

CEZAR AUGUSTO SOUZA CASARIN

***AVALIAÇÃO MUSCULOESQUELÉTICA DE RATOS
SUBMETIDOS À ALTERAÇÃO OCLUSAL***

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Anatomia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria

PIRACICABA
2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C263a Casarin, Cezar Augusto Souza.
Avaliação musculoesquelética de ratos submetidos à alteração oclusal.
/ Cezar Augusto Souza Casarin. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Paulo Henrique Ferreira Caria.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba.

1. Oclusão dentária. 2. Mandíbula. 3. Músculo masseter. 4. Músculo
temporal. 5. Densitometria. I. Caria, Paulo Henrique Ferreira. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation musculoskeletal of rats submitted at occlusal alteration

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental occlusion. 2. Mandible. 3. Masseter muscle. 4.
Masseter temporal. 5. Densitometry

Área de Concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Paulo Henrique Ferreira Caria, Andréa Beatriz Bonsi, Horácio Faig Leite,
Francisco Carlos Groppo, Eduardo Dias Andrade

Data da Defesa: 19-02-2009

Programa de Pós-Graduação em 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 19 de Fevereiro de 2009, considerou o candidato CEZAR AUGUSTO SOUZA CASARIN aprovado.

Handwritten signature of Paulo Henrique Ferreira Caria in blue ink.

PROF. DR. PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

Handwritten signature of Andréa Beatriz Bonisi in blue ink.

PROFa. DRa. ANDRÉA BEATRIZ BONSI

Handwritten signature of Horácio Faig Leite in blue ink.

PROF. DR. HORACIO FAIG LEITE

Handwritten signature of Francisco Carlos Groppo in blue ink.

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

Handwritten signature of Eduardo Dias de Andrade in blue ink.

PROF. DR. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

Dedico este trabalho aos meus pais Cezar e Ana, por sempre acreditarem em mim.

A minha irmã Ana Paula e meu cunhado Mario, por sempre estar presente nos momentos necessários.

A minha namorada Juliana, sempre me apoiando e me dando forças para continuar.

Obrigado, Amo vocês !

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Especialmente a Deus por mais uma conquista em minha vida e por sempre abençoar o meu caminho, concedendo-me força para continuar sempre lutando em busca dos meus sonhos.

Ao Prof^o. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, pela contribuição direta nesse imenso passo em minha vida profissional, por ter confiado em mim e me ensinado a conciliar os momentos de austeridade e ternura, fatores primordiais na realização de um trabalho científico, tornando-se não só o meu mestre, mas sim um amigo, que me compreendeu, me estimulou e me enriqueceu com sua presença, seu saber e sua honestidade.

Meu eterno agradecimento.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof^o. Dr. Francisco Haiter Neto, onde tive a oportunidade de dar um importante rumo ao crescimento científico e profissional.

Aos Professores Dr. Francisco Haiter Neto, Dr. Francisco Carlos Groppo, Dr. Ricardo Della Coletta, Dr. Sergio Roberto Peres Line, Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Dra Ana Paula de Souza Pardo e a Dra. Cláudia Herrera Tambeli, por prestarem preciosas informações e tornarem possível a realização desta pesquisa.

Aos Professores Ms. Gerson Santos Leite e Ms. Mateus Elias Pacheco, pelo total apoio na fase experimental e na análise dos dados.

As alunas Juliana Bittar, Maria Caldas da Radiologia e Luana da Fisiologia, por prestarem auxílio e informações imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao amigo Sidney Figueroba, pela contribuição e apoio na utilização dos mesmo animais.

As secretárias do Departamento de Morfologia, Joelma, Suzete e Eliete do Departamento de Fisiologia e a técnica de laboratório Eliene pelo total empenho pela realização desse trabalho.

Aos companheiros de pós-graduação e funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho.

E a todos os parentes, amigos e outros que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

Paulo Coelho

RESUMO

A má-oclusão é a alteração da posição dos dentes e do formato de arcadas que afeta a estrutura musculoesquelética do sistema mastigatório de indivíduos acometidos por essa condição. O objetivo deste estudo foi analisar as alterações morfofuncionais da mandíbula e de dois mm. mastigatórios de 48 ratos (*Novergicus Wistar*), divididos em três grupos de 16 animais, grupo 1: submetidos ao aumento bilateral da dimensão vertical oclusal, grupo 2: submetidos ao deslocamento retrusivo da mandíbula e grupo 3: controle. Foram realizadas à análise morfométrica da densidade óssea do processo alveolar, do ramo e base da mandíbula e a análise histoquímica (NADH-tr) dos músculos masseter e temporal, ambas com o auxílio do *software* (ImageJ). A análise densitométrica apresentou perda óssea somente na base da mandíbula no grupo 1 ($0,454 \pm 0,020$) enquanto no grupo 2 ($0,482 \pm 0,025$) e nas demais regiões, houve o aumento do conteúdo ósseo. Os resultados histoquímicos apresentaram as fibras glicolíticas rápidas (FG) ($1,06E+06 \pm 2,53E+05$) com maior área que as fibras oxidativas-glicolíticas rápidas (FOG) ($6,86E+05 \pm 1,50E+05$), enquanto as oxidativas lentas (SO) ($5,50E+05 \pm 1,40E+05$) foram menores que as demais. Entre todas as fibras analisadas o grupo 2 ($8,89E+05 \pm 2,56E+05$) apresentou maior área que os grupos 1 ($6,89E+05 \pm 1,18E+05$) e controle ($7,20E+05 \pm 1,69E+05$). As fibras do m. temporal ($8,54E+05 \pm 2,11E+05$) apresentaram maior área que as do m. masseter ($6,78E+05 \pm 1,51E+05$). Houve predomínio de fibras FG (22 ± 4) em relação as fibras FOG (13 ± 3) e SO (15 ± 4) em todos os grupos e músculos avaliados. O m. temporal apresentou mais SO ($15 \pm 3,9$) que FOG (12 ± 3), e o m. masseter apresentou números equivalentes destas fibras. As alterações oclusais provocam modificações morfológicas no tecido ósseo da mandíbula e dos mm. mastigatórios.

Palavras Chave: Oclusão dentária, mandíbula, músculo masseter, músculo temporal, densitometria óssea.

ABSTRACT

The malocclusion is an alteration of dental position and the shape of the arches that affects the musculoskeletal structures of the masticatory system of individuals affected by this condition. The objective of this study was analysis the morphofunctional alterations of mandible and two masticatory muscles. Forty eight male rats Novergicus Wistar divided into three groups of 16 animals, group 1: submitted to bilateral increased occlusal vertical dimension, group 2, submitted to posterior displacement of the mandible and group 3: control. The morphometric analyze of bone density of the alveolar process, ramus and base of mandible and the fibres modifications by histochemistry (NADH-tr) of the masseter and temporal muscles, were effected by the ImageJ software. The densitometric analysis presented bone loss only in the base of the mandible in group 1 ($0,454 \pm 0,020$) and increase in the bone content of mandible in group 2 ($1,06E+06 \pm 2,53+05$) and other regions. The histochemical results showed the fast glycolytic fibers (FG) ($1,06E+06 \pm 2,53+05$), area larger than fast glycolytic-oxidative fibers (FOG) ($6,86E+05 \pm 1,50E+05$),, while the slow oxidative (SO) ($5,50E+05 \pm 1,40E+05$) was lower than the others. Among all fibers analyzed, the group 2 ($8,89E+05 \pm 2,56E+05$) showed largest area than groups 1 ($6,89E+05 \pm 1,18E+05$) and control ($7,20E+05 \pm 1,69E+05$). The fibers of temporal muscle ($8,54E+05 \pm 2,11E+05$) presented largest area than the masseter muscle ($6,78E+05 \pm 1,51E+05$). There was predominance of FG fibers (22 ± 4) in relation the FOG (13 ± 3) and SO fibers (15 ± 4), to other in all groups and muscles studied. The temporal muscle presented numerically more SO ($15 \pm 3,9$) than FOG (12 ± 3), and masseter muscle showed equal numbers of these fibers. The occlusal alterations provoked morphological changes in bone tissue of mandible and masticatory muscles.

Key words: Dental Occlusion, mandible, masseter muscle, temporal muscle, densitometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1	04
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXO I	32
ANEXO II	33

INTRODUÇÃO

Na última década, as alterações oclusais têm ocupado um lugar de destaque na sociedade como um fator de risco a saúde dos indivíduos biologicamente suscetíveis, devido os malefícios que podem provocar no sistema mastigatório, pois atingem um percentual significativo da população influenciando negativamente na qualidade de vida de seus portadores ^{1,2,34}.

Mesmo não sendo considerada uma doença, as alterações oclusais estão relacionadas diretamente a dor e ao desconforto muscular capazes de provocar desequilíbrio orgânico, social e psicológico no indivíduo acometido, tornando-se um problema de saúde pública presente que atinge toda a população ^{3,35}. Fatores como alterações posturais, parafunções, aspectos psicológicos e alterações proprioceptivas, entre outros, são definidos como os principais responsáveis por essas condições ².

O termo oclusão dentária é definido como uma relação estática de contato entre os dentes antagonistas ³⁶. Oclusão fisiológica tem sido definida como aquela na qual o conjunto de forças que atuam sobre os dentes está em estado de equilíbrio, conservando o estado de saúde e função normal entre dentes e estruturas de suporte do sistema mastigatório ³⁷.

A má-oclusão é resultado de movimentos mastigatórios irregulares, pois a eficiência mastigatória é definida como a realização adequada de ciclos mastigatórios, que resulta na harmonia funcional das estruturas que compõem o sistema mastigatório ³⁸.

Dentes e tecidos acessórios associados à articulação temporomandibular e aos músculos mastigadores colaboram interdependentemente para o equilíbrio do processo mastigatório ³⁹. Sendo que qualquer alteração ocorrida a uma dessas estruturas induz a transformações na morfologia musculoesquelética do sistema mastigatório ^{40,41}.

O osso é considerado um tecido extremamente ativo, pois sua atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação óssea ⁴², que é definida como um processo de aposição, onde ocorre remoção localizada do tecido ósseo envelhecido (reabsorção) e substituição por tecido recentemente formado ^{43,44}. Evento este, decorrente por toda a vida do indivíduo, responsável pela renovação do esqueleto e manutenção da integridade morfofuncional ^{43,46}.

Os músculos esqueléticos são incitadores da aposição óssea devido à tensão exercida pelos músculos sobre as regiões ósseas de inserção, o que também ocorre com os dentes que transmitem tensão para o tecido ósseo de seus alvéolos no processo mastigatório^{4,5,8,47}. Tal fato justifica que o estresse mecânico seja considerado um importante fator regulador e um determinante na morfologia óssea desde estágios primários^{48,49}.

Visto a importante relação do desempenho muscular com a morfologia óssea, o estresse tanto físico como emocional sofrido pelos músculos da mastigação, resulta em espasmos e fadiga muscular, o que pode provocar modificação em suas características morfofuncionais e facilitar o início de hábitos parafuncionais, principalmente quando associados a fatores oclusais^{50,51,52}.

Estudos realizados com alimentos de duas consistências, dura e macia, relataram que a alimentação de consistência dura provocou maior dificuldade mastigatória, devido ao maior esforço e tensão muscular em ratos submetidos à alteração oclusal, causando aumento da densidade óssea no ramo da mandíbula destes animais. Enquanto os animais que se nutriram da alimentação macia apresentaram diminuição dos valores de densidade óssea^{53,54}.

A análise morfofuncional dos músculos mastigadores e das estruturas ósseas em diferentes regiões da mandíbula foi realizada em animais submetidos ao aumento da dimensão vertical de oclusão com o uso de diferentes metodologias. Essa alteração causou hipofunção muscular, resultando em uma mastigação limitada e ineficiente, suficiente para provocar redução da composição óssea das áreas investigadas e modificação dos aspectos morfofuncionais dos músculos mastigatórios^{8,31,47}.

Os animais induzidos a alteração oclusal por meio do deslocamento posterior da mandíbula apresentaram influências negativas nas características estruturais da articulação temporomandibular, principalmente dos músculos mastigatórios, além de provocar alterações na morfologia do côndilo da mandíbula.^{10,30,55}

A diminuição atípica da atividade mastigatória habitual ou a execução precária e freqüente dos movimentos mandibulares resultam na redução da massa óssea da mandíbula e na disfunção dos músculos mastigatórios^{5,6}.

Tal aspecto pode colocar em risco a estrutura do tecido ósseo, podendo ocasionar patologias como osteopenia, osteoporose, periodontite, perda de dentes e desordem temporomandibular^{5,7,56,57}; além de atuar negativamente na atividade dos músculos elevadores da mandíbula, caracterizada principalmente por sintomas sensoriais e motores como fadiga, dor e desconforto destes músculos, freqüentemente associados à má-oclusão^{6,58}.

Diante da relação entre as más-oclusões com as modificações das estruturas mastigatórias, o presente estudo teve como objetivo analisar as alterações morfofuncionais da mandíbula e dos músculos mastigadores em ratos induzidos a alterações oclusais.

CAPÍTULO 1

Artigo enviado para o periódico *Brazilian Journal of Physical Therapy* (Anexo I).

Título:

AVALIAÇÃO MUSCULOESQUELÉTICA DE RATOS SUBMETIDOS À ALTERAÇÃO OCLUSAL

MUSCULOSKELETAL EVALUATION OF RATS SUBMITTED AT OCCLUSAL ALTERATION

Cezar Augusto Souza Casarin ¹, Paulo Henrique Ferreira Caria ¹, Sidney Raimundo Figueroa ².

¹ Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Endereço:

Cezar Augusto Souza Casarin

Rua Samuel Neves, 1724, Bairro Jardim Europa, Piracicaba – São Paulo, CEP: 13416-404

E-mail: cezarcasarin.x@gmail.com

Título reduzido:

AVALIAÇÃO MUSCULOESQUELÉTICA DE RATOS SUBMETIDOS À MÁ- OCLUSAL

MUSCULOSKELETAL EVALUATION OF RATS SUBMITTED AT MALOCCLUSION

Palavras Chave:

Oclusão dentária, mandíbula, músculo masseter, músculo temporal, densitometria.

Dental Occlusion, mandible, masseter muscle, temporal muscle, densitometry.

RESUMO

Contextualização: A má-oclusão é a alteração da posição dos dentes e do formato de arcadas que afeta a estrutura musculoesquelética do sistema mastigatório de indivíduos acometidos por essa condição. **Objetivo:** analisar as alterações morfofuncionais da mandíbula e de dois músculos mastigatórios. **Métodos:** Foram avaliados 48 ratos, divididos em três grupos de 16 animais, grupo 1: submetidos ao aumento bilateral da dimensão vertical oclusal, grupo 2: submetidos ao deslocamento retrusivo da mandíbula e grupo 3: controle. Foram realizadas à análise morfométrica da densidade óssea do processo alveolar, do ramo e base da mandíbula e a análise histoquímica (NADH-tr) dos músculos masseter e temporal, ambas com o auxílio do *software* (ImageJ). **Resultados:** A análise densitométrica apresentou perda óssea somente na base da mandíbula no grupo 1 ($0,454 \pm 0,020$) enquanto no grupo 2 ($0,482 \pm 0,025$) e nas demais regiões, houve o aumento do conteúdo ósseo. Os resultados histoquímicos apresentaram as fibras glicolíticas rápidas (FG) ($1,06E+06 \pm 2,53E+05$) com maior área que as fibras oxidativas-glicolíticas rápidas (FOG) ($6,86E+05 \pm 1,50E+05$), enquanto as oxidativas lentas (SO) ($5,50E+05 \pm 1,40E+05$) foram menores que as demais. Entre todas as fibras analisadas o grupo 2 ($8,89E+05 \pm 2,56E+05$) apresentou maior área que os grupos 1 ($6,89E+05 \pm 1,18E+05$) e controle ($7,20E+05 \pm 1,69E+05$). As fibras do m. temporal ($8,54E+05 \pm 2,11E+05$) apresentaram maior área que as do m. masseter ($6,78E+05 \pm 1,51E+05$). Houve predomínio de fibras FG (22 ± 4) em relação as fibras FOG (13 ± 3) e SO (15 ± 4) em todos os grupos e músculos avaliados. O m. temporal apresentou mais SO ($15 \pm 3,9$) que FOG (12 ± 3), e o m. masseter apresentou números equivalentes destas fibras. **Conclusões:** As alterações oclusais provocam modificações morfológicas no tecido ósseo da mandíbula e dos músculos mastigatórios.

ABSTRACT

Contextualization: The malocclusion is an alteration of dental position and the shape of the arches that affects the musculoskeletal structures of the masticatory system of individuals affected by this condition. **Objective:** Analysis the morphofunctional alterations of mandible and two masticatory muscles. **Methods:** Forty eight male rats Novergicus Wistar divided into three groups of 16 animals, group 1: submitted to bilateral increased occlusal vertical dimension, group 2, submitted to posterior displacement of the mandible and group 3: control. The morphometric analyze of bone density of the alveolar process, ramus and base of mandible and the fibres modifications by histochemistry (NADH-tr) of the masseter and temporal muscles, were effected by the ImageJ software. **Results:** The densitometric analysis presented bone loss only in the base of the mandible in group 1 ($0,454 \pm 0,020$) and increase in the bone content of mandible in group 2 ($1,06E+06 \pm 2,53+05$) and other regions. The histochemical results showed the fast glycolytic fibers (FG) ($1,06E+06 \pm 2,53+05$), area larger than fast glycolytic-oxidative fibers (FOG) ($6,86E+05 \pm 1,50E+05$),, while the slow oxidative (SO) ($5,50E+05 \pm 1,40E+05$) was lower than the others. Among all fibers analyzed, the group 2 ($8,89E+05 \pm 2,56E+05$) showed largest area than groups 1 ($6,89E+05 \pm 1,18E+05$) and control ($7,20E+05 \pm 1,69E+05$). The fibers of temporal muscle ($8,54E+05 \pm 2,11E+05$) presented largest area than the masseter muscle ($6,78E+05 \pm 1,51E+05$). There was predominance of FG fibers (22 ± 4) in relation the FOG (13 ± 3) and SO fibers (15 ± 4), to other in all groups and muscles studied. The temporal muscle presented numerically more SO ($15 \pm 3,9$) than FOG (12 ± 3), and masseter muscle showed equal numbers of these fibers. **Conclusion:** The occlusal alterations provoked morphological changes in bone tissue of mandible and masticatory muscles.

INTRODUÇÃO

A má-oclusão pode provocar diversas alterações nos componentes do sistema mastigatório e prejudicar a qualidade de vida dos afetados por essa condição ¹. A etiologia dessas alterações é variada e atua de maneira combinada nas estruturas do sistema mastigatório. Fatores como desordens posturais, parafunções, aspectos psicológicos, alterações proprioceptivas, entre outros, são definidos como os principais responsáveis por essas condições ².

Embora não seja considerada patologia, a má-oclusão aliada à dor e ao desconforto muscular é capaz de provocar desequilíbrio orgânico, social e psicológico nos indivíduos portadores dessa condição; tornando-se um problema de saúde pública que atinge toda a população ³.

As alterações oclusais são causadas pela desarmonia morfológica na posição dos dentes e no formato das arcadas dentárias. Na maioria das ocasiões, têm causas variadas e acometem o sistema mastigatório provocando sobrecarga nos elementos maxilo-mandibulares, gerando impacto sobre a estrutura, densidade e micro-arquitetura do tecido músculo-esquelético da mandíbula ⁴.

A diminuição anormal da atividade mastigatória habitual ou a execução precária e freqüente dos movimentos mandibulares resultam na redução da massa óssea da mandíbula e na disfunção dos músculos mastigatórios ^{5,6}.

Tal aspecto pode colocar em risco a estrutura do tecido ósseo, podendo ocasionar patologias como osteopenia, osteoporose, periodontite, perda de dentes e desordem temporomandibular ^{5,7}; além de atuar negativamente na atividade dos músculos elevadores da mandíbula, caracterizada principalmente por sintomas sensoriais e motores como fadiga, dor e desconforto destes músculos, freqüentemente associados à má-oclusão ⁸.

Diante da relação entre as más-oclusões e as modificações das estruturas mastigatórias, o presente estudo teve como objetivo analisar as alterações morfofuncionais da mandíbula e dos músculos mastigatórios em ratos induzidos a alterações oclusais.

MÉTODOS

Foram avaliados 48 ratos machos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com oito semanas de idade e cerca de 420 g de peso. Os animais foram mantidos em gaiolas

plásticas e permaneceram uma semana em adaptação ambiental antes do início do experimento. Foram alimentados com água e ração animal (*ad libitum*), triturada após o tratamento, sobre temperatura ambiente média de 23°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, com foto-período de doze horas claro/escuro. Este experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, com parecer de número 1216-1.

Os animais foram divididos em três grupos de 16 animais cada, onde os grupos 1 e 2 (experimentais) foram submetidos à alteração oclusal por dois métodos distintos, enquanto o grupo 3 (controle) não foi submetido à alteração oclusal.

Os animais do grupo 1 foram submetidos ao aumento bilateral da dimensão vertical de oclusão, por meio da fixação com resina de um fio ortodôntico de 0,9 mm de espessura na face oclusal dos molares inferiores (Figura 1) ⁴.

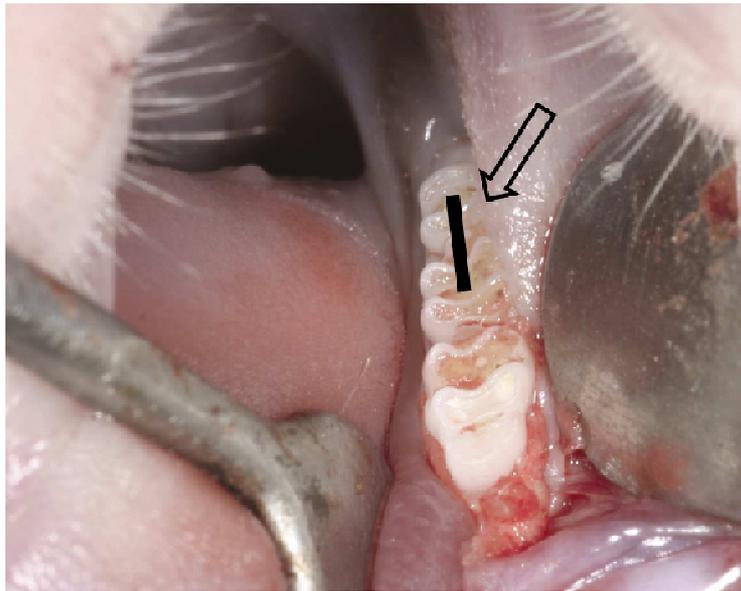


Figura 1: Fio ortodôntico fixado na face oclusal dos molares inferiores dos animais do grupo 1. Fonte: Bezerra BB, 2007 ⁹.

No grupo 2, foram submetidos ao deslocamento retrusivo da mandíbula, pela instalação de um dispositivo de 8 x 14 x 4 mm nos incisivos superiores, confeccionado com bandas ortodônticas fixadas com resina (Figura 2) ¹⁰.

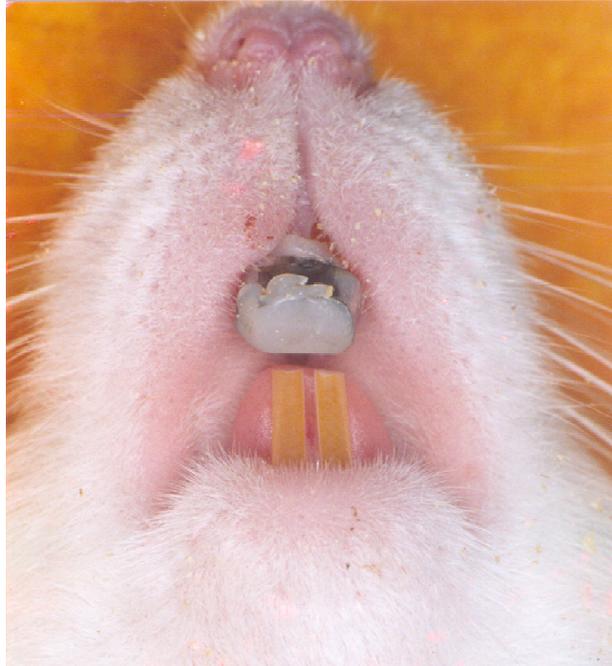


Figura 2: Banda ortodôntica instalada no incisivo superior dos animais do grupo 2.

Antes da instalação dos dispositivos oclusais, os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (3,75 ml / 100 mg/ml), Xilazina (0,5 ml / 100 mg/ml) e água destilada (5,75 ml), via intramuscular. Após quatorze dias da instalação dos métodos de alteração oclusal os animais foram pesados novamente e sacrificados por asfixia com gás carbônico. A hemimandíbula e amostras dos músculos masseter e temporal do lado esquerdo foram removidas para análise da densidade óssea e histoquímica ⁶. As análises morfométricas dos dados foram realizadas com o auxílio do *software* ImageJ / *Version v1,32j* (*National Institutes Health*[®] – NIH, EUA) ¹¹.

Nas hemimandíbulas foi realizada a avaliação da densidade óssea em radiografias padronizadas por meio do gerador de raios-X GE 1000[®] (*General Electric Co., Milwaukee, WI, EUA*), operado com 65 Kvp, 10 mA, 10 impulsos de exposição sobre placas de fósforo foto-estimuladas *Digora OpTime* (*Soredex Rion Corporation*[®], Helsinque, Finlândia). Foi utilizada uma escala de alumínio e um suporte de acrílico para cabeçotes direcionando os feixes de raios-X perpendiculares a placa, com a distância foco-placa de 40 cm durante todas as exposições. Todos os filmes foram processados usando o mesmo processador automático.

Após este procedimento, as radiografias foram digitalizadas sem qualquer manipulação do tempo de imagem, por meio de um *scanner Digora OpTime (Soredex Rion Corporation®*, Helsinque, Finlândia), com resolução de 360 dpi e 256 *pixels* (tonalidades de cinza) (8 bit). Os valores densitométricos foram obtidos pela média dos valores de cinza em *pixels*. As análises foram desenvolvidas em uma área quadrangular 0,7 x 0,7 mm, padrão para as três regiões da mandíbula: processo alveolar (próximo do incisivo inferior) (PA), ramo da mandíbula (R) e base da mandíbula (B) (Figura 3) ¹².



Figura 3: Vista lateral esquerda da mandíbula do rato com as respectivas áreas quadrangulares com 0,7 x 0,7 mm cada, selecionadas e analisadas pelo software ImageJ. Sendo PA: processo alveolar, B: base e R: ramo.

As amostras musculares foram submetidas à análise da atividade metabólica e contrátil pelo método histoquímico NADH-tr (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Tetrazolium Reductase*) ¹³.

As biopsias foram realizadas na porção superficial do m. masseter e na região posterior do m. temporal de forma idêntica para todos os animais, com o comprimento maior seguindo a disposição longitudinal das fibras. Após a remoção, os espécimes foram imediatamente congelados em anidrido carbônico a - 80°C e em seguida armazenadas em *biofreezer* a mesma temperatura ¹⁴.

Posteriormente os espécimes foram colocados em um micrótomo criostato CM 1100 (*Leica Microsystems*, Alemanha) a - 20°C e após trinta minutos de aclimatização, foram realizadas secções transversais com dez micrômetros (μm) de espessura ¹⁴.

Os cortes foram submetidos à ação enzimática (NADH-tr) para a identificação dos tipos de fibras em tons azulados. Quanto à capacidade oxidativa e de contrações lentas aeróbicas (*slow oxydative* – SO) com tom azul escuro, glicolíticas rápidas anaeróbicas (*fast glycolitic* – FG) com tom azul claro e oxidativas-glicolíticas rápidas e aeróbicas (*fast oxydative glycolitic* – FOG) com tom azul intermediário (Figura 4) ¹⁵.

Para cada músculo foram preparadas quatro lâminas contendo quatro cortes seriados cada ¹³. As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio Leica DMLP (*Leica Microsystems*[®], Alemanha) com aumento de 20x acoplado a uma câmera fotográfica digital DFC 280 (*Leica Microsystems*[®], Alemanha) e digitalizadas pelo *software* Image Manager - IM50 (*Leica Microsystems*[®], Alemanha).

Foram escolhidos para análise três cortes de cada músculo, um de cada lâmina de forma sequenciada. Foi determinada uma área padrão contendo aproximadamente 100 fibras musculares para identificação (Figura 4) e contagem das fibras musculares (Figura 5) ¹⁶. Cinco fibras de cada tipo foram selecionadas aleatoriamente para a mensuração da área (Figura 6) ⁶, que totalizou por grupo setecentos e vinte fibras medidas para cada músculo.

Para verificação da fidedignidade dos dados, todas as medidas foram realizadas três vezes pelo mesmo examinador com um intervalo de sete dias entre elas, sempre nas mesmas condições-ambiente, conforme a análise de confiabilidade intra-examinador por meio do cálculo do *intra class correlation coefficient* (ICC), com 97% para os grupos e 98% para regiões ósseas analisadas, com 97% para somatória de fibras e 96% para as medidas de área ¹⁷.

Para cada variável, os valores densitométricos médios transformados em milímetros de alumínio (*mmAl*) e os valores histoquímicos médios em micrômetros quadrados (μm^2), foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilks para verificação da normalidade desses dados e posteriormente submetidos à análise de variância *Two Way* ANOVA, para comparação dos grupos com o *post hoc* de Tukey para identificação das significâncias entre os grupos e variáveis, com nível de significância em 5%.

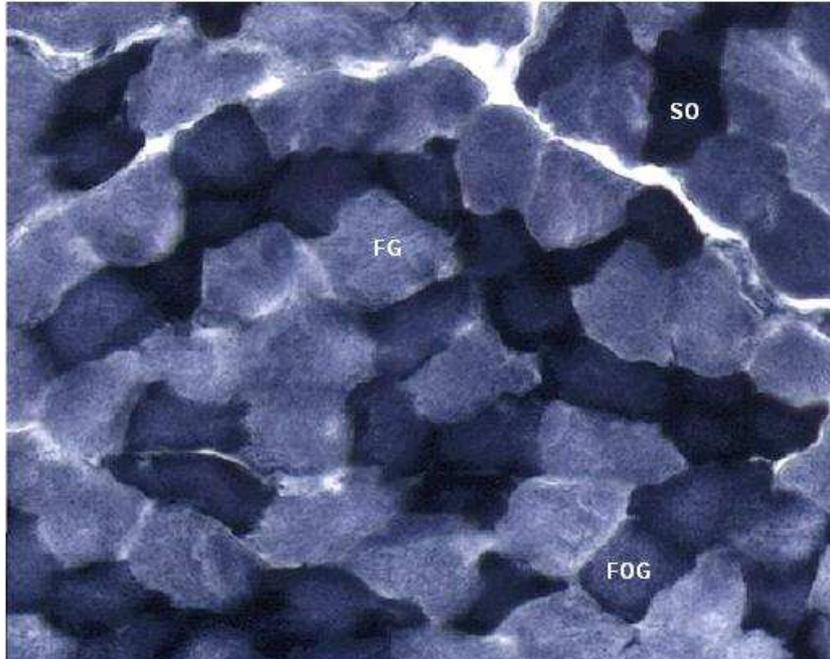


Figura 4: Área selecionada na amostra, com aumento de 20x. Para identificação dos tipos de fibras musculares, SO (azul escuro), FG (azul claro) e FOG (azul intermediário).

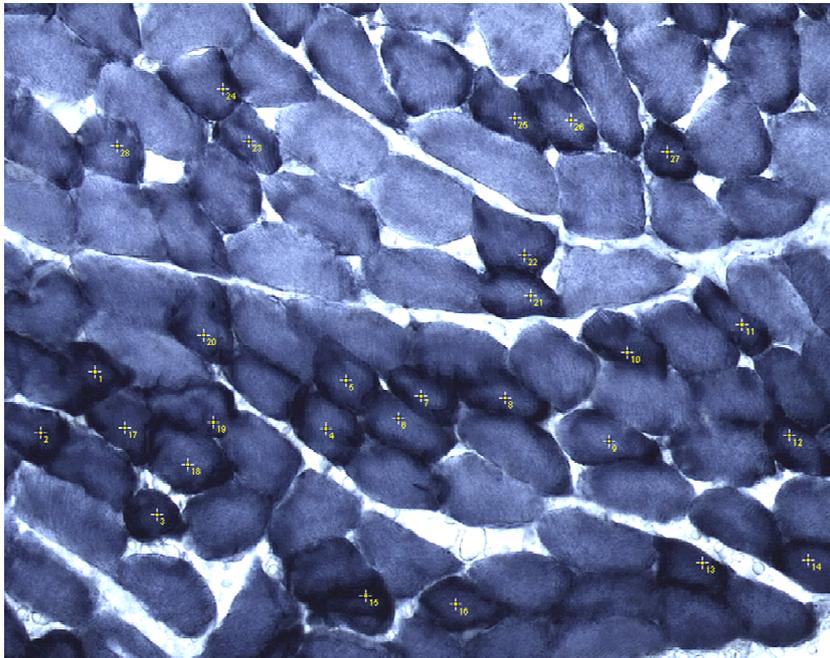


Figura 5: Área selecionada na amostra, com aumento de 20x. Para contagem dos diferentes tipos de fibras musculares, SO (azul escuro), FG (azul claro) e FOG (azul intermediário), com auxílio do *software* ImageJ.

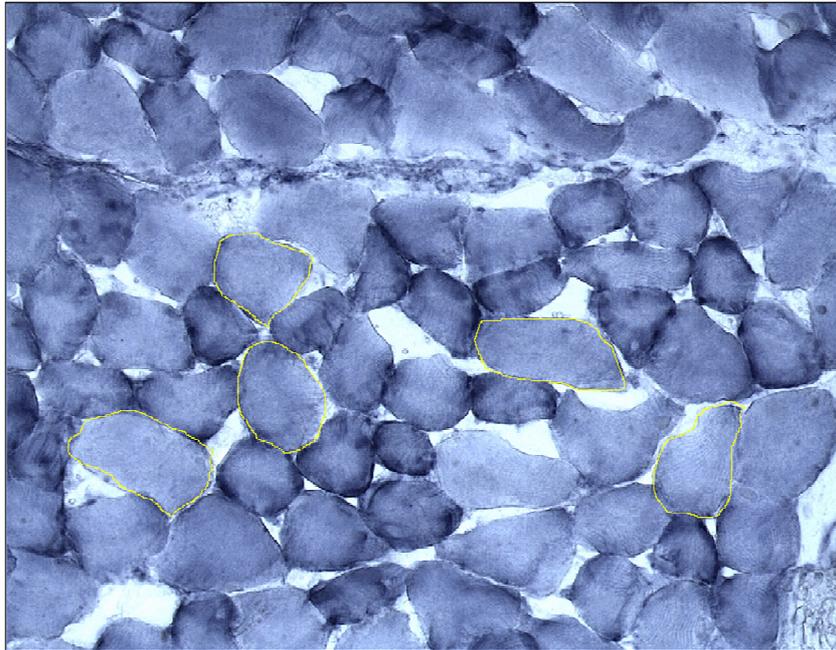


Figura 6: Área selecionada na amostra, com aumento de 20x. Para mensuração da área dos diferentes tipos de fibras (SO, FOG, FG) foram selecionadas cinco fibras de cada tipo, com auxílio do *software* ImageJ.

RESULTADOS

Houve redução do peso corporal médio dos animais submetidos à alteração oclusal durante o período de experimentação, foi constatada a redução de 13% no grupo 1 e 1% no grupo 2. Os animais do grupo controle não apresentaram redução, mas sim, aumento do peso corporal médio em 0,4%.

Os dados obtidos pela análise da densidade óssea radiográfica permitiram observar a diminuição desta na região da base do grupo 1 e o aumento no grupo 2 comparado ao grupo controle. No ramo da mandíbula e no processo alveolar a densidade aumentou no grupo 2 e no grupo 1 comparado ao grupo controle (Tabela 1).

A região do ramo apresentou menores índices de densidade óssea em todos os grupos comparados as demais regiões analisadas. A região do processo alveolar demonstrou maiores valores densitométricos que a base no grupo 1, enquanto que a região da base apresentou maiores valores que o processo alveolar nos grupos 2 e controle (Tabela 1).

O grupo controle e o grupo 1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$), mas mostraram valores de densidade óssea menores que o grupo 2 (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão entre os grupos e áreas da mandíbula, analisados em todas as situações propostas, para o parâmetro Densidade Óssea Radiográfica (mmAl).

Regiões	G1	G2	G3	Média
Base	0,454 ± 0,020	0,482 ± 0,025	0,458 ± 0,020	0,465 ± 0,022
Ramo	0,426 ± 0,023	0,441 ± 0,030	0,425 ± 0,021	0,431 ± 0,025
Processo Alveolar	0,457 ± 0,020	0,478 ± 0,020	0,456 ± 0,020	0,464 ± 0,020
Média	* 0,446 ± 0,020	0,467 ± 0,026	* 0,446 ± 0,021	

* Não diferem entre si pela ANOVA e teste *post hoc* de Fischer, $p > 0,05$.

Os dados obtidos pela análise histoquímica pelo método NADH-tr foram significativos entre si ($p < 0,05$), onde foi possível observar que a área das fibras do tipo FG foi maior que as demais em todos os grupos e músculos estudados, enquanto que as fibras SO foi menor e as do tipo FOG permaneceram intermediárias (Figura 6).

As fibras FG demonstraram maior área no m. temporal dos grupos 2, 1 e controle, respectivamente, enquanto que no m. masseter foram maiores no grupo 1 e controle com valores de área equivalentes e menores no grupo 2 (Figura 7).

A área das fibras SO foi maior no m. masseter que no m. temporal do grupo 1 respectivamente; resultado contrário ao encontrado no grupo 2 onde foi maior no m. temporal. No grupo controle não houve diferenças significativas dessa fibra no m. masseter com $p > 0,05$ (Figura 7).

As medidas da área das fibras FOG foram maiores no m. temporal do grupo 2, controle e grupo 1 respectivamente; no m. masseter foram maiores, no grupo 1, controle e grupo 2 (Figura 7).

O m. temporal apresentou maiores valores de área de todas as fibras comparadas com o m. masseter. A comparação da área das fibras do m. temporal entre os grupos foi maior no grupo 2, seguido do grupo 1 e controle, respectivamente. Entre os mm. masseteres os maiores valores de área foram no grupo controle, grupo 1 e grupo 2 com menor área (Figura 7).

O grupo 2 apresentou maior área de todas as fibras musculares identificadas, seguido do grupo controle e grupo 1 respectivamente. Exceto para as fibras do tipo FOG que demonstraram menor área no grupo controle em relação ao grupo 1 (Figura 7).

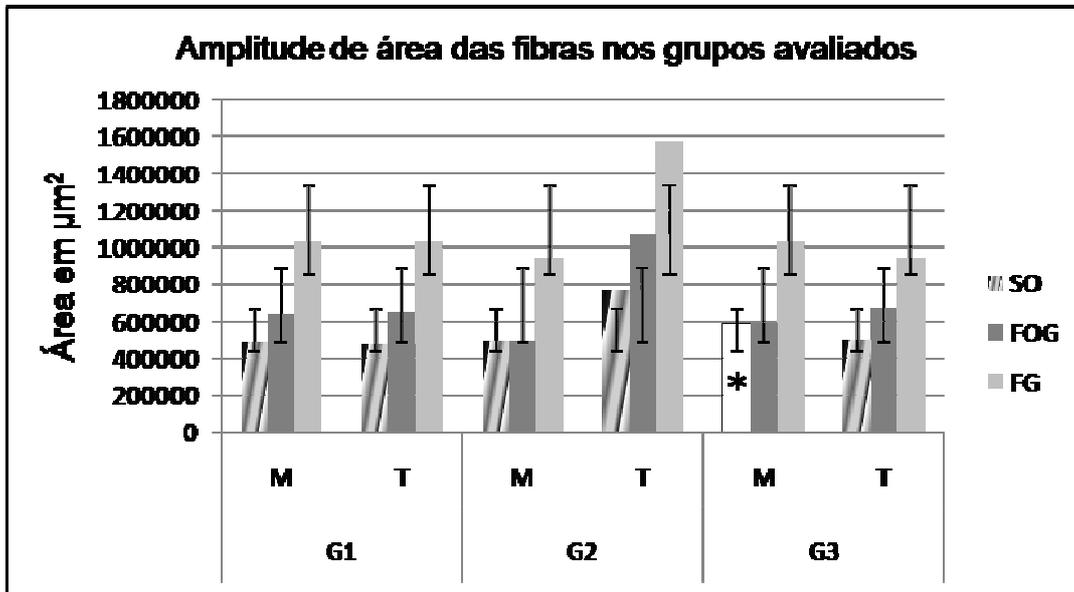


Figura 7: Valores médios e desvio padrão da área das fibras em μm^2 diferem entre sim com $p < 0,05$. *Não diferem entre si pela ANOVA e teste *post hoc* de Scheffé, $p > 0,05$. Sendo M: músculo masseter e T: músculo temporal.

Em relação à quantidade de fibras em cada músculo, as do tipo FG foram predominantes em todos os músculos e grupos avaliados, seguidas das fibras SO e FOG, em menor número (Figura 8).

As fibras do tipo SO se apresentaram em maior número no grupo 1 que nos grupos controle e grupo 2 respectivamente. As fibras FOG maioria também no grupo 1, com números semelhantes no grupo 2 e controle (Figura 8).

O m. masseter demonstrou maior concentração de fibras FG e FOG que o m. temporal, enquanto as fibras SO apresentaram números equivalentes em ambos os músculos (Figura 8).

As fibras FOG se registraram em menor quantia que as fibras SO no m. temporal; no m. masseter apresentaram-se em quantias similares (Figura 8).

O maior número de fibras FG foi encontrado nos mm. temporal e masseter do grupo 1, seguidas do m. masseter do grupo 2, masseter e temporal do grupo controle e m. temporal do grupo 2, respectivamente (Figura 8).

As fibras SO foram maioria nos mm. temporal e masseter do grupo 1, seguidas do masseter do grupo 2, temporal e masseter do grupo controle e temporal do grupo 2, em respectivo (Figura 8).

As fibras FOG foram predominantes nos mm. masseteres do grupo 1 e 2, seguidas das fibras dos músculos do grupo controle e menos predominantes nos temporais dos grupos 2 e 1, respectivamente (Figura 8).

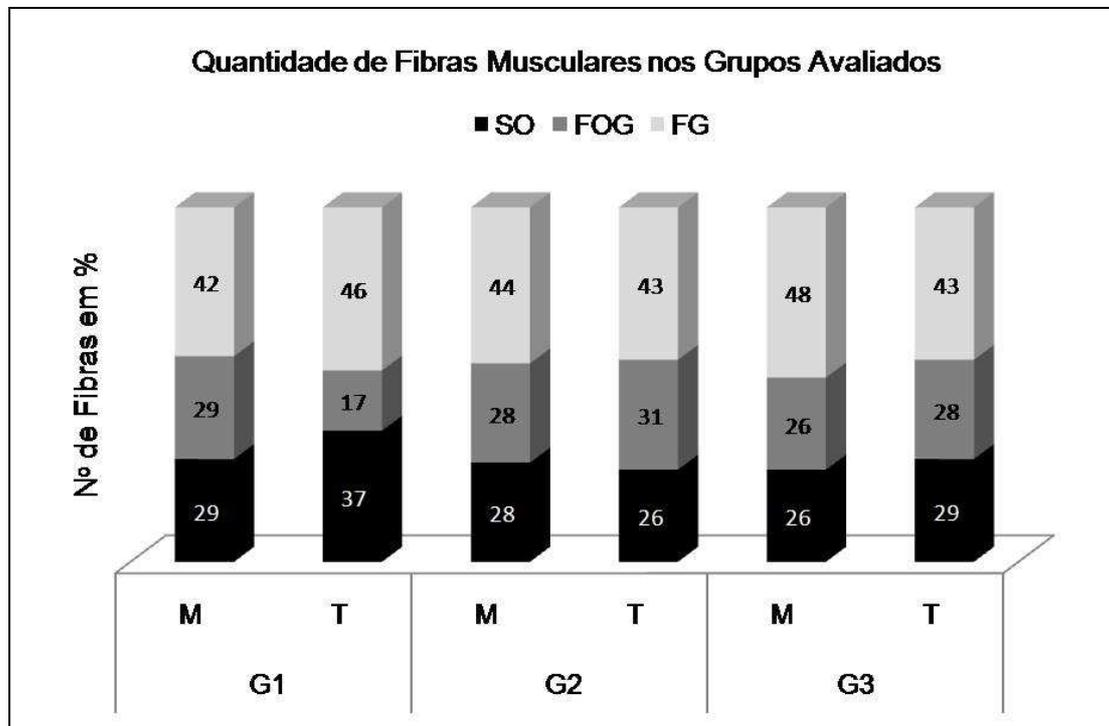


Figura 8: Percentual (%) de fibras musculares nos grupos avaliados, difere pela ANOVA e teste *post hoc* de Scheffé, $p < 0,05$. Sendo M: músculo masseter e T: músculo temporal.

DISCUSSÃO

A avaliação da densidade óssea mandibular, assim como a análise metabólica e funcional dos músculos elevadores da mandíbula são aspectos importantes para serem avaliados nas desordens oclusais e osteopenia, que podem levar a desenvolver fraturas, desgastes e/ou perda de dentes^{5,14}.

O modelo animal, o gênero e faixa etária selecionados para essa pesquisa foram definidos com o intuito de evitar a ação dos hormônios femininos, que segundo estudos precedentes, influenciam diretamente na perda óssea e na alteração funcional dos músculos da mastigação ⁷.

Uma diversidade de métodos e técnicas que analisam a densidade óssea pode ser encontrada na literatura, mas normalmente, devido ao baixo custo e a falta de recursos tecnológicos, a determinação da qualidade do material ósseo na região mandibular é baseada em diferenças radiográficas, por meio de análises comparativas de radiografias em série, com a utilização de lentes de aumento e escalas de medida. Tal procedimento manual apresenta limitações como a frequente discordância na interpretação radiográfica entre os avaliadores ou mesmo discrepâncias significativas na interpretação de um mesmo avaliador em tempos diferentes ¹⁸.

Essas interferências reduzem a capacidade de detecção de alterações ósseas, limitando a confiabilidade do experimento, além das doenças dos tecidos duros como a perda óssea, que progride lentamente, não podendo ser detectada quantitativamente com radiografias obtidas seqüencialmente ¹⁹.

A falta de acurácia dos métodos manuais torna os métodos computadorizados ferramentas indispensáveis para o diagnóstico de alterações na densidade óssea, por oferecerem maior confiabilidade ²⁰. Por esta razão foi empregado nesse estudo o *software* ImageJ / *Version v1,32j* (*National Institutes Health*® – NIH, EUA) por oferecer fidedignidade e capacidade de calibração, que possibilitou controle das imagens, resultando em uma tarefa padronizada e menos complexa ¹¹, eliminando assim, as limitações dos métodos manuais, elevando a qualidade da avaliação.

A perda do conteúdo ósseo na mandíbula pode ser detectada em diferentes locais, porém a divergência de opiniões em relação à área mais propensa a essa condição demonstrou que o processo alveolar é o local menos afetado que outras áreas do corpo e ramo da mandíbula. Este fato é explicado pelo efeito anabólico local gerado pela tensão dos dentes sobre o tecido ósseo durante a mastigação ^{5,8}.

Tal aspecto auxiliou na definição das áreas analisadas nesta pesquisa, pois o ramo da mandíbula é o local onde se encontra a inserção terminal do m. masseter e a diminuição de seu desempenho funcional tem sido responsável pela perda de material ósseo mandibular¹². Além destes locais apresentarem sinais radiopacos intensos, o que sustentou a acurácia da análise da densitometria óssea nessas áreas²¹.

A alteração oclusal induzida nos animais do grupo 1 provocou o aumento da dimensão vertical, bilateralmente, situação que se associa a oclusões que não apresentam contato intercuspidal⁴. Já no grupo 2, foi realizado a retrusão da mandíbula, com o deslocamento posterior deste osso, provocando desarmonia e instabilidade oclusal¹⁰.

Procedimentos que levaram os animais a desenvolver parafunções do sistema mastigatório, limitando a capacidade mastigatória, que podem provocar dor e inflamação nas regiões afetadas²². Tais aspectos justificam a redução do peso corporal dos grupos experimentais em relação ao grupo controle, sendo o aumento da dimensão vertical da oclusão o método mais hostil, pois os animais do grupo 1 perderam mais peso que os animais do grupo 2.

A limitação física causada pela interposição do fio ortodôntico na superfície oclusal impediu o animal de contactar todos os dentes no fechamento da boca, provocando hipofunção muscular, diminuindo a transferência das forças mastigatórias para o tecido ósseo, principalmente na região do ramo da mandíbula, o que atenuou a aposição óssea, aumentando os campos de reabsorção²¹.

Isto determina que a perda óssea só ocorra com a redução do estímulo mecânico que provocará aumento dos sítios de reabsorção e da atividade endosteal excessiva que determina a proximidade da superfície endosteal da periosteal, resultando em lesão e adelgaçamento ósseo²³.

Eventos que esclarecem a diminuição da densidade óssea da região da base da mandíbula do grupo 1 comparado ao grupo controle, enquanto que os demais locais de avaliação não sofreram diminuição em nenhuma outra ocasião ou grupo. Resultado também encontrado em estudo anterior⁸, onde o aumento da dimensão vertical da oclusão provocou perda de tecido ósseo mandibular na região da base da mandíbula.

A região do ramo apresentou-se como o local menos atingido pelo estresse mecânico gerado no processo de mastigação, pois registrou os menores índices de densidade óssea. Visto que o estresse mecânico deve existir em nível suficiente para manutenção da estrutura e volume do tecido ósseo, considerado um fator importante no controle do remodelamento ósseo, pois sua integridade depende do equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos^{21,24}.

Os animais do grupo 1, submetidos ao aumento da dimensão vertical de oclusão apresentaram maior densidade óssea na região do processo alveolar, por terem sofrido maior estímulo mecânico provocando maior aposição óssea nessa região em relação à região da base, que apresentou valores menores. Tal fato pode ser explicado pelo fato desses animais serem induzidos a um processo mastigatório ineficiente, que propiciou maior trabalho dos dentes incisivos, transferindo maior tensão para o tecido ósseo do processo alveolar³.

Resultado contrário ao encontrado nos grupos 2 e controle que mostra a região da base com maior conteúdo ósseo que a região do processo alveolar, com os maiores valores de densidade óssea encontrados no grupo 2, determinando que a mandíbula retruída provocasse mastigação dificultada, incapacitando os dentes incisivos de suas funções. Tal aspecto provocou maior esforço do m. masseter, gerando estímulo mais intenso na sua inserção e, por conseguinte, maior acúmulo de massa óssea na região da base que a do processo alveolar. Logo, a área de inserção do m. masseter, é o local onde se concentram maiores níveis de tensão sobre o tecido ósseo por se encontrar mais distante do eixo de movimento fixado na articulação temporomandibular^{8,10}.

O grupo 2 apresentou maior compactação óssea que os grupos 1 e controle que registraram valores não significativos. Esse fato ocorreu devido às bandas ortodônticas instaladas no grupo 2 provocarem elevado estímulo mecânico nas áreas analisadas comparadas ao grupo 1 e controle, o que confirma maior atividade osteoblástica (aposição) do que osteoclástica (reabsorção), resultando no acréscimo da estrutura óssea nos locais avaliados^{10,24}.

Estudo realizado anteriormente ²⁵, demonstrou que ressecções bilaterais realizadas nas porções posterior do m. temporal e superficial do m. masseter foram prejudiciais à morfologia da mandíbula de ratos em crescimento, comparado as porções anterior do m. temporal e profunda do m. masseter. A limitação causada no m. temporal (posterior) apresentou evidências de reabsorção óssea substancial, capazes de reduzir a altura do ramo da mandíbula desses animais; enquanto que o mesmo procedimento realizado no m. masseter (superficial) gerou redução no tamanho da mandíbula, principalmente no sentido ântero-posterior.

Apesar das porções dos músculos mastigadores funcionarem de forma independente uma da outra, o m. temporal (posterior) e o m. masseter (superficial) são recrutados de forma mútua na fase primária do fechamento da boca, tendo como principal função a estabilização da mandíbula enquanto as porções anterior do m. temporal e profunda do m. masseter, considerados secundários a este processo, elevam a mandíbula ²⁶. Tais aspectos auxiliaram a determinação das regiões para a remoção dos espécimes dos músculos, pois os processos de alteração oclusal utilizados neste trabalho causaram instabilidade oclusal alterando os músculos estabilizadores da mandíbula.

Por meio da análise metabólica (NADH-tr) realizada nos mm. masseter e temporal foi possível identificar os três tipos de fibras, o que demonstrou heterogeneidade na composição celular destes músculos, apresentando as fibras SO, que utilizam oxigênio e ácidos graxos como fontes de energia, capazes de desenvolver força moderada, tornando-se resistentes à fadiga. As fibras FG que utilizam o glicogênio como fonte de energia, apresentam desenvolvimento de força muito maior que as SO, porém não resistentes à fadiga. Ao tempo que as fibras FOG, classificadas como intermediárias por apresentar características medianas dos dois principais tipos de fibras já citados são capazes de contrair lentamente e resistir à fadiga, como também contrair de forma rápida e gerar força utilizando-se das duas fontes de energia ^{27,28}.

As fibras FG apresentaram maior área e predomínio de células em todos os músculos e grupos estudados, em relação às demais fibras identificadas. O que evidencia que as porções superficial do m. masseter e posterior do m. temporal tem características de contração rápida anaeróbia e eminente força funcional ¹⁵. Contrárias as porções profunda

do m. masseter e anterior do m. temporal que de acordo com outros estudos, demonstram características de contração lenta aeróbia devido às fibras SO apresentarem área e número predominantes ²⁶.

Apesar do m. masseter do grupo controle não apresentar números significativos, as fibras SO mostraram maior área neste grupo e menores nos grupos 2 e 1 respectivamente. Situação decorrente por este músculo apresentar características aeróbias, resistentes a fadiga, o que o torna capaz de executar contrações estáticas e dinâmicas de baixa intensidade por longos períodos de tempo. Todavia, os masseteres dos grupos 1 e 2 mostraram menores valores de área devido às perturbações oclusais a que foram acometidos, o que gerou a restrição da capacidade de mordida e desarmonia oclusal desses animais, provocando desequilíbrio funcional e metabólico do sistema mastigatório que resultou em valores menores, díspares significativos entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle ⁶.

As fibras FOG de maior área foram observadas no m. temporal do grupo 2, seguidas dos grupos controle e grupo 1 em respectivo. A inclusão de bandas ortodônticas nos incisivos superiores deste grupo não impediu esses animais de se alimentarem, mas a modificação da mecânica e a nova posição da mandíbula causaram alteração do foco de contração, que promoveu tensão no músculo provocando maior esforço físico da musculatura envolvida na mastigação. Os músculos esqueléticos quando submetidos ao aumento de trabalho físico hipertrofiam suas fibras devido ao aumento da expressão das proteínas filamentosas resultando no aumento do número de sarcômeros, o que aumentou o volume das fibras musculares ^{10,27}.

Motivo que apresentou o grupo 2 contendo as fibras de maior área, seguidos do grupo controle e grupo 1, respectivamente. Nos animais do grupo 1 o resultado foi o contrário. Os ratos submetidos ao aumento da dimensão vertical da oclusão que restringiu quase por completo a função e a força dos músculos mastigatórios provocou hipotrofia de suas células ²⁹, o que as tornou menores do que as células em estado normal no grupo controle.

O grupo controle apresentou menor área de suas fibras do que o grupo 1 em apenas uma situação caracterizada pelas fibras FOG. Isto pelo fato das fibras SO, ricas em mitocôndrias, serem mais afetadas pelo aumento da dimensão vertical oclusal que as demais fibras. Fato que restringiu o metabolismo oxidativo, diminuindo os níveis de energia dos elevadores da mandíbula devido à manutenção da nova postura assumida pela mandíbula ²⁹, tornando as células SO hipotróficas e as fibras FOG maiores no grupo 1, enquanto que no grupo controle nada ocorreu, apresentando o tamanho natural desses tipos de fibras, com as fibras SO sendo maiores que as FOG.

As fibras FOG dos mm. masseteres demonstraram maior área nos grupos 1 e controle com valores equivalentes, sendo menores no grupo 2, visto que o m. masseter é constituído de duas porções, superficial e profunda, com dois vetores de força diferentes, vertical (elevação e protusão) e oblíquo (elevação e retrusão) ²⁶. Situação que pode ser esclarecida pelo motivo da função do m. masseter (superficial) estar relacionada ao movimento de protrusão da mandíbula, movimento oposto ao induzido na alteração oclusal realizada no grupo 2 que provocou redução no desempenho físico deste músculo, reduzindo a área das fibras FOG, o que não ocorreu nos outros grupos ^{26,30}.

Isto também explica maior área das fibras encontradas nos mm. masseteres do grupo controle, quando comparada aos grupos 1 e 2 com menor área, respectivamente. Resultado que demonstrou o prejuízo gerado na aptidão física deste músculo em consequência dos métodos de desordem oclusal induzidos nesta pesquisa, que resultou em fibras com menor superfície de área.

Os mm. temporais apresentaram maior área de suas fibras nos animais do grupo 2, seguido dos grupos 1 e controle, em respectivo. O que pode ser justificado, como já descrito anteriormente, no grupo 2 os ratos conseguiam realizar o fechamento da boca não sofrendo alterações na mecânica vertical, mas sim na horizontal com a retrusão da mandíbula, principal função das fibras posteriores do m. temporal ^{10,26,30}, o que provocou maior esforço no processo mastigatório e na busca do equilíbrio oclusal. Fato não ocorrido no grupo 1, onde o contato oclusal foi impedido totalmente, limitando a ação muscular, não existindo movimento no plano horizontal, apenas o esforço na estabilização da mandíbula,

enquanto que no grupo controle permaneceram normais⁸. O que também explica o maior número de fibras FG e SO no m. temporal do grupo 2 e no masseter do grupo 1.

O m. temporal comparado ao m. masseter demonstrou maior área de todas as fibras em todos os grupos. A razão está no fato do m. temporal (posterior) ter sido mais exigido por ter a função de retrusão da mandíbula. Uma vez que além da função de elevar é também um músculo posicionador da mandíbula, função que gerou hipertrofia de suas fibras por estar em atividade constante na tentativa de reencontrar a posição de repouso da mandíbula. Caso não ocorrido com o m. masseter (superficial) que tem a função de protruir e elevar a mandíbula, sofrendo maiores efeitos dos métodos de alteração oclusal, que reduziu a força da mordida, apontando menor tamanho de área de suas fibras^{26,27}.

A avaliação numérica das fibras do tipo SO demonstrou maior número de células no grupo 1 que nos grupos controle e grupo 2, respectivamente. As fibras FOG (intermediárias) foram maioria também no grupo 1, com números similares nos grupos 2 e controle. Tais diferenças podem ser justificadas pelo estresse muscular provocado pelo aumento da dimensão vertical de oclusão na tentativa de obter equilíbrio anatômico da mandíbula, reduzindo o trabalho físico de força e aumentando o trabalho de resistência, ocorrendo aumento da atividade neuromuscular e sobrecarga de esforços repetidos, que gerou adaptações oxidativas das fibras resultando na diminuição de fibras FG e aumento na distribuição relativa das fibras SO e fibras FOG²⁷.

As fibras musculares têm capacidade de adaptações a diferentes fatores, como na atividade contrátil, fornecimento de energia e alterações ambientais²⁸. O que esclarece a maior concentração das fibras SO e FOG no grupo 1, enquanto que no grupo 2 também houve aumento de esforço, mas não houve limitação no trabalho de força; o fechamento da boca ocorreu normalmente sem transformação das fibras.

Nos mm. temporais, as fibras FOG se apresentaram em menor quantidade, enquanto que nos masseteres as fibras FOG apresentaram quantidades semelhantes de células do que as fibras SO. Isto devido ao m. temporal suportar maior sobrecarga de trabalho físico resistido como visto nos resultados deste trabalho que mostra as fibras do m. temporal com área maior que as fibras do m. masseter. Pois qualquer aumento contínuo ou frequente da carga de trabalho faz com que ocorram adaptações oxidativas destas fibras, aumentando a

distribuição das fibras oxidativas (SO) diminuindo a distribuição das fibras FOG^{31,32}. Fato não ocorrido no m. masseter que mostrou números similares de fibras tipo SO e FOG.

Resultados que explicam a maioria das fibras SO dos mm. temporal e masseter no grupo 1 respectivamente, devido o aumento de trabalho resistido moderado destes músculos na busca do repouso da mandíbula. Essas fibras foram em menor quantidade no m. masseter do grupo 2, temporal e masseter do grupo controle e temporal do grupo 2 pelo fato da diminuição da intensidade nos movimentos físicos de resistência destes músculos, diminuindo o metabolismo oxidativo, não acontecendo à adaptação das fibras de intermediárias para lentas³¹, mas sim resultando em adaptações glicolíticas, transformando fibras intermediárias em rápidas, aumentando a distribuição de fibras tipo FG²⁷.

Aspecto este que deixa claro a situação encontrada no grupo 1 que sofreu com a mastigação ineficaz e hipofunção muscular, conseqüente do aumento vertical da oclusão que promoveu o aumento do número de fibras FG. Isto também explica a maior quantidade de fibras FG no m. temporal e masseter do grupo 1, seguidas do m. masseter dos grupos 2 e controle respectivamente.

Os resultados desse estudo corroboram com as opiniões de outros autores que destacam capacidade de adaptação dos músculos mastigadores em relação aos outros músculos esqueléticos, pois relatam que a movimentação do aparato mastigatório está entre os mais complexos, senão o mais complexo^{15,32,33}.

CONCLUSÃO

O sistema musculoesquelético dos ratos, em especial a mandíbula e os músculos masseter e temporal, sofreram alterações morfológicas quando submetidos a alterações oclusais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao professor mestre Gerson Santos Leite pela contribuição com as análises e a professora especialista Ana Paula Souza Casarin pelas revisões da língua portuguesa.

REFERÊNCIAS

1. Azuma S, Kohzuki M, Saeki S, Tajima M, Igarashi K, Sugawara J. Beneficial effects of orthodontic treatment on quality of life in patients with malocclusion. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2008; 214: 39-50.
2. Zhang M, Mcgrath, Hägg U. The impact of malocclusion and its treatment on quality of life: a literature review. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2006; 16: 381-87.
3. Kunii R, Yamaguchi M, Aoki Y, Watanabe A, Kasai Kazutaka. Effects of experimental occlusal hypofunction, and its recovery, on mandibular bone mineral density in rats. *European Journal of Orthodontics*. 2008; 30: 52-60.
4. Mavropoulos A, Bresin A, Kiliaridis S. Morphometric analysis of the mandible in growing rats with different masticatory functional demands: adaptation to an upper posterior bite block. *European Journal of Oral Science*. 2004; 112: 259-66.
5. Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007; 22(3): 403-10.
6. Bani D, Bergamini M. Ultrastructural abnormalities of muscle spindles in the rat masseter muscle with malocclusion-induced damage. *Histology and Histopathology*. 2002; 17: 45-54.
7. Vlasidis KZ, et al. Relationship between BMD, dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover in diagnosis of osteoporosis. *Maturitas*. 2008; 59: 226-33.
8. Bresin A, Kiliaridis S. Dento-skeletal adaptation after bite-raising in growing rats with different masticatory muscle capacities. *European Journal of Orthodontics*. 2002; 24: 223-37.
9. Bezerra BB. Avaliação histométrica da doença periodontal experimental em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP / FOP; 2007.

10. Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the rat temporomandibular joint in functional posterior displacement of the mandibule. *The Angle Orthodontist*. 2004; 74(5): 677-83.
11. Papadopulos F, et al. Common Tasks in Microscopic and Ultrastructural Image Analysis Using ImageJ. *Ultrastructural Pathology*. 2007; 31: 401-07.
12. Mavropoulos A, Ammann P, Bresin A, Kiliaridis S. Masticatory demand induce region-specific changes in mandibular bone density in growing rats. *The Angle Orthodontist*. 2004; 75(4): 625-30.
13. Dubowitz V, Sewry CA, Fitzsimons RB. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Bailliere Tindall. 1985; 41-81.
14. Andreo JC, et al. Is there morphological difference between branchiomic and somatic muscles submitted to alcohol consumption? An experimental study in rats (*rattus norvegicus*). *Journal of Applied Oral Science*. 2005; 13(3): 296-304.
15. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*. 1972; 11: 2627-33.
16. Ringqvist M. Fiber Types in Human Masticatory Muscles. Relation to Function. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1974, 82:333-55.
17. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass Correlations: Uses in Assessing Reliability. *Psychological Bull*, 1979; 86: 420-428.
18. Petrikowski CG, El Badrawy HE, Boehlau EE, Grace MG. Interobserver variability in radiographic interpretation of pediatric dental diseases: a pilot study. *Journal (Canadian Dental Association)*. 1996; 62: 723-30.
19. Bragger U. Digital imaging in periodontal radiography: a review. *Journal of clinical Periodontology*. 1988; 15: 551-7.
20. Weber HP, Buser D, Fiorellini JP, Williams RC. Radiographic evaluation of crestal bone levels adjacent to non-submerged titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*. 1992; 3: 181-88.

21. Serakides R, Nunes VA, Ocarino NM, Nascimento EF. Bone effects of the association hyperthyroidism-castration of adult female rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2004; 48(6): 875-84.
22. Christensen LV, Rassouli NM. Experimental occlusal interferences. Part I. A review. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1995; 22(7): 515-20.
23. Javaid MK, Cooper CC. Prenatal and childhood influences on osteoporosis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 16(2): 349-67.
24. Kuroda S, et al. bone mineral density of the mandibule in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases*. 2003; 9: 24-28.
25. Lifshitz J. Comparative anatomic study of mandibular growth in rats after bilateral resections of superficial masseter, posterior temporal and anterior digastrics muscles. *Journal of Dental Reserch*. 1976; 55(5): 854-8.
26. Hiiemäe KM. The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). Their fibre type and composition. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1971; 50(1): 101-9.
27. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemistry Cell Biology*. 2001; 115: 359-372.
28. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2003; 146: 159-216.
29. Nishide N, Baba S, Hori N, Nishikawa H. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001; 28(3): 294-8.
30. Ohmure H, Miyawaki S, Nagata J, Ikeda K, Yamasaki K, Alkalaly A. Influence of forward head posture on condylar position. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2008; 35: 795-800.
31. Uribe JM, Stump CS, Tipton CM, Fregosi RF. Influence of exercise training on the oxidative capacity of rat abdominal muscle. *Respiration Physiology*. 1992; 88: 171-80.

32. Korfage JA, Koolstra JH, Langenbach GE, Van Eijden TM. Fiber-type composition of the human jaw muscles-(part 1) origin and functional significance of fiber-type diversity. *Journal of Dental Research*. 2005; 84(9): 774-83.
33. Eriksson PO, Thornell LE. Histochemical and morphological muscle-fibre characteristics of the human masseter, the medial pterygoid and the temporal. *Archives of Oral Biology*. 1983; 28(9): 781-95.

BIBLIOGRAFIA*

34. McNamara JA Jr, Seligman DA, Okeson JP. Occlusion, Orthodontic treatment, and temporomandibular disorders: a review. *Journal of Orofacial Pain*. 1995; 9(1): 73-90.
35. Jiang G, et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and fêmur of osteoporotic rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2008; 26: 130-37.
36. Posselt, U. *Fisiologia de la oclusion y rehabilitacion*. Barcelona, Editora Mallat Desplats, 1973. 352p.
37. Molina OF. *Fisiopatologia crâniomandibular - Oclusão e ATM*. São Paulo, Pancast. 1989. 595p.
38. Simões WA. *Ortopedia funcional dos maxilares vista através da reabilitação neuro-oclusal*. São Paulo, 1985. 794p.
39. Winarakwong L, Muramoto T, Soma K, Takano Y. Age-related changes and the possible adaptability of rat jaw muscle spindles: immunohistochemical and fine structural studies. *Archives of Histology and Cytology*. 2004; 67(3): 227-40.
40. Miede B, Fanghanel J, Kubein-Meesenburg D, Nagerl H, Schwestka-Polly R. Masticatory musculature under altered occlusal relationships - A model study with experimental animals. *Annals of Anatomy*. 1999; 181(1): 37-40.
41. Dale R. Occlusion: The standard of care. *Journal of Canadian Dental Association*. 2001; 67: 83-5.
42. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Quintessence Books. 1994; 3: 49-100.
43. Meghji S. Bone remodeling. *British Dental Journal*. 1992; 172(6): 235-42.
44. Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *British Dental Journal*, 1998; 25(2): 101-7.
45. Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2001; 2: 95-104.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

46. Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Canadian Medical Association Journal*. 2002; 167 (10): s1-34.
47. Shimomoto Y, Chung CJ, Iwasaki-Hayashi Y, Muramoto T, Soma K. Effects of occlusal stimuli on alveolar / jaw bone formation. *Journal of Dental Research*. 2007; 86(1): 47-51.
48. Rokx JM, Van Willigen JD, Jansen HWB. Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat. *Arch Oral Biol*. 1984; 29(1): 25-31.
49. Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J. Mechanical loading simulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcified Tissue International*. 2000; 67(2): 163-72.
50. Mongini F. O sistema mastigatório - função, disfunção e reabilitação. Rio de Janeiro, Quintessence, 1988. 373p.
51. Monemi M, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging. *Journal of the Neurological Science*. 1998; 154(1): 35-48.
52. Bani D, Bergamini M. Dantrolene counteracts the masseter muscle damage induced by artificial occlusal wears studies in a rat model. *Journal of Dental Research*. 2001; 80(11): 1990-4.
53. Kiliaridis S. Masticatory Muscle Function and Craniofacial Morphology. An Experimental Study in the Growing Rat Fed a Soft Diet. *Swedish Dental Journal. Supplement*. 1986; 36: 1-55.
54. Bresin A, Bagge U, Kiliaridis S. Adaptation of normal and hypofunctional masseter muscle after bite-raising in growing rats. *European Journal of Oral Science*. 2000; 108: 493-503.
55. Desai S, Johnson DL, Howes RI, Rohrer MD. Changes in the rabbit temporomandibular joint associated with posterior displacement of the mandible. *International Journal of Prosthodontics*. 1996; 9(1): 46-57.

56. Darby IB, Lu J, Calache H. Radiographic study of the prevalence of periodontal bone loss in Australian school-aged children attending the Royal Dental Hospital of Melbourne. *Journal of Clinical Periodontology*. 32: 959-65.
57. Mohlin B, et al. TMD in relation to malocclusion and orthodontic treatment. *The Angle Orthodontist*. 2007; 77(3): 542-48.
58. Issa JPM, Iyomasa MM, Mizusaki CI, Watanabe L, Lacerda CAM. Morphological alterations in the masseter muscle induced by unilateral extraction of the upper molars in guinea pigs. *International Journal of Morphology*. 2004; 22(3): 225-230.

Anexo I

Cezar Casarin

De: "Leonor Ap. S. Aizza" <appscielo@bireme.org>
Data: terça-feira, 10 de fevereiro de 2009 00:38
Para: "Cezar Augusto Souza Casarin" <cezarcasarin.x@gmail.com>
Assunto: [RBF] Agradecimento pela Submissão

Cezar Augusto Souza Casarin,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "ALTERAÇÕES MUSCULOESQUELÉTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À ALTERAÇÃO OCLUSAL" para Revista Brasileira de Fisioterapia. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbfis/author/submission/8977>

Login: cezarcasarin

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Leonor Ap. S. Aizza
Revista Brasileira de Fisioterapia

Revista Brasileira de Fisioterapia/
Brazilian Journal of Physical Therapy
<http://submission.scielo.br/index.php/rbfis>

ANEXO II



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

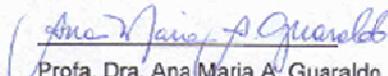
CERTIFICADO

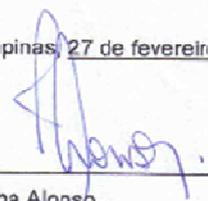
Certificamos que o Protocolo nº 1216-1, sobre "Influência do diazepam sobre o sistema músculo-esquelético da mandíbula de ratos com má-oclusão induzida", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria / Cezar Augusto Souza Casarin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1216-1, entitled "Influence of the diazepam on musculoskeletal system of rats jaw with induced bad occlusion", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>