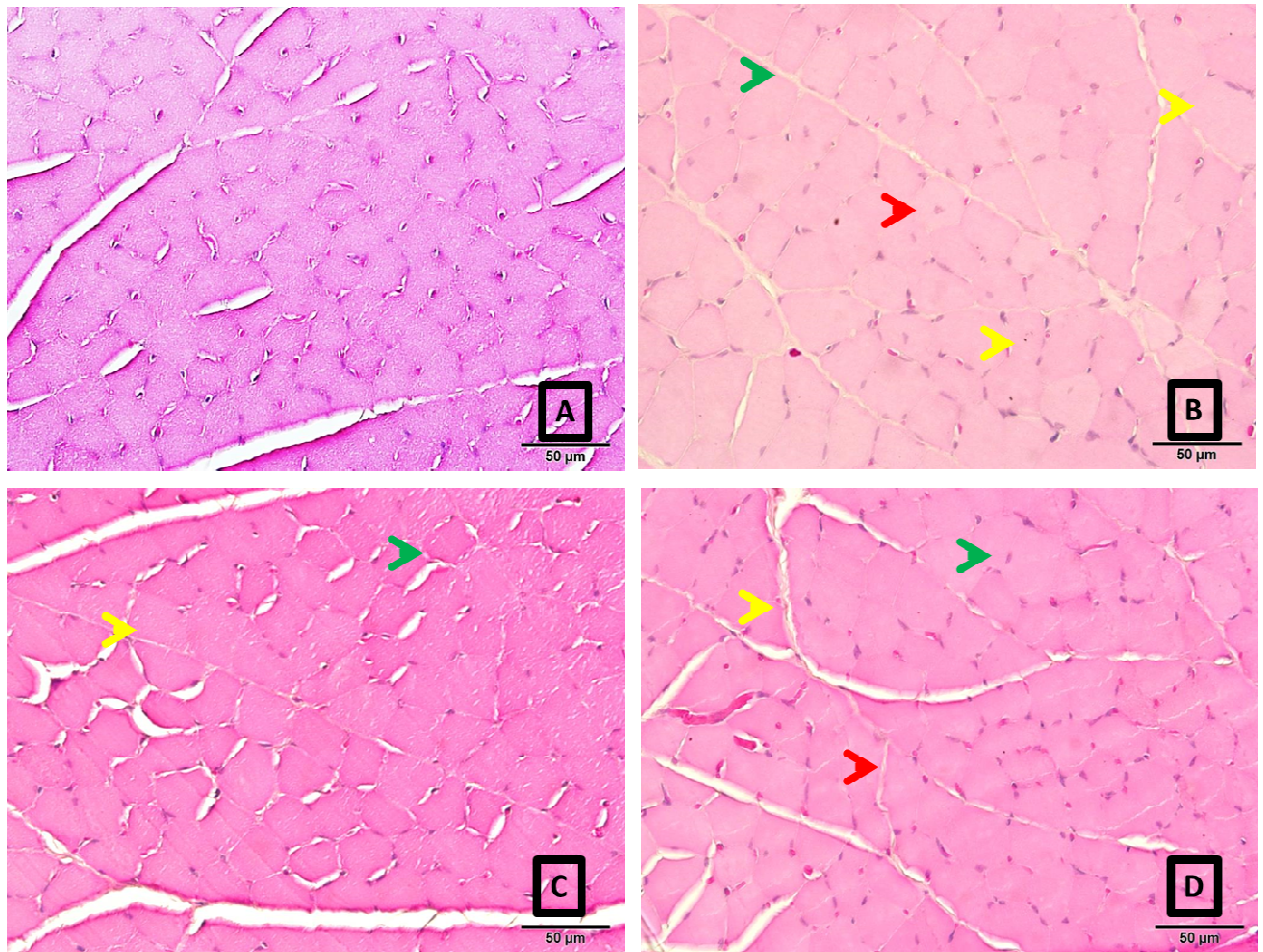


Figura 11: Fotomicrografias de músculo masseter de ratos, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) sendo: Em **A**- o grupo controle G I: sem estresse e sem alteração oclusal, em **B** o grupo G II: com alteração oclusal e sem estresse. Notar fibras de diâmetros variados (setas amarelas), núcleos de localização central (seta vermelha) e ausência de células inflamatórias no endomísio (seta verde), em **C** os animais do grupo G III: sem alteração oclusal e com estresse. Notar fibras de grande diâmetro (seta amarela) e fibras de pequeno diâmetro (seta verde) e em **D** grupo G IV: com alteração oclusal e com estresse. Notar fascículos isolados (seta amarela), fibras com contorno angulado (seta vermelha) e células com núcleo em deslocamento (seta verde). Aumento de 400x.

5.3.2 Análise quantitativa

A análise da área de músculo de cada animal foi feita pelo Método de Contagem Diferencial de Pontos (Mandarim-De-Lacerda, 2003), onde um sistema-teste de 80 pontos foi sobreposto aos campos previamente capturados (n=3) em aumento de 200x. A área relativa de células musculares foi determinada pela relação entre os pontos que estivessem sobre tecido muscular (Pp) e o total de pontos da grade teste (Pt), sendo representada pela seguinte fórmula: $V_v = P_p/P_t$ (%) (Figura 12)

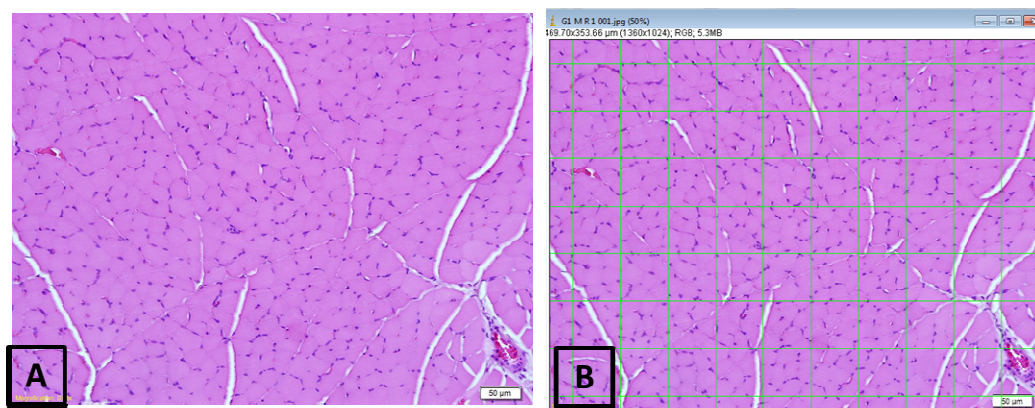


Figura 12: **A** Fotomicrografia de músculo masseter corado em Hematoxilina e Eosina, capturada em aumento de 200x, submetida ao programa IMAGE J, **B** fotomicrografia com grade de 80 pontos sobreposta, para contagem dos pontos de fibras musculares por área.

Verificada a normalidade dos dados, realizou-se teste estatístico ANOVA fatorial, seguido de Tukey. Não houve diferença estatisticamente significante ($p < 0,005$) entre os diferentes grupos experimentais propostos, com relação à quantidade de fibras musculares por área de secção quantificada, através do Software livre Image J (Figura 13 e tabela 04).

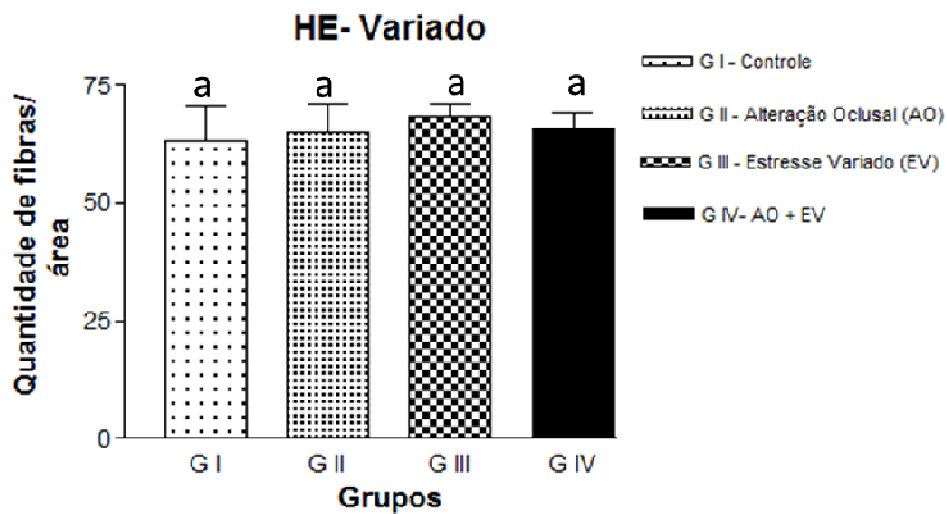


Figura 13: Representa os resultados estatísticos da quantificação do número de fibras musculares por área, a partir de um tecido corado em HE, em um aumento de 200x. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Letras diferentes revelam diferenças estatísticas.

Tabela 04: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos com relação ao número de fibras quantificadas por meio de reação HE. Onde **G I**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em **G III** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (EV)

HE			
	MEDIA	SEM	N
<i>G I - Controle S</i>	63,14	7,7	5
<i>G II - Alteração Oclusal (AO)</i>	65,08	6	5
<i>G III - Estresse Variado (EV)</i>	68,56	2,6	5
<i>G IV - AO + EV</i>	65,76	3,4	5

5.4 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

A análise ultraestrutural das fibras musculares do grupo controle (GI) mostrou núcleo alongado sob o sarcolema, com as miofibrilas preenchendo o sarcoplasma, circundadas por cisternas do retículo sarcoplasmático de contorno regular e túbulos T. Além disso, foi possível visualizar numerosas mitocôndrias intermiofibrilares sem sinais de inchaço. Em maior aumento, foram evidentes as cristas mitocondriais, membrana interna e espaço intermembrana (Figura 14-A).

No grupo submetido à exodontia (GII) as características gerais das fibras estavam dentro da normalidade. Em determinados lugares, as cisternas do retículo mostraram contorno irregular, com uma perda da continuidade da membrana e as mitocôndrias intumescidas com desarranjo das cristas mitocondriais e da membrana interna (Figura 14-B).

O grupo submetido ao estresse crônico variado isolado (GIII) revelou rompimento das cisternas do retículo sarcoplasmático em determinadas regiões da fibra, e desaparecimento das membranas do retículo sarcoplasmático, permanecendo entre as miofibrilas seccionadas transversalmente, áreas elétron-lúcidas irregulares (Figura 14-C).

No grupo de estresse crônico variado associado à exodontia (GIV) foi evidente o desaparecimento da membrana do retículo sarcoplasmático, permanecendo no local algumas áreas elétron-lúcidas irregulares associadas ao desarranjo no contorno das miofibrilas. As mitocôndrias estão túrgidas, com desarranjo ou desaparecimento das cristas mitocondriais e rompimento das membranas interna e externa. Foram notadas áreas em que as miofibrilas ficaram contínuas umas às outras (Figura 14-D).

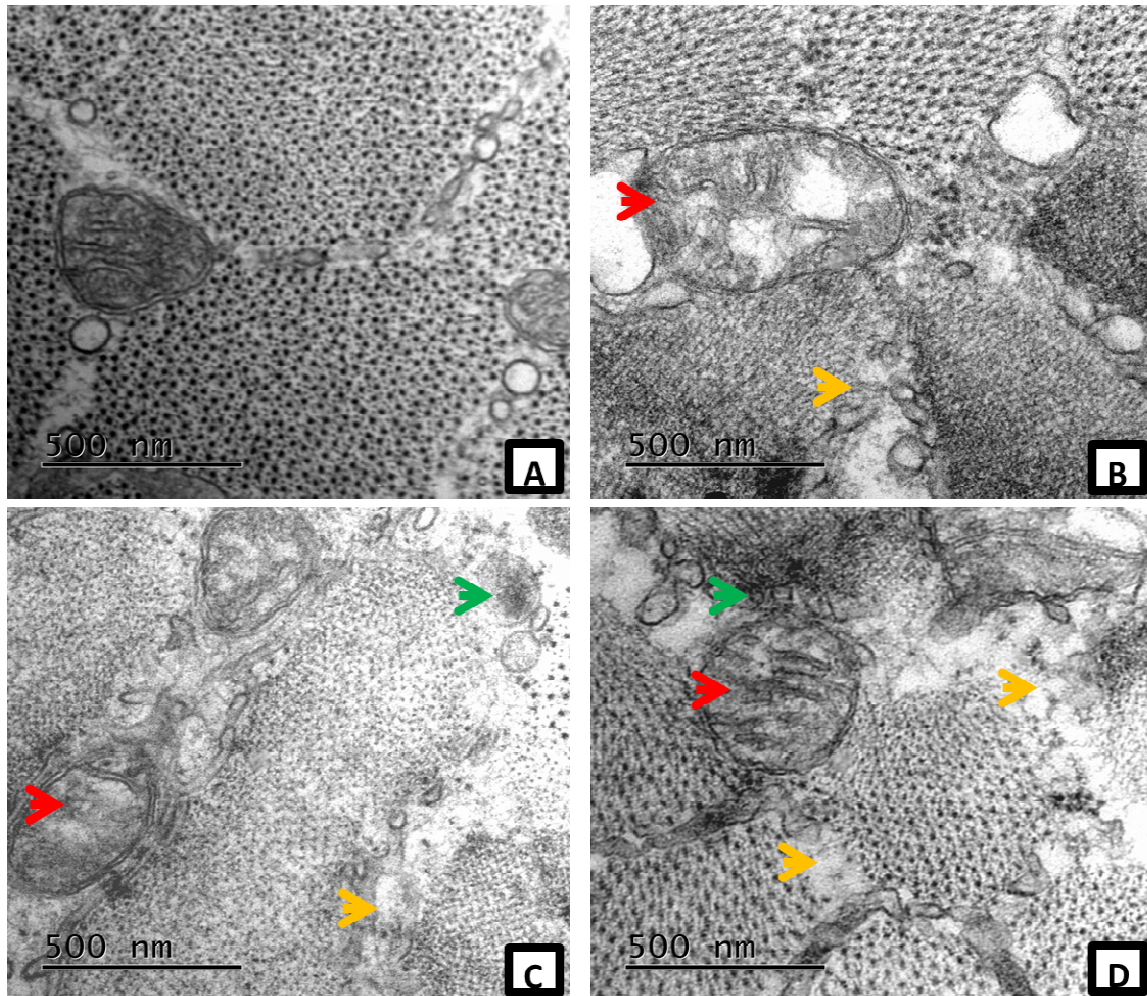


Figura 14: Fotomicrografias em aumento de 60.000 x, de cortes de músculo masseter esquerdo de ratos, preparados para visualização em Microscópio Eletrônico de Transmissão. Em **A**- o grupo controle GI- sem estresse e sem alteração oclusal, em **B** o grupo G II com alteração oclusal e sem estresse, em **C** os animais do grupo G III sem alteração oclusal e com estresse e em **D** grupo G IV- com alteração oclusal e com estresse crônico variado. Setas vermelhas indicam mitocôndrias intumescidas, Setas amarelas sinalizam rompimento das vesículas do retículo sarcoplasmático e setas verdes indicam áreas eletron-lúcidas.

5.5 Imunoistoquímica - IHC

Foi proposto neste estudo a avaliação do feixe profundo anterior do músculo masseter de ratos, submetidos ou não ao estresse variado e à alteração oclusal por meio de reação de imunoistoquímica para Laminina, Alpha CD31 e Miosina. A formação/ morfologia dos capilares foi avaliada por meio da reação antígeno - anticorpo contra a laminina e α -CD31 do endotélio e a distribuição das fibras do tipo I marcadas com o anticorpo para cadeia pesada da miosina (MyHC).

5.5.1 Resultados Laminina

Os cortes congelados dos músculos foram obtidos a partir da técnica de congelamento, cortados em micrótomo criostato e colocados sobre as lâminas.

Após o procedimento de imunomarcção para a glicoproteína laminina a presença capilares foi revelada como formação circular de coloração marrom entre as fibras musculares seccionadas transversalmente.

A análise das fotomicrografias (n=06) revelou no grupo controle GI capilares com luz aberta e contorno regular entre as fibras musculares (Figura 15-A), enquanto no grupo com alteração oclusal GII, após a exodontia, os capilares mostraram diâmetros variados, alguns com lúmen reduzido e outros, com lúmen dilatado (Figura 15-B).

O grupo III, submetido ao estresse crônico variado, sugere maior número de capilares com diâmetros variados (Figura 15-C). O grupo IV, submetido à exodontia associada ao estresse, apresentou capilares com diâmetros variados, no entanto, foram mais frequentes regiões revelando capilares de lúmen contraído (Figura 15 D).

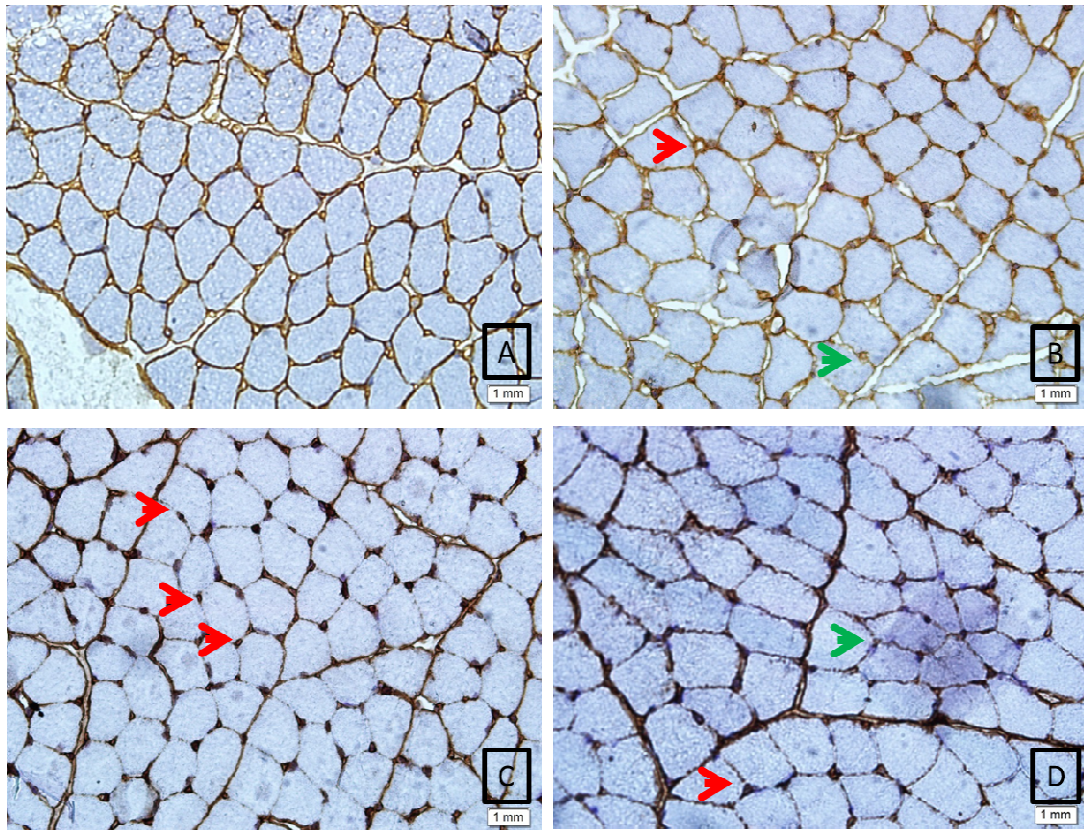


Figura 15: Fotomicrografias em aumento de 400 x, de cortes de músculo masseter esquerdo de ratos congelados e submetidos à reação de imunohistoquímica anti- laminina. **A= GI-** grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, **B= G II:** animais com alteração oclusal e sem estresse, seta vermelha capilar com lúmen dilatado, seta verde: capilar com lúmen reduzido em **C= GIII** animais sem alteração oclusal e com estresse. Setas vermelhas indicam aumento no número de capilares bem como presença de lúmen contraído. **D= G IV-** animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (EV). Setas vermelhas indicam lúmen contraído enquanto as setas verdes indicam lúmen dilatado. Todas as lâminas foram submetidas à revelação com DAB por 30 segundos.

5.5.2 Resultados Alpha CD31- PECAM

Os cortes congelados foram obtidos a partir da técnica de congelamento, cortados em micrótomo criostato e colocados sobre as lâminas. Após o procedimento de marcação para imunohistoquímica (Figura 16). Imagens (n=06) foram obtidas por campo e a quantidade de marcação para Alpha CD31 foi quantificada na sua totalidade (Figura 17):

Os grupos com exodontia isolada (GII) e estresse crônico variado (GIII) ou associados à exodontia (GIV) apresentaram tendência ao aumento dos capilares (Figura 18 e Tabela 5).

A análise qualitativa dos grupos permitiu afirmar que no grupo de animais onde houve a alteração oclusal (GII) os fascículos de capilares aparentavam estar normais com alguns capilares contraídos, quando comparados ao grupo controle (GI). No grupo com estresse variado (GIII) foi possível visualizar capilares com a luz aberta e com as fibras anguladas. Por fim, no grupo com alteração oclusal e estresse variado associado (GIV) foram encontrados, em geral, capilares contraídos.

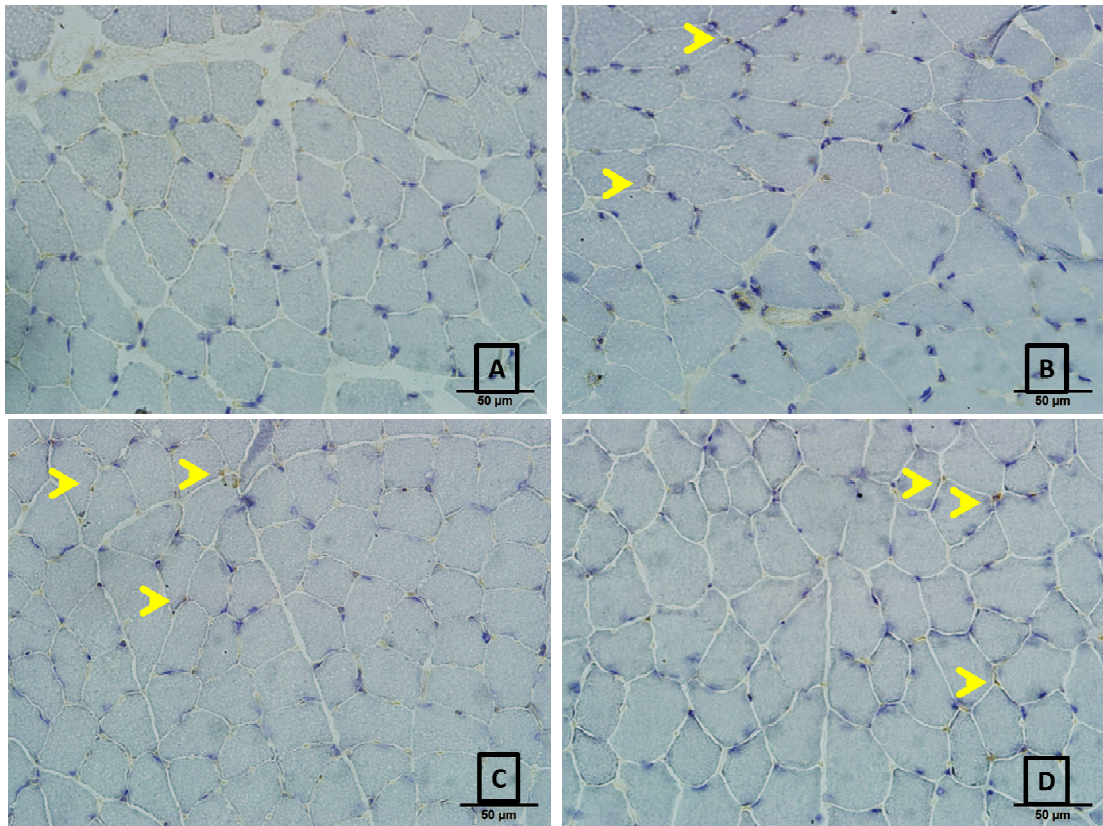


Figura 16: Fotomicrografias em aumento de 400 x, de cortes de músculo masseter esquerdo de ratos congelados e submetidos à reação de imunohistoquímica anti- Alpha CD 31. A= **GI**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, B= **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, setas amarelas indicam capilares com lúmen reduzido e lúmen dilatado, em C= **GIII** animais sem alteração oclusal e com estresse. Setas amarelas indicam aumento no número de capilares e em D= **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Setas amarelas indicam aumento no número de capilares bem como diâmetros contraídos. Todas as lâminas foram submetidas à revelação com DAB por 3 minutos.

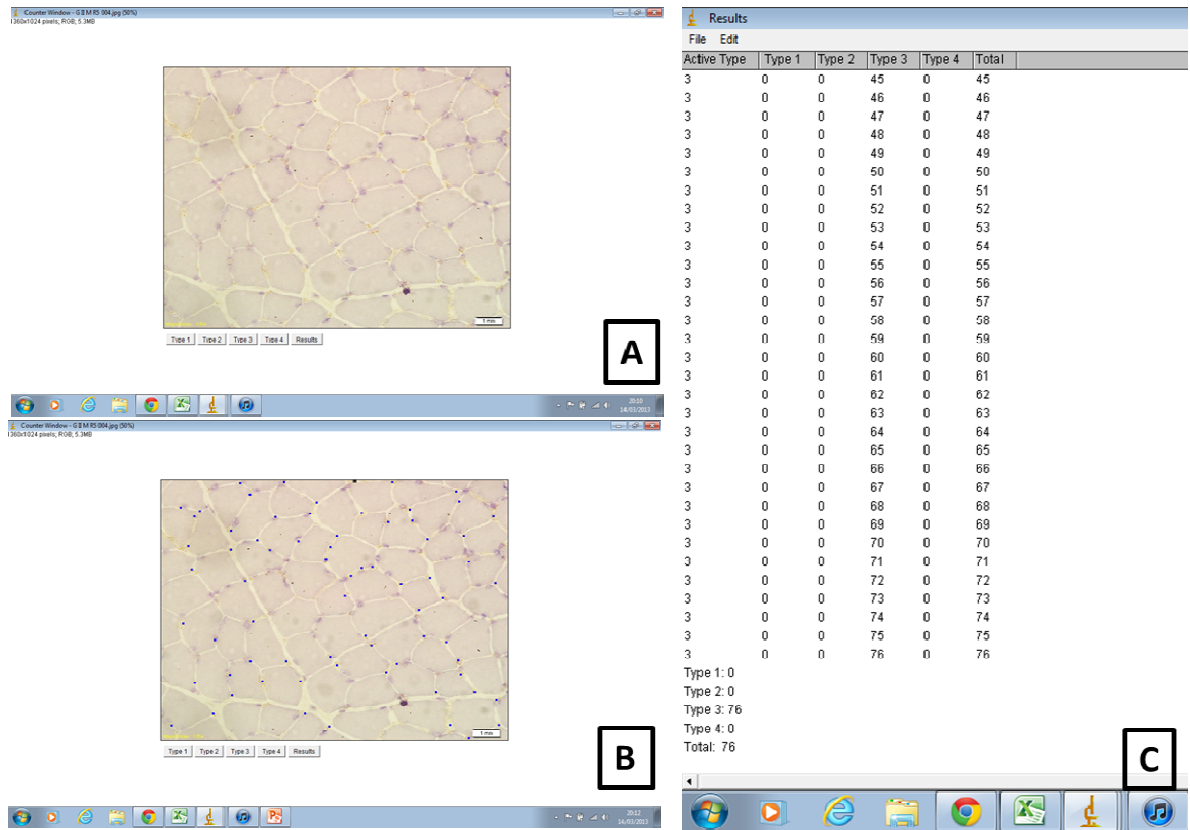


Figura 17: **A** Fotomicrografia de músculo masseter submetido à reação de imunistoquímica anti-Alpha CD31, capturada em aumento de 400x, submetida ao programa IMAGE J, **B** fotomicrografias para contagem das imunomarcações identificadas por área

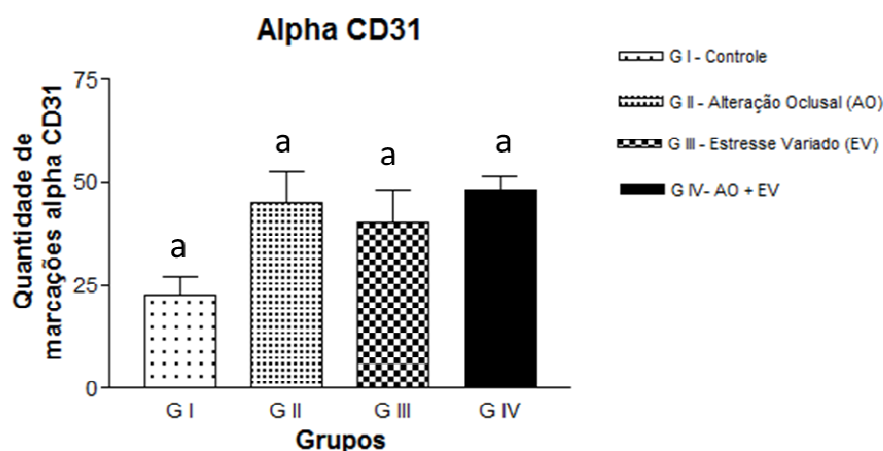


Figura 18: Representa os resultados estatísticos da quantificação do número de pontos por área marcados em reação imunistoquímica anti- Alpha CD31, em um aumento de 400x. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 05: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos com relação marcação da reação imunistoquímica anti - Alpha CD31. **G I-** grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, **G II:** animais com alteração oclusal e sem estresse, em **GIII** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV-** animais com alteração oclusal e com estresse.

Alpha CD 31- PECAM			
	MEDIA	SEM	N
G I – Controle	22,7	4,4	5
G II – Alteração Oclusal (AO)	45,2	7,3	5
G III – Estresse Variado (EV)	40,2	8,0	5
G IV – AO + EV	48,37	3,1	5

5.5.3 Resultados para Miosina - MyHC

Essa reação permitiu identificar as fibras musculares imunomarcadas com o anticorpo para cadeia pesada de miosina do tipo I, ou seja, as de contração lenta. Escassas fibras com esta característica foram notadas no feixe profundo anterior do músculo masseter,

revelando predomínio de fibras de contração rápida neste feixe. Essas fibras imunomarcadas estavam próximas à fusos (Figura 19)

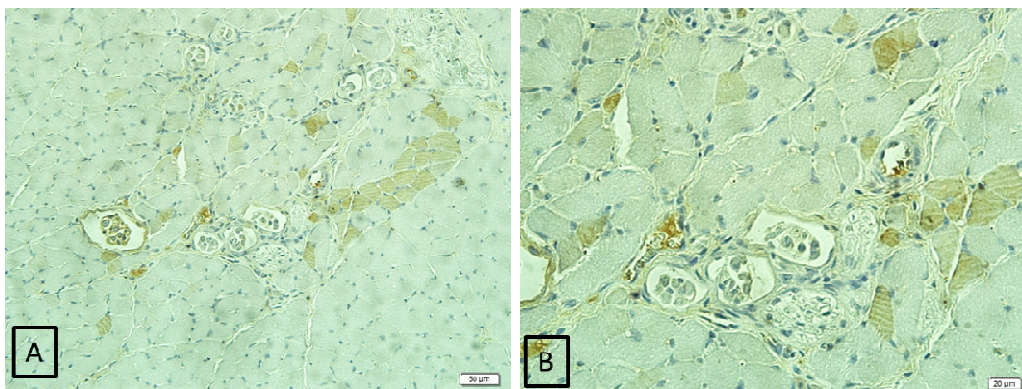


Figura 19: Fotomicrografias de cortes de músculo masseter esquerdo de ratos, congelados e submetidos à reação de imunohistoquímica anti- Miosina. A- Marcação para fibras lentas – aumento de 200x e B- Marcação para fibras lentas- aumentos 400x. Todas as lâminas foram submetidas à revelação com DAB por 3 minutos

5. 6 Resultados para Espécies Reativas de Oxigênio - ROS

A fluorescência emitida pelas espécies reativas de oxigênio manifesta-se pela intensidade de luz vermelha nos núcleos das fibras. Dez imagens representativas de cada grupo foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX61 (figura 20) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP72).

Os resultados estatísticos sugerem que a exodontia (G II) diminuiu a quantidade de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao grupo controle (G I), enquanto que a presença do estresse variado isolado (GIII) ou associado à exodontia (GIV), não alterou a quantidade de espécies reativas de oxigênio em relação ao grupo controle (GI) (Figura 21 e Tabela 6).

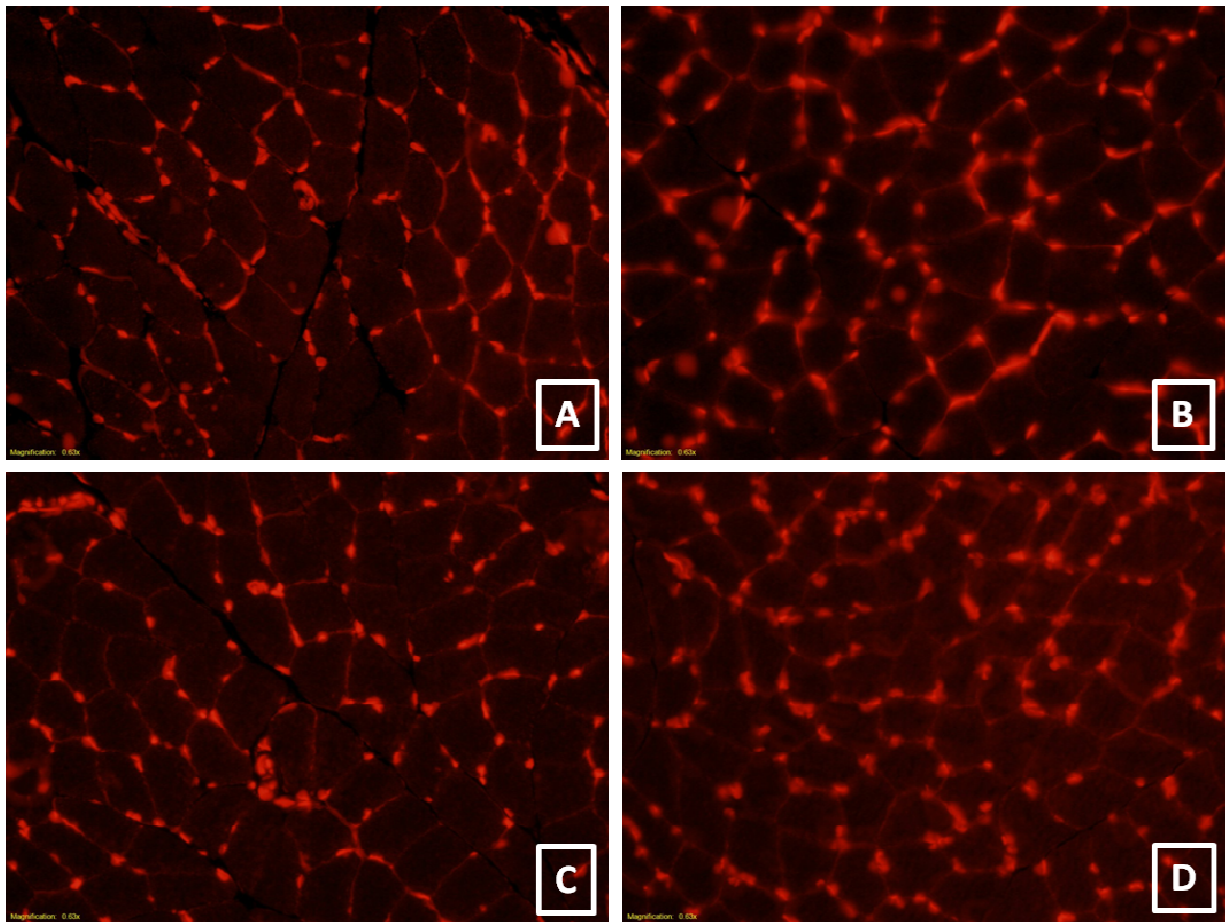


Figura 20: Fotomicrografias de músculo masseter de ratos, polarizados para a técnica de marcação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por dihidroetídeo (DHE). Onde temos em A o **GI-** grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, em B o **G II:** animais com alteração oclusal e sem estresse, em C o **GIII** animais sem alteração oclusal e com estresse e em D o **G IV-** animais com alteração oclusal e com estresse. Aumento de 400x.

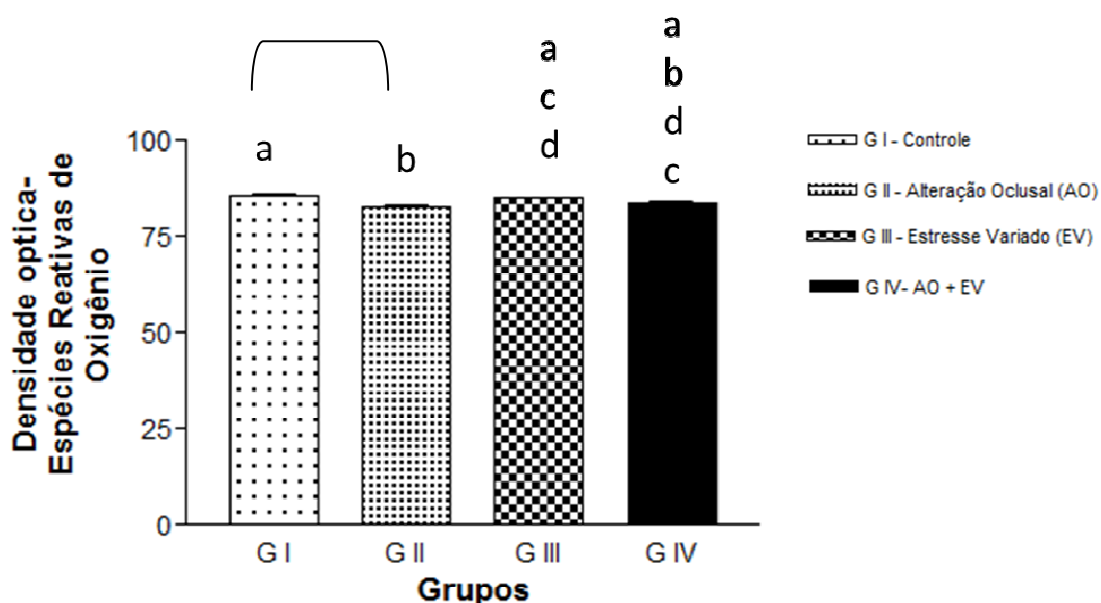


Figura 21: Representação gráfica dos resultados estatísticos dos grupos experimentais propostos após reação de fluorescência para Espécies Reativas de Oxigênio, dispostos de acordo com quantidade de fluorescência emitida. Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

Tabela 06: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos, com relação á fluorescência de amostras de músculo submetidas à reação de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS). **G I**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em **G III** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (ECV=EV).

Espécies Reativas de Oxigênio – EROS/ ROS			
	MEDIA	SEM	N
G I – Controle	85,58	0,76	5
G II – Alteração Oclusal (AO)	82,66	0,68	5
G III – Estresse Variado (EV)	85,00	0,36	5
G IV – AO + EV	83,75	0,36	5

5.7 Resultados para atividade oxidativa das fibras por Succinato desidrogenase - SDH

A região médio-posterior, do feixe profundo do masseter, foi analisada com a reação de SDH. Esta reação permitiu diferenciar fibras com três intensidades de azul (escuras, intermediárias e claras). As fibras escuras foram consideradas as de maior atividade metabólica. As fotomicrografias dos grupos são mostradas na figura 22.

Quando comparadas os três tipos de fibras, em cada grupo individualmente, foi possível verificar a presença de todos os tipos de fibras, com predomínio das fibras claras, em relação às outras: intermediárias e escuras (Figura 23)

Verificada a normalidade dos dados oriundos da reação histoquímica para SDH e, procedendo-se os testes de ANOVA Fatorial e Tuckey, após equivalência do número de animais, os resultados apontaram não haver diferença estatisticamente relevante com relação à quantidade de fibras escuras, intermediárias e claras entre os quatro grupos experimentais propostos (Figura 24 e Tabela 07)

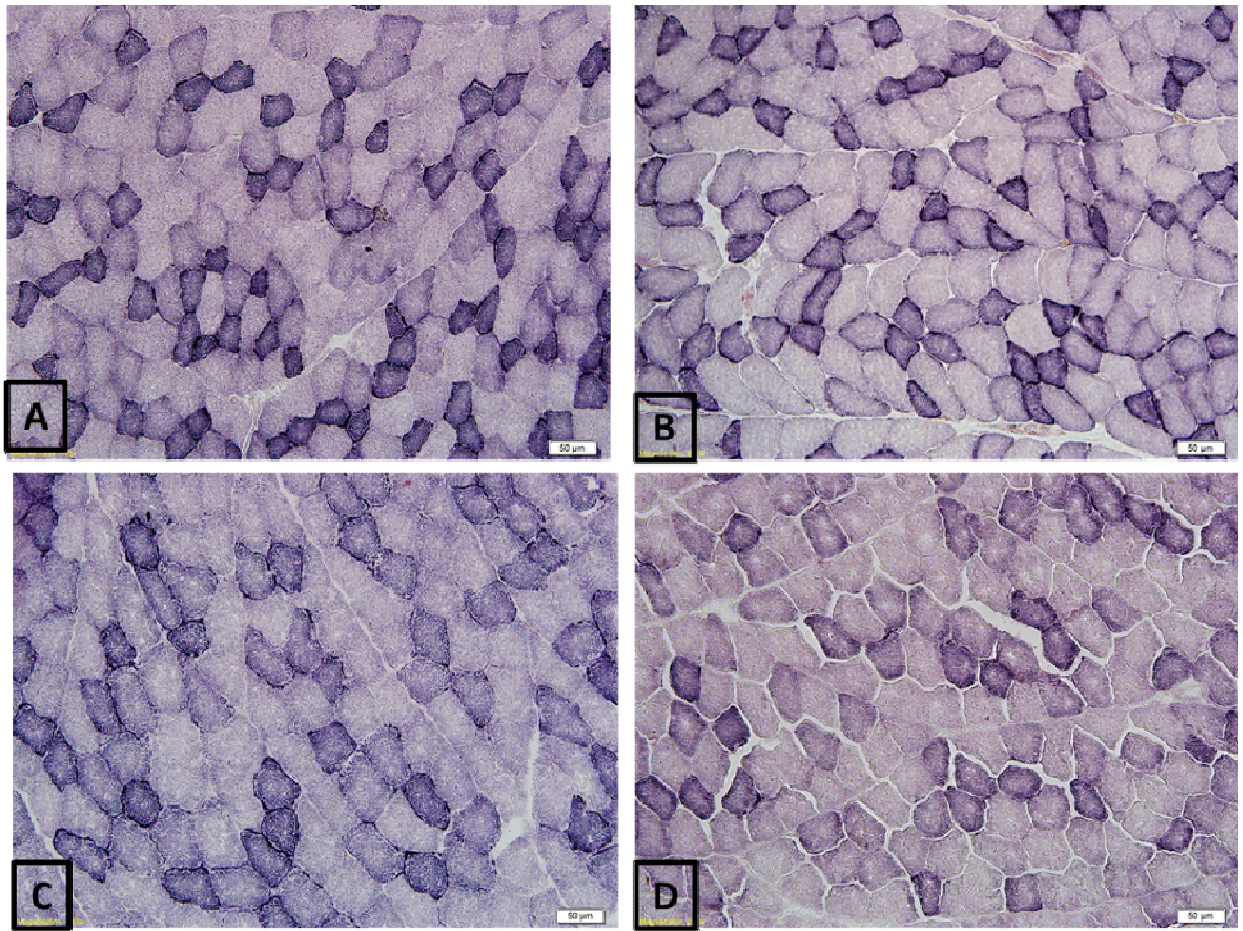


Figura 22: Fotomicrografias de músculo masseter de ratos submetidos à reação histoquímica de SDH, sendo: Onde temos em A o **GI**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, em B o **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em C o **GIII** animais sem alteração oclusal e com estresse e em D o **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (EV). Aumento de 200x.

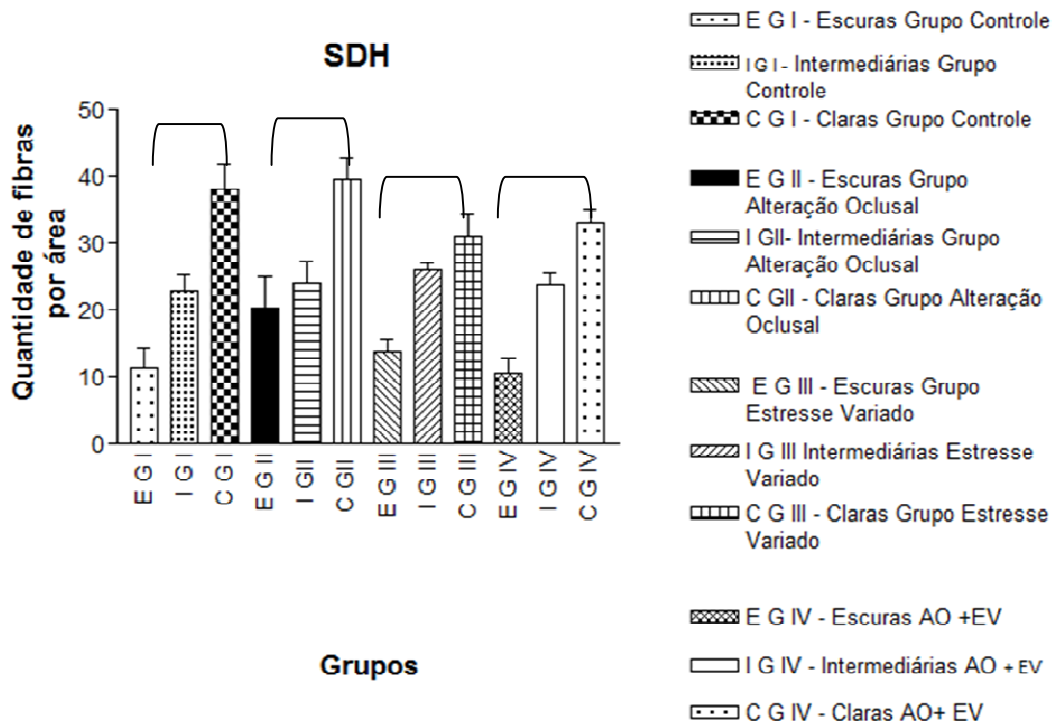


Figura 23: Representação gráfica dos resultados estatísticos dos grupos experimentais propostos após reação de SDH, E- fibras escuras, I- Fibras Intermediárias e C- fibras claras ANOVA e Tuckey. Programa Prisma 3.0. Onde temos em **G I**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, em **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em **G III** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (ECV=EV). Aumento de 400x.

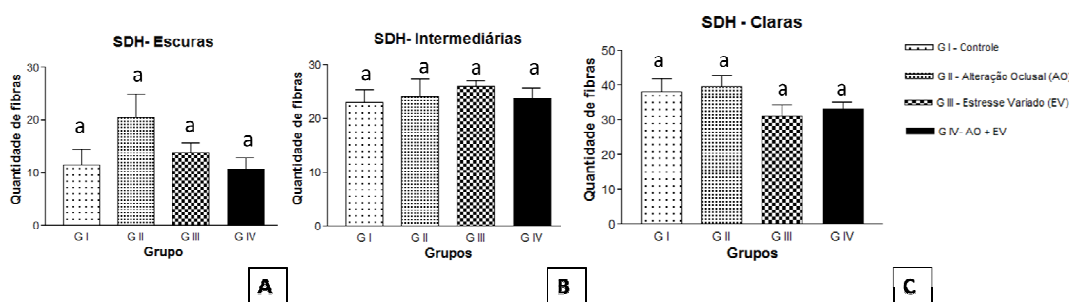


Figura 24: Representação gráfica dos resultados estatísticos dos grupos experimentais propostos após reação de SDH: **A**- fibras escuras, **B**- fibras Intermediárias, **C**- Fibras Claras. Onde temos em **G I**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, em **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em **G III** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse. Alteração oclusal (AO) por exodontia unilateral e Estresse Crônico Variado (ECV=EV). ANOVA e Tuckey. Programa Prisma 3.0.

Tabela 07: Valores de média e erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais propostos com relação ao número de fibras escuras, intermediárias e claras após reação histoquímica de SDH. Onde temos em **GI**- grupo de animais sem estresse e sem alteração oclusal, em **G II**: animais com alteração oclusal e sem estresse, em **G III** animais sem alteração oclusal e com estresse e em **G IV**- animais com alteração oclusal e com estresse.

	SDH								
	Escuras			Intermediárias			Claras		
	M	SEM	N	M	SEM	N	M	SEM	N
G I – Controle	11,42	2,986	5	22,97	2,49	5	38,2	3,592	5
G II – Alteração Oclusal (AO)	20,45	4,592	5	24	3,393	5	39,5	3,367	5
G III – Estresse Variado (EV)	13,85	1,868	5	26	1,052	5	31,15	3,274	5
G IV – AO + EV	10,68	2,144	5	23,83	1,847	5	33,09	1,973	5

6 Discussão

Este estudo avaliou as características morfológicas e fisiológicas do músculo masseter, em animais submetidos a condições de estresse crônico variado e alteração oclusal por exodontia. Esses dois fatores tem sido correlacionados com os sintomas de dor miofascial associada à DTM. No entanto, o mecanismo biológico subjacente a ambos ainda é pouco compreendido. Os resultados das diferentes metodologias visam contribuir sobre o entendimento da fisiopatologia dessas disfunções ainda carentes de tratamento. O ponto gatilho miofascial e a síndrome da dor miofascial tem recebido atenção na literatura clínica e científica (Dommerholt, 2006), mas ainda permanecem muitas dúvidas em relação à sua etiologia (Simons, 2008).

O estresse é a reação em que o organismo ativa o eixo hipotalâmico pituitário adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS), resultando em uma mudança ou em uma adaptação fisiológica (Maier and Watkins, 1998). A resposta de estresse é um conjunto de processos corporais destinados a neutralizar o estado da homeostase ameaçada (Yeh *et al.*, 2013). Sabe-se que a resposta adequada ao estresse é fundamental para a sobrevivência de um animal, mas, se prolongada ou anormal, pode ser prejudicial, relacionando-se a um grande número de doenças humanas, tais como a depressão e as doenças metabólicas (Yeh *et al.*, 2013). No entanto, o mecanismo biológico do estresse na DTM ainda é mal compreendido.

Os resultados de quantificação das enzimas MPO obtidos no feixe superficial do masseter, não mostraram haver diferença estatística entre o número de polimorfonucleares, quando comparados os diferentes grupos experimentais. Foram analisadas quantidades iguais de tecido (músculo masseter) em miligramas.

Há relatos que suportam a hipótese de que a presença de altos níveis de enzima MPO são fatores de risco para múltiplas doenças inflamatórias (Davies, 2011). Entretanto, neste estudo, a exodontia e o estresse crônico variado isolado ou associado à exodontia não induziram inflamação dessa região específica do músculo masseter. A justificativa para os fatores de variação não terem alterado os níveis de MPO pode ser atribuída ao fato da orientação ântero-posterior das fibras neste feixe. Demonstrando assim, que as atividades

de protrusão e retrusão não foram afetadas pelos fatores indutores do nosso modelo de estudo.

No feixe superficial inferior do músculo masseter, avaliado por meio da atividade gelatinolítica total, os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa quanto à expressão da forma ativa da MMP-2 - peso molecular de 72 kilodaltons (Kda) (Sakalihan *et al.*, 1996), quando comparados os diferentes grupos experimentais propostos. As proteínas da família de matriz metaloproteinases (MMP) estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como reprodução, desenvolvimento embrionário e remodelação do tecido (Howard *et al.*, 2012). As metaloproteinases (MMPs) da matriz extracelular (MEC) são endopeptidases dependentes do zinco, e responsáveis pela remodelação do tecido conjuntivo (Kaneko *et al.*, 2012). As MMP-2 e MMP-9 recebem o nome de gelatinase por sua atividade enzimática sobre os componentes da lâmina basal, uma barreira que os mioblastos devem transpor durante o desenvolvimento e regeneração muscular. (Tippett *et al.*, 2008) Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 possuem a capacidade de clivar a elastina e colágeno tipo IV. Atuam conjuntamente com a fibronectina tipo II (Nagase *et al.*, 2006).

Em um estudo temporal, após a cirurgia, Skittone *et al* 2008 verificaram aumento atividade da MMP-2 no músculo tibial em desuso, após uma semana, mas essa atividade não foi observada a partir da 3ª semana. Chen *et al* 2010 revelaram que o estresse psicológico, ao longo de 03 a 05 semanas, modifica significativamente o feixe profundo do músculo masseter de ratos, correlacionando-o como um fator de risco para o desenvolvimento de dor músculo esquelética. A exodontia isolada, assim como o estresse crônico variado isolado ou associado à exodontia, não afetaram os níveis de gelatinase. É possível que 23 dias após a exodontia seja um período longo para analisar a atividade da MMP-2, visto que Skittone *et al* 2008 não observaram sua atividade na 3ª semana após a indução do estímulo (Skittone *et al.*, 2008). Sugere-se também que esteja relacionado à morfologia e à orientação das fibras do feixe estudado neste modelo. Esses dados são suportados pela revelação de que os fatores de variação acima descritos não alteravam os níveis da enzima MPO nesse mesmo feixe, mesmo que utilizando uma sensível metodologia para tal finalidade.

Apesar das secções transversais do feixe profundo anterior do músculo masseter, corados em HE, não apresentarem diferenças quantitativas das fibras, foram vistos fascículos isolados, com a grande maioria das fibras de contorno angulado e núcleos localizados na porção central, ou em deslocamento, se comparados ao grupo controle (GI) nos grupos submetidos à alteração oclusal e ao estresse crônico variado (GII, GIII e GIV).

A ultraestrutura das fibras musculares confirmou o efeito das variáveis: estresse e exodontia, quando demonstrou, nos grupos experimentais, mitocôndrias intumescidas, assim como descontinuidade de membrana mitocondrial no grupo com alteração oclusal apenas (GII), perda da membrana do retículo sarcoplasmático no grupo com estresse crônico variado isolado (GIII) e no grupo com alteração oclusal associada ao estresse crônico variado (GIV), além das áreas de continuidade entre as miofibrilas observadas. Mitocôndrias intumescidas com perda de cristas e redução na densidade da matriz, além de uma diminuição Na^+ - K^+ ATPase e Ca^{2+} -ATPase, evidenciadas nos músculos mastigatórios, em situações de estresse prolongado foram correlacionadas por Chen *et al* 2010, com uma diminuição na glicólise aeróbica e hipóxia, ou isquemia dos músculos, com consequente aumento no metabolismo anaeróbico (Chen *et al.*, 2010)

As mitocôndrias desempenham um papel importante na produção de energia através da geração de ATP, modulando sinais intracelulares (Isaeva and Shirokova, 2003). O retículo sarcoplasmático absorve, armazena e libera íons cálcio (Gunter *et al.*, 1998). A ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático transfere Ca^{2+} do citoplasma da célula para o lúmen do retículo sarcoplasmático (Toyoshima, 2009). É conhecido também que a ATPase de Ca^{2+} da membrana plasmática é uma proteína que serve para remover Ca^{2+} das células, regulando assim sua quantidade dentro da mesma.

Um aumento nos níveis de íons cálcio no músculo masseter superficial e profundo, ipsilateral ao desgaste oclusal unilateral em ratos, com intumescimento mitocondrial e áreas com fibras mostrando sinais de degeneração tecidual após 14 dias da indução da maloclusão foi descrito por Bani e colaboradores, em 1999, (Bani *et al.*, 1999). Diante do exposto, as características ultraestruturais das mitocôndrias intumescidas, a presença de retículo sarcoplasmático com a membrana rompida e o desarranjo das miofibrilas nos

grupos experimentais indicam alteração no metabolismo, liberação descontrolada de cálcio e consequente contração causada por esse excesso de cálcio.

Derivados do oxigênio com instabilidade e alta reatividade, incluindo superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila (OH^-) são genericamente chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (Mccord and Fridovich, 1978). A presença das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada em cortes histológicos obtidos a partir do feixe anterior do músculo masseter profundo esquerdo.

No grupo submetido à alteração oclusal isolada (GII), diminuiu a quantidade de ROS. Wei *et al* 2011, afirmaram que quando produzidas em baixa quantidade, as ROS desempenham um papel na regulação da expressão gênica sensível à óxido redução, afetando a via sinalizadora e mantendo a função de contração. Em condição de exercício prolongado e fadiga muscular, a produção de ROS é aumentada, o que resulta em dano. Fato que contribui para o declínio da função muscular, assim como da resistência à carga mecânica e desordens musculares esqueléticas (Wei *et al.*, 2011).

Sriram e colaboradores, em 2011, descreveram baixos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes com sarcopenia tratados com miostatina, um medicamento pró-oxidante, que sinaliza a formação de ROS (Sriram *et al.*, 2011). A sarcopenia é, por sua vez, a perda de massa e força na musculatura esquelética (Wakabayashi and Sakuma, 2013). Portanto, a diminuição de ROS, devido à exodontia, pode interferir nas condições fisiológicas do músculo, já que a ROS é um importante regulador molecular da via sinalizadora e da manutenção da contração muscular. No entanto, o estresse isolado ou associado à exodontia, nas condições experimentais propostas, não afetaram o estresse oxidativo do músculo.

A análise qualitativa do endotélio capilar, imunomarcado pela laminina, mostrou no grupo com exodontia isolada (GII), com estresse variado isolado (GIII) e associado à alteração oclusal (GIV), uma variação no contorno dos capilares, sendo uns com lúmen dilatado e outros com lúmen contraído. As lamininas são glicoproteínas importantes e biologicamente ativas da lâmina basal. Constituem o arcabouço estrutural nos tecidos do organismo. Elas são secretadas e incorporadas às células da matriz extracelular e agem também influenciando a diferenciação celular (Timpl *et al.*, 1979).

Os capilares dilatados do grupo com estresse crônico isolado ou associado à alteração oclusal (GIII e GIV) estão em concordância com os achados de Chen *et al* 2010, além disso, capilares com a redução do lúmen consistiu uma observação qualitativamente importante. O estresse vem acompanhado da estimulação do Sistema Nervoso Simpático (Callister *et al.*, 1992), cuja ação altera o fluxo sanguíneo e a contração muscular (Jänig, 1985). Esse aumento da tonicidade muscular ocorre por ativação da placa motora, em decorrência da estimulação aumentada do sistema simpático (Roatta *et al.*, 2009). Hidaka *et al* 2004 relataram que o estresse mental afeta a eletromiografia do músculo temporal, mas pouco do músculo masseter (Hidaka, O. *et al.*, 2004). Neste mesmo ano, observou-se que um estressor leve, mas duradouro, aumenta a atividade do sistema nervoso simpático (Hidaka, O *et al.*, 2004), cujo sistema é um poderoso vasoconstritor da região facial (Roatta *et al.*, 2009).

Tanosoto *et al* 2012, sugeriram que em estresse de forte impacto, o equilíbrio entre a atividade simpática e parassimpática pode ser alterado (Tanosoto *et al.*, 2012). A atividade simpática, pela ativação dos receptores alpha 1 adrenérgicos causam vasoconstrição (Leech and Faber, 1996) enquanto em receptores beta 2 adrenérgicos, causam vasodilatação (Hillman and Lundvall, 1981). Esses fatores foram associados por Hidaka e colaboradores em 2004, como responsáveis pelas diferenças regionais observadas.

A diferença no lúmen dos capilares, observada neste trabalho, pode ser associada ao efeito da complexa atividade simpática indireta nos músculos. Egginton e Hudlická em 2000, afirmam que em condições de estresse, os capilares presentes podem atuar de forma mais ativa, removendo metabólitos em detrimento ao fornecimento de suplementos (Egginton and Hudlická, 2000). Há relatos também de que a compressão de vasos sanguíneos, causada pela contração da musculatura, pode resultar em liberação de fatores metabólicos e miogênicos locais favorecendo a vasodilatação (Hillman and Lundvall, 1981). A presença do estresse ativa a eNOS nas arteríolas causando dilatação, e essa dilatação reduz a reperfusão (Bagi *et al.*, 2005). Esses dados contribuem para a compreensão da presença de capilares dilatados intercalados com capilares contraídos, em secções transversais de músculos masseter de grupos submetidos à exodontia isolada ou associada ao estresse. Nossa hipótese é que áreas contraídas do músculo modificam a força

hemodinâmica, que, possivelmente, aumenta a tensão que pode levar, por sua vez, à vasodilatação dos capilares, em determinadas regiões musculares.

Neste sentido, em 2005, Bagi *et al.*, descreveram uma molécula de adesão plaquetária de células endoteliais (PECAM 1) ou Alpha CD31, a qual detecta gradientes de tensão da parede vascular, com alta afinidade pelo óxido nítrico (NO) – um importante mediador da vasodilatação (Bagi *et al.*, 2005). Os resultados de vasos imunomarcados por meio da reação anti-alpha CD31, para os grupos experimentais propostos neste trabalho, mostraram tendência ao aumento no número de capilares. No feixe anterior profundo do músculo masseter, Hidaka *et al.* 2004, afirmaram que a vasodilatação e a vasoconstrição são fundamentos fisiológicos no ajuste do metabolismo dos tecidos, e que os distúrbios no volume de sangue intramuscular contribuem para dor (Hidaka, O *et al.*, 2004).

A observação feita, em que o lúmen dos capilares aparece contraído, apesar da presença de capilares com lúmen dilatado, pode ser responsável pelas alterações morfológicas regionais das fibras musculares por hipóxia, em locais de capilares contraídos. As condições hemodinâmicas dos diferentes feixes do músculo masseter requerem mais estudos, visando compreender melhor a sua relação com a dor miofascial e com a DTM, frente ao estresse variado e à alteração oclusal.

Há relatos de que para se adaptar às diferentes cargas funcionais, as fibras do músculo esquelético, podem alterar sua isoforma de miosina (MyHC) bem como a área de seção transversal (Vreeke *et al.* 2007). Em nosso estudo, o feixe anterior do músculo masseter profundo, de animais submetidos ou não à alteração oclusal e ao estresse, não permitiram verificar essa alteração quanto ao tipo de miosina, visto que esta miosina tipo I é pouco expressa no masseter e não apresentou alteração.

O músculo masseter profundo é caracterizado por uma preponderância de fibras tipo IIb sobre as do tipo IIa (Fukai, 1996; Sano *et al.*, 2007). A distribuição dos tipos de fibras musculares na porção anterior do músculo masseter profundo é estável e, fibras imaturas não foram observadas (Nishide *et al.*, 2001a). As propriedades fisiológicas motoras das fibras musculares estão associadas com a isoforma de miosina e são classificadas como quanto ao tipo de contração em: lenta (I), rápidas resistentes à fadiga (IIa) e rápidas não resistentes à fadiga (IIb).

As proteínas da miosina são fatores que determinam a velocidade de contração e a geração de força máxima da musculatura. Em geral, atividade muscular reduzida induz a transição para fibras de contração mais rápidas e uma diminuição da área de seção transversal de fibras (Vreeke *et al.*, 2011). Desta forma, outros estudos serão necessários, usando anticorpos para miosina tipo IIa e IIb, visando investigar os efeitos da exodontia e do estresse, isolados ou associados, em músculo masseter

A atividade de succinato desidrogenase (SDH) mede a capacidade oxidativa da fibra muscular (Jonkers *et al.*, 2012). A distribuição da atividade, por SDH, na região médio posterior, do músculo masseter profundo, revelou fibras musculares em três intensidades de coloração azul (claras, intermediárias e escuras), sendo consideradas as mais escuras as com maior atividade metabólica (oxidativa). Analisando todos os tipos de fibras musculares juntas, demonstradas pela reação de SDH, grupo a grupo, essa região do músculo revelou um predomínio de fibras claras, caracterizando ser um músculo com alta atividade glicolítica e baixa atividade oxidativa, visto que as fibras escuras representaram as de menor área relativa.

A literatura afirma que uma menor demanda metabólica no músculo em indivíduos com paraplegia, por exemplo, resulta em uma diminuição significativa na capacidade oxidativa da fibra muscular e é acompanhada de alterações nos padrões de atividade SDH (Jonkers *et al.*, 2012). Para Deveci e Egginton as áreas relativas aos diferentes tipos de fibras no músculo tibial anterior, não foram alteradas pela aclimatização ao frio, apesar do frio ter induzido a hipertrofia das fibras em ratos, após 08 semanas de experimento. Esses autores sugeriram uma alteração adaptativa na massa muscular que está intimamente regulada para preservar a composição original do músculo (Deveci and Egginton, 2002). Em condição de estresse isolado ou associado à exodontia, houve pouca evidência de transformação nos tipos de fibras. Alguns fatores sugeridos para essa resposta pode ser a orientação das fibras da região médio posterior do músculo masseter analisada, cujas funções não foram afetadas pelas condições experimentais propostas ou também pelo tempo experimental induzido. Tendo em vista que o músculo masseter é complexo, e constituído por vários feixes, outros estudos envolvendo a atividade metabólica de cada feixe são sugeridos.

7 Conclusão

1 No feixe superficial do músculo masseter, a alteração oclusal por exodontia e o estresse crônico variado, isolados ou associados:

- Não promoveram a infiltração de polimorfonucleares analisados por meio da Mieloperoxidase (MPO);
- Não alteraram os níveis das metaloproteinases (MMP2) avaliados por meio da atividade Gelatinolítica Total (GT);

2 No feixe anterior do músculo masseter profundo, a alteração oclusal por exodontia e o estresse crônico variado, isolados ou associados:

- Revelaram alterações regionais no músculo; a partir das características histológicas das fibras, coradas por HE,
- Alteraram a ultraestrutura dos retículos sarcoplasmáticos, mitocôndrias e miofibrilas;
- Modificaram os lúmens dos capilares, ora reduzidos ora dilatados, imunomarcados com anti-laminina;
- Demonstraram uma tendência ao aumento da densidade de capilares, evidenciado pela reação imunistoquímica anti-alpha CD31 do endotélio;
- Não alteraram as escassas miosinas do tipo I, marcadas pelo anticorpo para cadeia pesada da miosina para fibras lentas;
- Diminuíram os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS/ EROS) no grupo exposto à exodontia, isoladamente (GII), mas não alteraram no grupo de animais expostos ao estresse crônico variado, isolado ou associado à exodontia (GIII e GIV);

3 No feixe médio posterior do músculo masseter profundo, a exodontia e o estresse crônico variado, isolados ou associados:

- Não alteraram a atividade metabólica das fibras musculares demonstradas por meio da reação histoquímica de Succinato desidrogenase (SDH) e confirma a prevalência de fibras claras;

Podemos concluir que a exodontia e o estresse crônico variado, isolados ou associados induzem alterações regionais no músculo masseter. As alterações morfológicas, ultraestruturais, hemodinâmicas e estresse oxidativo, em regiões do feixe profundo anterior sugerem que um desequilíbrio hemodinâmico poder ter levado à isquemia, que altera a morfologia e a ultraestrutura. Esses dados contribuem para a compreensão do desenvolvimento dos chamados pontos de gatilho. No entanto, novos estudos serão necessários para melhor entendimento da etiopatogenia da dor miofascial e da DTM.

Referências

REFERENCE LIST

ABE, S. et al. Histological study of the healing process of the attachment site of rat masseter muscle following injury. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 39, n. 3, p. 217-20, Aug 1998. ISSN 0040-8891. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927908 >.

ABED, G. S. et al. Maturation and functional related differences in rat craniofacial growth. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 11, p. 1018-25, Nov 2007. ISSN 0003-9969. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643386> >.

AFANAS'EV, I. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2011, p. 293769, 2011. ISSN 1942-0994. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912722> >.

AKAGAWA, Y.; NIKAI, H.; TSURU, H. Histologic changes in rat masticatory muscles subsequent to experimental increase of the occlusal vertical dimension. **J Prosthet Dent**, v. 50, n. 5, p. 725-32, Nov 1983. ISSN 0022-3913. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6580441> >.

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Impaired calcium release during fatigue. **J Appl Physiol**, v. 104, n. 1, p. 296-305, Jan 2008. ISSN 8750-7587. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962573> >.

ALLEN, D. G.; WESTERBLAD, H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. **J Physiol**, v. 536, n. Pt 3, p. 657-65, Nov 2001. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691862> >.

ALONSO-BLANCO, C. et al. Characteristics of referred muscle pain to the head from active trigger points in women with myofascial temporomandibular pain and fibromyalgia syndrome. **J Headache Pain**, v. 13, n. 8, p. 625-37, Nov 2012. ISSN 1129-2377. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935970> >.

ALVAREZ, D. J.; ROCKWELL, P. G. Trigger points: diagnosis and management. **Am Fam Physician**, v. 65, n. 4, p. 653-60, Feb 2002. ISSN 0002-838X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871683> >.

ANTONOVA, I. Changes in the masticatory muscles, periodontal tissues, and the pharyngeal ring in Wistar rats in chronic psychophysical stress. **Neurosci Behav Physiol**, v. 38, n. 9, p. 891-6, Nov 2008. ISSN 0097-0549. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18975112 >.

ARAI, C. et al. Effects of bite-opening and cyclosporin A on the mRNA levels of myosin heavy chain and the muscle mass in rat masseter. **Jpn J Physiol**, v. 55, n. 3, p. 173-9, Jun 2005. ISSN 0021-521X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080800> >.

BADEL, T. et al. Temporomandibular disorders and occlusion. **Acta Clin Croat**, v. 51, n. 3, p. 419-24, Sep 2012. ISSN 0353-9466. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339268> >.

BAGI, Z. et al. PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 8, p. 1590-5, Aug 2005. ISSN 1524-4636. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890968> >.

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**, v. 78, n. 11, p. 1735-44, Nov 1999. ISSN 0022-0345. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576170> >.

BANI, D.; BERGAMINI, M. Dantrolene counteracts the masseter muscle damage induced by artificial occlusal wear: studies in a rat model. **J Dent Res**, v. 80, n. 11, p. 1990-4, Nov 2001. ISSN 0022-0345. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759008> >.

_____. Ultrastructural abnormalities of muscle spindles in the rat masseter muscle with malocclusion-induced damage. **Histol Histopathol**, v. 17, n. 1, p. 45-54, Jan 2002. ISSN 0213-3911. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11813885 >.

BASMAJIAN, J. V.; GOPAL, D. N.; GHISTA, D. N. Electrodiagnostic model for motor unit action potential (MUAP) generation. **Am J Phys Med**, v. 64, n. 6, p. 279-94, Dec 1985. ISSN 0002-9491. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4083335> >.

BAZAN, E. et al. Ultrastructural and biochemical changes of the medial pterygoid muscle induced by unilateral exodontia. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 536-43, Jul 2008. ISSN 0968-4328. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17826114 >.

BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J**, v. 4, n. 2, p. 148-60, Feb 1990. ISSN 0892-6638. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404817> >.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993. ISSN 1045-4411. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8435466> >.

BONCOMPAGNI, S. Severe muscle atrophy due to spinal cord injury can be reversed in complete absence of peripheral nerves. 2012.

BOVE, M. et al. Psychosocial factors and metabolic parameters: is there any association in elderly people? The Massa Lombarda Project. **Aging Ment Health**, v. 14, n. 7, p. 801-6, Sep 2010. ISSN 1364-6915. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20635238 >.

BOZEMAN, P. M.; LEARN, D. B.; THOMAS, E. L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **J Immunol Methods**, v. 126, n. 1, p. 125-33, Jan 1990. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154520> >.

BRANDLEY, B. K.; SCHNAAR, R. L. Phosphorylation of extracellular carbohydrates by intact cells. Chicken hepatocytes specifically adhere to and phosphorylate immobilized N-acetylglucosamine. **J Biol Chem**, v. 260, n. 23, p. 12474-83, Oct 1985. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4044599> >.

CALLISTER, R.; SUWARNO, N. O.; SEALS, D. R. Sympathetic activity is influenced by task difficulty and stress perception during mental challenge in humans. **J Physiol**, v. 454, p. 373-87, Aug 1992. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474496> >.

CAO, Y. et al. Experimental occlusal interference induces long-term masticatory muscle hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 144, n. 3, p. 287-93, Aug 2009. ISSN 1872-6623. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19473767> >.

CARVALHO, A.; CURY, A.; GARCIA, R. Prevalence of bruxism and emotional stress and the association between them in Brazilian police officers. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 1, p. 31-5, 2008 Jan-Mar 2008. ISSN 1807-3107. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18425242 >.

CHEN, H. F.; SU, H. M. Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 1, p. 70-80, Jan 2013. ISSN 1873-4847. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818715> >.

CHEN, J. W. et al. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain**, v. 131, n. Pt 4, p. 1123-33, Apr 2008. ISSN 1460-2156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234693> >.

CHEN, Y. J. et al. Psychological stress alters ultrastructure and energy metabolism of masticatory muscle in rats. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 302693, 2010. ISSN 1110-7243.

CHRISTENSEN, L. V.; RASSOULI, N. M. Experimental occlusal interferences. Part II. Masseteric EMG responses to an intercusp interference. **J Oral Rehabil**, v. 22, n. 7, p. 521-31, Jul 1995. ISSN 0305-182X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562218> >.

CICILIOT, S. et al. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2191-9, Oct 2013. ISSN 1878-5875. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702032> >.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn**, v. 218, n. 2, p. 213-34, Jun 2000. ISSN 1058-8388. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842354> >.

COONS, A. H.; KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **J Exp Med**, v. 91, n. 1, p. 1-13, Jan 1950. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15395569> >.

CUCCIA, A.; CARADONNA, C. The relationship between the stomatognathic system and body posture. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 1, p. 61-6, 2009. ISSN 1980-5322. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142553> >.

DALWADI, D. A.; UHT, R. M. Hypothalamic and amygdalar cell lines differ markedly in mitochondrial rather than nuclear encoded gene expression. **BMC Genomics**, v. 14, p. 413, 2013. ISSN 1471-2164. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800343> >.

DAVIDSON, B. et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. **Gynecol Oncol**, v. 72, n. 3, p. 380-6, Mar 1999. ISSN 0090-8258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10053110> >.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr**, v. 48, n. 1, p. 8-19, Jan 2011. ISSN 1880-5086. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297906> >.

- DAVIES, M. J. et al. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 7, p. 1199-234, Jul 2008. ISSN 1557-7716. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331199> >.
- DENG, W.; LEAPER, K.; BOWNES, M. A targeted gene silencing technique shows that Drosophila myosin VI is required for egg chamber and imaginal disc morphogenesis. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 21), p. 3677-90, Nov 1999. ISSN 0021-9533. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523504> >.
- DEVECI, D.; EGGINTON, S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters. **J Exp Biol**, v. 205, n. Pt 6, p. 829-40, Mar 2002. ISSN 0022-0949. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11914391> >.
- DIAS, F. J. et al. Effects of low-level laser irradiation in ultrastructural morphology, and immunoeexpression of VEGF and VEGFR-2 of rat masseter muscle. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 237-44, Feb 2012. ISSN 1878-4291. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924919> >.
- DISATIAN, S. et al. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. **J Heart Valve Dis**, v. 17, n. 4, p. 402-11; discussion 412, Jul 2008. ISSN 0966-8519. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18751470> >.
- DOLLERY, C. M. et al. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury. **Circulation**, v. 99, n. 24, p. 3199-205, Jun 1999. ISSN 1524-4539. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377085> >.
- DOMMERHOLT, J., BRON, CAREL , FRANSSSEN JO. Myofascial trigger points: An evidence-informed review. v. 14, p. 203-221, 2006.
- DUCLOS, M. et al. Fat distribution in obese women is associated with subtle alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and sensitivity to glucocorticoids. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 55, n. 4, p. 447-54, Oct 2001. ISSN 0300-0664. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11678826> >.
- EGGINTON, S.; HUDLICKÁ, O. Selective long-term electrical stimulation of fast glycolytic fibres increases capillary supply but not oxidative enzyme activity in rat skeletal muscles. **Exp Physiol**, v. 85, n. 5, p. 567-73, Sep 2000. ISSN 0958-0670. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038408> >.
- FARQUHARSON, C.; ROBINS, S. P. The distribution of elastin in developing and adult rat organs using immunocytochemical techniques. **J Anat**, v. 165, p. 225-36, Aug 1989. ISSN 0021-8782. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103617> >.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, A. M. et al. Muscle trigger points, pressure pain threshold, and cervical range of motion in patients with high level of disability related to acute whiplash injury. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 42, n. 7, p. 634-41, Jul 2012. ISSN 1938-1344. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677576> >.
- FISCHER, C. et al. Cell stress molecules in the skeletal muscle of GNE myopathy. **BMC Neurol**, v. 13, p. 24, 2013. ISSN 1471-2377. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23496965> >.
- FRYER, M. W. et al. Effects of creatine phosphate and P(i) on Ca²⁺ movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. **J Physiol**, v. 482 (Pt 1), p. 123-40, Jan 1995. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730977> >.

FUKAI, M. Effect of increasing the vertical dimension of occlusion in growing rats on masticatory muscles and cranio-facial morphology. **Journal of Osaka Odontological Society**, v. 59, p. 15, 1996.

GAMARO, G. D. et al. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochem Int**, v. 42, n. 2, p. 107-14, Jan 2003. ISSN 0197-0186. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421590> >.

GERLACH, R. F. et al. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. **Anal Biochem**, v. 344, n. 1, p. 147-9, Sep 2005. ISSN 0003-2697. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950912> >.

GITLIN, D.; HITZIG, W. H.; JANEWAY, C. A. Multiple serum protein deficiencies in congenital and acquired agammaglobulinemia. **J Clin Invest**, v. 35, n. 11, p. 1199-204, Nov 1956. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13376712> >.

GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. **J Exp Med**, v. 122, n. 3, p. 467-81, Sep 1965. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4953873> >.

GOMEZ, F. M. et al. Effects of dopaminergic drugs, occlusal disharmonies, and chronic stress on non-functional masticatory activity in the rat, assessed by incisal attrition. **J Dent Res**, v. 77, n. 6, p. 1454-64, Jun 1998. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

GOTTFRIED, E. et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 5, p. 453-63, May 2008. ISSN 1365-3083. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405323> >.

GRIVENNIKOVA, V. G.; KAREYEVA, A. V.; VINOGRADOV, A. D. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 939-44, 2010 Jun-Jul 2010. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170624> >.

GUNTER, T. E. et al. The interaction of mitochondria with pulses of calcium. **Biofactors**, v. 8, n. 3-4, p. 205-7, 1998. ISSN 0951-6433. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914820> >.

HADDAD, D. S.; BRIOSCHI, M. L.; ARITA, E. S. Thermographic and clinical correlation of myofascial trigger points in the masticatory muscles. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 41, n. 8, p. 621-9, Dec 2012. ISSN 0250-832X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166359> >.

HAYASHIDA, M.; MAITA, T.; MATSUDA, G. The primary structure of skeletal muscle myosin heavy chain: I. Sequence of the amino-terminal 23 kDa fragment. **J Biochem**, v. 110, n. 1, p. 54-9, Jul 1991. ISSN 0021-924X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939027> >.

HIDAKA, O.; YANAGI, M.; TAKADA, K. Changes in masseteric hemodynamics time-related to mental stress. **J Dent Res**, v. 83, n. 2, p. 185-90, Feb 2004. ISSN 0022-0345. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742661> >.

_____. Mental stress-induced physiological changes in the human masseter muscle. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 227-31, Mar 2004. ISSN 0022-0345. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14981124 >.

HILLMAN, J.; LUNDVALL, J. Classification of beta-adrenoceptors in the microcirculation of skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v. 113, n. 1, p. 67-71, Sep 1981. ISSN 0001-6772. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6274164> >.

HOWARD, E. W. et al. MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 13, p. 1542-53, Aug 2012. ISSN 1090-2422. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449415> >.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat Embryol (Berl)**, v. 200, n. 1, p. 1-18, Jul 1999. ISSN 0340-2061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395001> >.

IMAUCHI, Y.; SAKAMOTO, T.; ABE, K. A case of atrophy of the masticatory muscles due to a masticatory habit. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 259, n. 10, p. 551-3, Nov 2002. ISSN 0937-4477. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434192> >.

ISAEVA, E. V.; SHIROKOVA, N. Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. **J Physiol**, v. 547, n. Pt 2, p. 453-62, Mar 2003. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12562922> >.

IYOMASA, D. M. et al. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. **Micron**, v. 40, n. 4, p. 413-8, Jun 2009. ISSN 1878-4291. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269186> >.

IYOMASA, M. et al. Effect of unilateral extraction of molar teeth on suprahyoid muscles: macroscopic and ultrastructural aspects. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1111-8, Dec 2008. ISSN 0968-4328. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18693023 >.

JACOBELLI, J. et al. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. **Nat Immunol**, v. 5, n. 5, p. 531-8, May 2004. ISSN 1529-2908. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064761> >.

JONKERS, R. A. et al. Myofibrillar distribution of succinate dehydrogenase activity and lipid stores differs in skeletal muscle tissue of paraplegic subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 3, p. E365-73, Feb 2012. ISSN 1522-1555. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068603> >.

JUBANY-MARÍ, T.; MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. **Plant Physiol Biochem**, v. 48, n. 5, p. 351-8, May 2010. ISSN 1873-2690. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199867> >.

JÄNIG, W. Organization of the lumbar sympathetic outflow to skeletal muscle and skin of the cat hindlimb and tail. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 102, p. 119-213, 1985. ISSN 0303-4240. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898312> >.

KANEKO, T. et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in recovery after tubular damage in acute kidney injury in mice. **Nephron Exp Nephrol**, v. 122, n. 1-2, p. 23-35, 2012. ISSN 1660-2129. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23548779> >.

KAWASAKI, K.; SAEKI, Y.; OHNUKI, Y. Effect of an increase in occlusal vertical dimension on the rate of cyclic actin-myosin interaction in guinea-pig masseter muscle. **Arch Oral Biol**, v. 42, n. 7, p. 505-12, Jul 1997. ISSN 0003-9969. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9296270> >.

KIRVESKARI, P.; JÄMSÄ, T. Health risk from occlusal interferences in females. **Eur J Orthod**, v. 31, n. 5, p. 490-5, Oct 2009. ISSN 1460-2210. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19477972 >.

KOSSIONI, A. E.; DONTAS, A. S. The stomatognathic system in the elderly. Useful information for the medical practitioner. **Clin Interv Aging**, v. 2, n. 4, p. 591-7, 2007. ISSN 1176-9092. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18225459> >.

LAHIRI, D. K.; MALONEY, B. Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of APP, and its clinical implications. **Exp Neurol**, v. 225, n. 1, p. 51-4, Sep 2010. ISSN 1090-2430. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451519> >.

LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. **J Physiol**, Nov 2010. ISSN 1469-7793. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041533> >.

LARSSON, L. et al. Effects of age on physiological, immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor units in the rat. **J Physiol**, v. 443, p. 257-75, Nov 1991. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1668338> >.

LEE, T. K. et al. High cortisol responses identify propensity for obesity that is linked to thermogenesis in skeletal muscle. **FASEB J**, Sep 2013. ISSN 1530-6860. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022403> >.

LEECH, C. J.; FABER, J. E. Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. **Am J Physiol**, v. 270, n. 2 Pt 2, p. H710-22, Feb 1996. ISSN 0002-9513. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779849> >.

LEON, J. S. et al. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5643-9, Sep 2001. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500440> >.

LINNANE, L.; SERRANO, A. L.; RIVERO, J. L. Distribution of fast myosin heavy chain-based muscle fibres in the gluteus medius of untrained horses: mismatch between antigenic and ATPase determinants. **J Anat**, v. 194 (Pt 3), p. 363-72, Apr 1999. ISSN 0021-8782. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386774> >.

LISBOA, M. V. et al. Assessment of the effect of the use of laser light or dantrolene on facial muscle under occlusal wear: a Raman spectroscopic study in a rodent model. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S135-41, Aug 2010. ISSN 1557-8550. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20666575> >.

LIVINGSTONE, D. E. et al. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 560-3, Feb 2000. ISSN 0013-7227. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650936> >.

LUIN, E.; GINIATULLIN, R.; SCIANCALEPORE, M. Effects of H₂O₂ on electrical membrane properties of skeletal myotubes. **Free Radic Biol Med**, Nov 2010. ISSN 1873-4596. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109001> >.

MAEDA, N. et al. Effects of easily chewable diet and unilateral extraction of upper molars on the masseter muscle in developing mice. **Acta Anat (Basel)**, v. 137, n. 1, p. 19-24, 1990. ISSN 0001-5180. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2305625 >.

MAEKAWA, K. et al. Effect of intravenous infusion of a beta-adrenergic blocking agent on the haemodynamic changes in human masseter muscle induced by cold-pressor stimulation. **Arch Oral Biol**, v. 44, n. 6, p. 475-83, Jun 1999. ISSN 0003-9969. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401525> >.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychol Rev**, v. 105, n. 1, p. 83-107, Jan 1998. ISSN 0033-295X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450372> >.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. ISSN 0001-3765. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605681> >.

MANKTELOW, R. T. et al. Smile reconstruction in adults with free muscle transfer innervated by the masseter motor nerve: effectiveness and cerebral adaptation. **Plast Reconstr Surg**, v. 118, n. 4, p. 885-99, Sep 2006. ISSN 1529-4242. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980848> >.

MARCACCINI, A. M. et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. **Clin Chim Acta**, v. 409, n. 1-2, p. 117-22, Nov 2009. ISSN 1873-3492. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751716> >.

MAXWELL, L. C. et al. Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length, with or without surgical detachment. **Anat Rec**, v. 200, n. 2, p. 127-37, Jun 1981. ISSN 0003-276X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6455941> >.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The biology and pathology of oxygen radicals. **Ann Intern Med**, v. 89, n. 1, p. 122-7, Jul 1978. ISSN 0003-4819. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/208444> >.

MCCORMICK, M. L.; GAVRILA, D.; WEINTRAUB, N. L. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 3, p. 461-9, Mar 2007. ISSN 1524-4636. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218601> >.

MCGINLEY, C.; SHAFAT, A.; DONNELLY, A. E. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? **Sports Med**, v. 39, n. 12, p. 1011-32, 2009. ISSN 0112-1642. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19902983> >.

MCPARTLAND, J. M. Travell trigger points--molecular and osteopathic perspectives. **J Am Osteopath Assoc**, v. 104, n. 6, p. 244-9, Jun 2004. ISSN 0098-6151. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233331> >.

MEI, Y. Y.; LI, J. S. Involvements of stress hormones in the restraint-induced conditioned place preference. **Behav Brain Res**, Sep 2013. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055356> >.

MELO, A. et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2011, p. 467180, 2011. ISSN 1942-0994. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22191013> >.

MICHELOTTI, A.; IODICE, G. The role of orthodontics in temporomandibular disorders. **J Oral Rehabil**, v. 37, n. 6, p. 411-29, May 2010. ISSN 1365-2842. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406353> >.

MIEHE, B. et al. Masticatory musculature under altered occlusal relationships--a model study with experimental animals. **Ann Anat**, v. 181, n. 1, p. 37-40, Jan 1999. ISSN 0940-9602. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10081556 >.

MILAEVA, E. R. Metal-based antioxidants--potential therapeutic candidates for prevention the oxidative stress-related carcinogenesis: mini-review. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 21, p. 2703-13, 2011. ISSN 1873-4294. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039870> >.

MULLER, J. et al. Bilateral effect of a unilateral occlusal splint on the expression of myosin heavy-chain isoforms in rat deep masseter muscle. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 12, p. 1017-24, Dec 2000. ISSN 0003-9969. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084140> >.

MURUA VS, M. V. Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. **Behav Neural Biol.**, v. 57, n. 1, p. 87-9, 1992.

NAGASE, H.; VISSÉ, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 2006. ISSN 0008-6363. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877> >.

NEWMAN, P. J. et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. **Science**, v. 247, n. 4947, p. 1219-22, Mar 1990. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1690453> >.

NISHIDA, S. et al. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. **J Bone Miner Metab**, v. 17, n. 3, p. 171-7, 1999. ISSN 0914-8779. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757676> >.

NISHIDE, N. Metabolic changes of masseter muscle in experimental unilateral bite-raised rat determined by 31P MRS. **Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine**, v. 106, p. 511, 1997.

NISHIDE, N. et al. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. **J Oral Rehabil**, v. 28, n. 3, p. 294-8, Mar 2001a. ISSN 0305-182X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350580> >.

_____. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. **J Oral Rehabil**, v. 28, n. 3, p. 294-8, Mar 2001b. ISSN 0305-182X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350580> >.

OCKLEFORD, C. et al. Micro-trabeculae, macro-plaques or mini-basement membranes in human term fetal membranes? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 342, n. 1300, p. 121-36, Oct 1993. ISSN 0962-8436. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7904354> >.

_____. Confocal and conventional immunofluorescence and ultrastructural localisation of intracellular strength-giving components of human amniochorion. **J Anat**, v. 183 (Pt 3), p. 483-505, Dec 1993. ISSN 0021-8782. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507914> >.

OHNUKI, Y. et al. Effects of increased occlusal vertical dimension on daily activity and myosin heavy chain composition in rat jaw muscle. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 8, p. 783-9, Aug 2009. ISSN 1879-1506. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524215> >.

ORAL, K. et al. Etiology of temporomandibular disorder pain. **Agri**, v. 21, n. 3, p. 89-94, Jul 2009. ISSN 1300-0012. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779999> >.

PANCHENKO, M. V. et al. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 12, p. 7113-9, Mar 1996. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636146> >.

PAULSEN, G. et al. Inflammatory markers CD11b, CD16, CD66b, CD68, myeloperoxidase and neutrophil elastase in eccentric exercised human skeletal muscles. **Histochem Cell Biol**, v. 139, n. 5, p. 691-715, May 2013. ISSN 1432-119X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224298> >.

PEREIRA, L. J. et al. Masticatory function in subacute TMD patients before and after treatment. **J Oral Rehabil**, v. 36, n. 6, p. 391-402, Jun 2009. ISSN 1365-2842. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210681> >.

POOLE, D. C. et al. Skeletal muscle capillary function: contemporary observations and novel hypotheses. **Exp Physiol**, Aug 2013. ISSN 1469-445X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995101> >.

RAO, S.; GLAROS, A. Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals. **J Dent Res**, v. 58, n. 9, p. 1872-8, Sep 1979. ISSN 0022-0345. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=290652 >.

REID, M. B. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 169-79, Jan 2008. ISSN 0891-5849. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191753> >.

RHEE, H. S.; HOH, J. F. Immunohistochemical analysis of myosin heavy chain expression in laryngeal muscles of the rabbit, cat, and baboon. **J Histochem Cytochem**, v. 56, n. 10, p. 929-50, Oct 2008. ISSN 0022-1554. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606609> >.

ROATTA, S.; MOHAMMED, M.; PASSATORE, M. Acute stress reduces blood flow in the orofacial area, in conscious rabbits. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 4, p. 380-8, Apr 2009. ISSN 1879-1506. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232570> >.

SABEH, F. et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **J Cell Biol**, v. 167, n. 4, p. 769-81, Nov 2004. ISSN 0021-9525. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557125> >.

SAKALIHASAN, N. et al. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. **J Vasc Surg**, v. 24, n. 1, p. 127-33, Jul 1996. ISSN 0741-5214. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691515> >.

SANCHEZ, P. et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 34, p. 12561-6, Aug 2004. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314219> >.

SANO, R. et al. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. **J Anat**, v. 211, n. 4, p. 464-70, Oct 2007. ISSN 0021-8782. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692082> >.

SATO, I. et al. Distribution of LYVE-1 and CD31 in postnatal rat masseter muscle. **Ann Anat**, v. 190, n. 4, p. 329-38, 2008. ISSN 0940-9602. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599277> >.

SAWOSZ, F. et al. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of silver nanoparticles and ATP on expression of chosen genes involved in myogenesis. **Arch Anim Nutr**, Aug 2013. ISSN 1745-039X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23952606> >.

SAXENA, T. et al. Raman spectroscopic investigation of spinal cord injury in a rat model. **J Biomed Opt**, v. 16, n. 2, p. 027003, Feb 2011. ISSN 1560-2281. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21361706> >.

SCHMIDT, J.; CARLSON, C. A controlled comparison of emotional reactivity and physiological response in masticatory muscle pain patients. **J Orofac Pain**, v. 23, n. 3, p. 230-42, 2009. ISSN 1064-6655. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19639103 >.

SCHWEINHARDT, P.; SAURO, K.; BUSHNELL, M. Fibromyalgia: a disorder of the brain? **Neuroscientist**, v. 14, n. 5, p. 415-21, Oct 2008. ISSN 1073-8584. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18270311 >.

SCIOTE, J. J. et al. Masseter function and skeletal malocclusion. **Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale**, v. 114, n. 2, p. 79-85, Apr 2013. ISSN 2213-6541. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23838245> >.

SEROT, J. M. et al. Antibodies to choroid plexus in senile dementia of Alzheimer's type. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 9, p. 781-3, Sep 1992. ISSN 0021-9746. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401207> >.

SHAZEEB, M. S. et al. A novel paramagnetic substrate for detecting myeloperoxidase activity in vivo. **Mol Imaging**, v. 11, n. 5, p. 433-43, 2012 Sep-Oct 2012. ISSN 1536-0121. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954188> >.

SHIAU, Y. Y.; CHEN, K. C. The activity of jaw elevator muscles during peanut chewing in patients with temporomandibular joint and muscle pain dysfunction syndrome. **Proc Natl Sci Coun Repub China B**, v. 10, n. 1, p. 57-63, Jan 1986. ISSN 0255-6596. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3714906> >.

SIMONS, D. G. New views of myofascial trigger points: etiology and diagnosis. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 89, n. 1, p. 157-9, Jan 2008. ISSN 1532-821X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164347> >.

SIMONS DG, T. J., SIMONS L. **Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual** 1999.

SKITSTONE, L. K. et al. Matrix metalloproteinase-2 expression and promoter/enhancer activity in skeletal muscle atrophy. **J Orthop Res**, v. 26, n. 3, p. 357-63, Mar 2008. ISSN 1554-527X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960656> >.

SMERDU, V. et al. Type Iix myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 267, n. 6 Pt 1, p. C1723-8, Dec 1994. ISSN 0002-9513. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545970> >.

SONNESEN, L.; SVENSSON, P. Temporomandibular disorders and psychological status in adult patients with a deep bite. **Eur J Orthod**, v. 30, n. 6, p. 621-9, Dec 2008. ISSN 1460-2210. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684706> >.

_____. Assessment of pain sensitivity in patients with deep bite and sex- and age-matched controls. **J Orofac Pain**, v. 25, n. 1, p. 15-24, 2011. ISSN 1064-6655. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359233> >.

SOUZA-TARLA, C. D. et al. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. **Clin Biochem**, v. 38, n. 5, p. 410-4, May 2005. ISSN 0009-9120. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820769> >.

SRIRAM, S. et al. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 931-48, Dec 2011. ISSN 1474-9726. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771249> >.

STEDMAN, H. H. et al. Myosin gene mutation correlates with anatomical changes in the human lineage. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 415-8, Mar 2004. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15042088> >.

TANOSOTO, T. et al. A Paced Auditory Serial Addition Task evokes stress and differential effects on masseter-muscle activity and haemodynamics. **Eur J Oral Sci**, v. 120, n. 4, p. 363-7, Aug 2012. ISSN 1600-0722. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22813228> >.

TECCO, S. et al. The prognosis of myofascial pain syndrome (MPS) during a fixed orthodontic treatment. **Cranio**, v. 30, n. 1, p. 52-71, Jan 2012. ISSN 0886-9634. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435177> >.

THAL, D. R.; HORN, M.; SCHLOTE, W. Selective quantitative analysis of the intensity of immunohistochemical reactions. **Acta Histochem**, v. 97, n. 2, p. 203-11, Apr 1995. ISSN 0065-1281. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660737> >.

TIMPL, R. et al. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **J Biol Chem**, v. 254, n. 19, p. 9933-7, Oct 1979. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/114518> >.

TIPPETT, H. L. et al. Indices of extracellular matrix turnover in human masseter muscles as markers of craniofacial form--a preliminary study. **Eur J Orthod**, v. 30, n. 2, p. 217-25, Apr 2008. ISSN 0141-5387. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18263891> >.

TOYOSHIMA, C. How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 6, p. 941-6, Jun 2009. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010358> >.

TUMOLVA, L.; PARK, J. Y.; PARK, K. Combination of transmission electron and atomic force microscopy techniques to determine volume equivalent diameter of submicrometer particles. **Microsc Res Tech**, v. 75, n. 4, p. 505-12, Apr 2012. ISSN 1097-0029. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21919129> >.

UHAC, I. et al. The influence of war stress on the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders. **J Oral Rehabil**, v. 30, n. 2, p. 211-7, Feb 2003. ISSN 0305-182X. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12535150 >.

VAN DALEN, C. J. et al. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. **Biochem J**, v. 327 (Pt 2), p. 487-92, Oct 1997. ISSN 0264-6021. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9359420> >.

VEDOLIN, G. M. et al. The impact of stress and anxiety on the pressure pain threshold of myofascial pain patients. **J Oral Rehabil**, v. 36, n. 5, p. 313-21, May 2009. ISSN 1365-2842. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210679> >.

VREEKE, M. et al. The masticatory system under varying functional load. Part 1: Structural adaptation of rabbit jaw muscles to reduced masticatory load. **Eur J Orthod**, v. 33, n. 4, p. 359-64, Aug 2011. ISSN 1460-2210. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923937> >.

WAKABAYASHI, H.; SAKUMA, K. Comprehensive Approach to Sarcopenia Treatment. **Curr Clin Pharmacol**, Nov 2013. ISSN 2212-3938. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24219006> >.

WEI, L. et al. Mitochondrial superoxide flashes: metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. **FASEB J**, v. 25, n. 9, p. 3068-78, Sep 2011. ISSN 1530-6860. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646399> >.

WEISS, S. J.; LOBUGLIO, A. F. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab Invest**, v. 47, n. 1, p. 5-18, Jul 1982. ISSN 0023-6837. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283263> >.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005. ISSN 0302-282X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037678> >.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 28, p. 3262-88, 2010. ISSN 1875-533X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20666718> >.

YEH, C. M.; GLÖCK, M.; RYU, S. An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval zebrafish. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79406, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24223943> >.

YIN, Y. et al. Expression of laminin chains by central neurons: analysis with gene and protein trapping techniques. **Genesis**, v. 36, n. 2, p. 114-27, Jun 2003. ISSN 1526-954X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820173> >.

ZHANG, P. et al. [Comparison of doxycycline, losartan, and their combination on the expression of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, and collagen remodeling in the noninfarcted myocardium after acute myocardial infarction in rats]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 27, n. 1, p. 53-61, Feb 2005. ISSN 1000-503X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15782494> >.

Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.130.53.5), intitulado "Efeitos do Estresse Agudo e Crônico no Músculo Masseter em Hipofunção Mastigatória", de autoria de **Mamie Mizusaki Iyomasa**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.130.53.5), entitled: "Efeitos do Estresse Agudo e Crônico no Músculo Masseter em Hipofunção Mastigatória", by **Mamie Mizusaki Iyomasa**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2011.


Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi


Secretária da CEUA
Marja Angélica Depiro