Mariana Brandão Ferreira

Caracterização da variação do calibre das fibras musculares, densidade capilar e expressão de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Mariana Brandão
Caracterização da variação do calibre das fibras musculares, densidade capilar e expressão de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal / Mariana Brandão Ferreira. -- São Paulo, 2009.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Neurologia.
Área de concentração: Neurologia.
Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Músculos mastigatórios 2.Cadeias pesadas de miosina 3.Capilares/anatomia & histologia

USP/FM/SBD-229/09

Dedicatória

Dedico esse trabalho a quatro pessoas muito especiais:

Ao Marcelo, pela ajuda, apoio incondicional, incentivo, paciência, companheirismo, e principalmente por sua amizade e amor.

Aos meus pais Tânia e João, pelo amor, por me guiarem sempre ao melhor caminho, por ser meu orgulho, exemplos de vida, e responsáveis por tudo que sou hoje.

Ao meu irmão Eduardo por estar sempre presente em minha vida com seu amor e amizade

Agradecimentos

À Profa. Dra. Suely Marie, pela oportunidade, carinho, dedicação e ensinamentos.

À Thatiana, que esteve sempre ao meu lado todos esse anos de pesquisa, e tornou-se uma grande amiga que terei por toda a vida.

Aos meus queridos padrinhos Sônia e Sérgio, que me receberam, incentivaram e apoiaram, minha eterna gratidão.

Às amigas do laboratório, Miyuki, Roseli, Priscila, Mussya, Thaís, Thaís, Érika, Eliene, Renata, Suely Oba, Simone, Mazé, Célia, Darcy, Rose, Márcia, Keila, Pedro (em memória) e Cíntia pelo incentivo e amizade.

Aos meus primos Júlio e Caio pelas colaborações no início desse trabalho.

À Dra Alda, pela colaboração e contribuições.

Aos funcionários do sistema de verificação de óbitos pela colaboração.

Aos amigos do ambulatório de DTM da UNIFESP, pelo ajuda e apoio.

Aos colegas e professores do curso de especialização em ortodontia da ABENO, pela torcida e apoio.

À Paula, por me incentivar e estar sempre ao meu lado.

Às minhas amigas que me compreenderam.

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de abreviatura

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

1- **Introdução** 1

2- **Objetivos** 4

3- **Revisão da literatura** 6

3.1- Disfunção Temporomandibular 7

3.2- Músculos da mastigação 10

3.3- Histórico dos estudos realizados em tecido muscular 11

3.4- Embriologia muscular 15

3.5- Capacidade muscular adaptativa 19

3.6- calibre das fibras musculares 21

3.7- Capilares 21

4-**Métodos** 26

41: Caracterização das amostras musculares 28

4.2: Histologia 29

4.3: Imunohistoquímica 29

4.4: Análise imunoistoquímica 32

4.5 Proporção das fibras analisadas 33

4.6 Histograma da distribuição e diâmetro das fibras musculares 33

4.7 Análise estatística 34

5- Resultados 35

5.1: População de estudo 36

5.2: Capilar/fibra 37

5.3: Densidade Capilar 44

5.4: Miosina neonatal 51

5.5: Diâmetro 59

6-Discussão 71
6.1: Capilares 72
6.2: Calibre das fibras musculares 74
6.2 Miosina Neonatal 76
7- Conclusão 79
8- Anexos 81
9- Referências 89

Lista de abreviatura

ABC: Complexo streptavidina biotina peroxidase

ABS: Complexo Avidina biotina peroxidase

Ag: Antígeno

ATM: Articulação Temporomandibular

ATPase: Adenosina Trifosfatase

DAB: Diamino benzidina

DCM: desordens crâniomandibulares

DDM: síndrome dor-disfunção miofascial

DTM: Disfunção Temporomandibular

EN-2: homeobox-Engrailed-2

HE: Hematoxilina Eosina

JPG: Joint photographic experts

MyHC: Myosin Heavy Chain (Cadeia de miosina pesada)

O^2: Oxigênio

PAS: Ácido periódico reativo Shiff

PBS: Tampão fosfato salina

PC: Personal computer

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação de polimerase em cadeia)

pH: potência hidrogênio

RDC: Research Diagnostic Criteria (Critério de diagnóstico para pesquisa)

RBG: red, green and blue

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

SDH: succinato dehidrogenase

TIF: Tagged Image File

UEA: Ulex europaeus agglutinin I - lectin

Lista de figuras

Figura 1: Distribuição dos tipos de fibras musculares durante a gestação (modificado de COLLING-SALTIN, 1978) 18
Figura 2: Músculo temporal 28
Figura 3: Músculo masseter 28
Figura 4: Coloração por imunoistoquímica neonatal, gênero feminino 53
Figura 5: Coloração por imunoistoquímica neonatal, gênero masculino 54

Lista de tabelas

Tabela 1: População de estudo 27
Tabela 2: anticorpos utilizados 30
Tabela 3: População de estudo 36
Tabela 4: Número de capilares por fibras no gênero feminino 37
Tabela 5: número de capilares por fibras no gênero masculino 38
Tabela 6: número de capilar por fibra nos grupos etários nos músculos masseter e temporal 40
Tabela 7: resultados de capilar/fibra segundo as variáveis músculos Masseter e Temporal 41
Tabela 8: resultados de capilar por fibra segundo as variáveis gênero e músculos masseter e temporal 42
Tabela 9: densidade capilar no gênero feminino 44
Tabela 10: densidade capilar no gênero masculino 45
Tabela 11: densidade capilar por grupo etário nos músculos masseter e temporal 47
Tabela 12: densidade capilar nos músculos masseter e temporal 49
Tabela 13: densidade capilar nos gêneros masculino e feminino, nos músculos masseter e temporal 50
Tabela 14: expressão positiva de miosina neonatal no gênero feminino 51
Tabela 15: expressão positiva de miosina neonatal no gênero masculino 52
Tabela 16: expressão positiva de miosina neonatal nos grupos etários 56
Tabela 17: expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal 57
Tabela 18: expressão positiva de miosina neonatal nos gêneros masculino e feminino 58
Tabela 19: Diâmetro das fibras musculares discriminado por décadas no gênero feminino 60
Tabela 20: diâmetro das fibras musculares discriminado por décadas no gênero masculino 61
Tabela 21: Diâmetro das fibras musculares discriminado por grupo etário 64

Tabela 22: Diâmetro das fibras musculares nos músculos masseter e temporal 66

Tabela 23: Diâmetro das fibras musculares nos gêneros masculino e feminino 67

Lista de gráficos

Gráfico1: Distribuição dos resultados de número de capilares por fibra nos músculos masseter e temporal, gênero feminino discriminado por década. 39

Gráfico2: Distribuição dos resultados de número de capilares por fibra nos músculos masseter e temporal, gênero masculino discriminado por década. 39

Gráfico 3: Distribuição dos resultados de número de capilares por fibra nos músculos masseter e temporal discriminados por grupo etário 41

Gráfico 4: Distribuição dos resultados de número de capilares por fibra da amostra total,discriminado nos músculos masseter e temporal. 41

Gráfico 5: Distribuição dos resultados de número de capilares por fibra nos músculos masseter e temporal discriminados por gênero. 42

Gráfico 6: Distribuição dos resultados de número de densidade capilar nos músculos masseter e temporal,gênero feminino,discriminado por década. 46

Gráfico 7: Distribuição dos resultados de número de densidade capilar nos músculos masseter e temporal,gênero masculino discriminado por década 46

Gráfico 8: Distribuição dos resultados de número de densidade capilar nos músculos masseter e temporal discriminados por grupo etário 48

Gráfico 9: Distribuição dos resultados de número de densidade capilar da amostra total,discriminado nos músculos masseter e temporal. 49

Gráfico 10: Distribuição dos resultados de número de densidade capilar nos músculos masseter e temporal discriminados por gênero. 50

Gráfico 11: Distribuição da porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal,gênero feminino discriminados por décadas 55

Gráfico 12: Distribuição da porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal,gênero masculino discriminados por décadas 55

Gráfico 13:Distribuição da porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal discriminados por grupo etário 56
Gráfico 14: Distribuição dos resultados da porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal da amostra total,discriminado nos músculos masseter e temporal 57
Gráfico 15: Distribuição da porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal discriminados por gênero 59
Gráfico 16: Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras dos músculos masseter no gênero feminino da 1°a 9° década. 62
Gráfico 17: Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras dos músculo temporal no gênero feminino da 1°a 9° década. 62
Gráfico 18: Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras dos músculos masseter no gênero mascuino da 1°a 9° década. 63
Gráfico 19: Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras dos músculo temporal no gênero masculino da 1°a 9° década. 63
Gráfico 20:Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras do músculo masseter discriminados por grupo etário 65
Gráfico 21:Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras do músculo temporal discriminados por grupo etário 65
Gráfico 22: Distribuição da mensuração do diâmetro das fibras, segundo as variáveis músculos Masseter e Temporal 66
Gráfico 23: Distribuição da mensuração do diâmetro segundo o gênero no músculo masseter. 68
Gráfico 24: Distribuição da mensuração do diâmetro segundo o gênero no músculo temporal. 68
Gráfico 25: Representação linear da distribuição de capilar/fibra em ambos os gêneros 69
Gráfico 26: Representação linear da distribuição de capilar/fibra em ambos os gêneros 70

Resumo

A Disfunção temporomandibular (DTM) é um termo coletivo que abrange um largo espectro de problemas clínicos da articulação e dos músculos na área orofacial; estas disfunções são caracterizadas principalmente por dor, sons na articulação, e função irregular ou limitada da mandíbula. Os músculos da mastigação podem estar envolvidos na DTM de origem muscular, e por definição são os músculos que promovem o toque dental, portanto os elevadores da mandíbula: masseter, temporal, pterigóideos medial e lateral. A origem muscular da DTM é a mais prevalente, sendo portanto,o entendimento funcional e estrutural da composição dos músculos da mastigação essencial para a compreensão desta DTM. Este estudo tem como objetivo analisar a estrutura dos músculos da mastigação quanto a variação do calibre das fibras lentas e rápidas, densidade capilar e da expressão da miosina neonatal com a variação da idade. Foram estudadas 37 amostras dos músculos temporal e masseter (20 amostras do sexo masculino e 17 do sexo feminino) de autópsias do Serviço de Verificação de Óbitos de São Paulo com intervalo pós-mortem de até 18 horas, de ambos os gêneros e com idades divididas por décadas (1ª a 9ª décadas). Foram realizadas reações imunoistoquímicas com os anticorpos Ulex europaeus biotinilada aglutinina, anti-miosina neonatal, anti-miosina rápida, anti-miosina lenta para análise da expressão das proteínas. A avaliação foi feita por dois observadores, após calibração intra observador, (duas contagens no mesmo

campo pelo mesmo observador em tempos diferentes) e inter observador (contagem do mesmo campo por dois observadores), até se atingir uma margem de erro menor que 10%. Em relação ao número de capilares/fibra, nos músculos masseter e temporal, da primeira a nona década, em média respectivamente foi de 1 e 0,7 respectivamente. O número de capilares por mm^2, nos músculos masseter e temporal, não variou ao longo das nove décadas estudadas, e o número de capilares por mm^2, foi significantemente maior no músculo masseter quando comparado ao temporal, ($p=0,025$). A miosina neonatal manteve-se presente embora com decréscimo em todas as décadas dos músculos masseter e temporal. Observou-se o diâmetro das fibras do tipo II menores que as fibras do tipo I.

Descritores: 1.Músculos mastigatórios 2.Cadeias pesadas de miosina 3.Capilares

Summary

Temporomandibular disfunction (TMD) is a colletive term that refers to different clinical problems of the temporomandibular joint and the jaw muscles. These disfunctions are characterizied meanly by pain, joint sounds and irregular or limited mandibular function. The jaw muscles can be involved in the TMD of muscle etiology, and by definition they are the ones which provide the teeth touch, then the jaw elevators: masseter, temporalis, medial pterygoid and lateral pterygoid. As the muscular etiology is the most prevalent cause of TMD, the detailed understanding of structural and functional composition of the masticatory muscles is paramount to better comprehend TMD due to muscle disorder. This study has the aim to analyze the jaw muscle structure concerning capillarie density, neonatal myosin expression, and the cross sectional area of the fast and slow fibers in temporalis and masseter muscles in autopsy samples from 1st to 9th decades of age. Thirty seven temporalis and masseter muscles samples were studied (20 from male and 17 from female) from Serviço de Verificação de Óbitos of São Paulo. The specimens were divided by gender and ages. The samples were collected up to 18 hours post-mortem. Imunohistochemistry stainning were made with antibodies to analize the protein expression. The evaluations were made by two observers, after intra observer calibration (two evaluations on the same field by the same observer in different times) and inter observer (evaluation of the same field by two observers), unti getting less than 10% of error. The number of capillaries per fiber in the masseter and temporalis

muscle was in average 1 and 0,7 respectively. The number of capillaries per mm^2 was significantly higher in the masseter when compared to temporalis muscle ($p=0.025$). The neonatal myosin was present in all decades in both muscles, and it was observed that the cross sectional area of the type II fibers was smaller than the type I fibers.

Descriptors: 1.Masticatory muscle 2.Myosin heavy chain 3.Capillary.

1 INTRODUÇÃO

A disfunção temporomandibular (DTM) é um termo coletivo que abrange um largo espectro de problemas clínicos da articulação e dos músculos na área orofacial; estas disfunções são caracterizadas principalmente por dor, sons na articulação, e função irregular ou limitada da mandíbula. A DTM é considerada um subgrupo distinto das desordens musculoesqueléticas e reumatológicas, e representa uma causa importante de dor não-dental na região orofacial (Carlsson et al., 2006).

Pacientes com DTM apresentam diminuição da qualidade de vida (Segù et al 2003). De acordo com o “Research Diagnostic Criteria” (RDC) a prevalência de DTM de origem muscular é de 25%, das discopatias de 3,3%, e artrose de 4,2% (Plesh et al, 2005).

Os músculos da mastigação podem estar envolvidos na DTM de origem muscular, que por definição são os músculos que promovem o toque dental, portanto os elevadores da mandíbula: masseter, temporal, pterigóideos medial e lateral.

Os músculos da mastigação estão ativos durante uma grande variedade de funções motoras, como por exemplo, mastigação, deglutição e fonação Para executar essa grande variedade de funções deve existir uma enorme aptidão em controlar a posição da mandíbula precisamente e

instantaneamente na aplicação de forças. Esse músculo contém características únicas tais como distribuição das fibras como tipo de contração lenta e contração rápida, além de conterem fibras típicas do período de desenvolvimento.

Os músculos esqueléticos apendiculares são compostos de fibras do tipo I e do tipo II em proporções e diâmetros aproximadamente iguais, sendo que o diâmetro das fibras dos músculos da mastigação e orofaciais são quase 50% menores que dos músculos apendiculares (Stal et al, 1987).

Estas características peculiares, quanto ao tamanho e à distribuição do tipo de fibras nos músculos da mastigação, podem causar alterações específicas após contraturas isométricas e levar a mudanças adaptativas no decorrer do processo de envelhecimento. Há descrição de mudança na composição do tipo de fibras musculares com a idade (Monemi, 1998), assim como mudanças no número de capilares do músculo portanto do nível de vascularização com a idade (Hammarstn et al.,1980; Esbjornsson et al., 1993). Com o objetivo de se analisar a variação da estrutura dos músculos da mastigação quanto ao tamanho das fibras, da densidade capilar e capacidade regenerativa com a progressão da idade, foi realizado estudo morfométrico destas características nos músculos masseter temporal ao longo de nove décadas de idade em amostras de autópsia.

2 OBJETIVOS

Analisar nos músculos masseter e temporal de amostras de autópsia de indivíduos da primeira a nona década de idade:

1) O comportamento da variação do calibre das fibras lentas e rápidas

2) O número de capilares por fibras e a densidade capilar.

3) A expressão da miosina neonatal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Disfunção temporomandibular

A DTM no sentido mais amplo é considerada um conjunto de distúrbios articulares e musculares na região orofacial, caracterizada principalmente por dor, ruídos nas articulações e função mandibular irregular ou com desvio. A dor não é de origem neurogênica, psicogênica ou visceral, e a dor periodontal, dentária ou cutânea também foi excluída dessa definição. Portanto, a DTM inclui distúrbios relacionados à articulação e ao complexo muscular mastigatório. E considerada um subgrupo de disfunções musculoesqueléticas e reumatológicas gerais (Zarb, 2000).

No Brasil os dados sobre DTM são escassos, um estudo com estudantes universitários de 19 a 25 anos demonstrou que 6,8% deles apresentavam algum grau de DTM (Pedroni, 2003). Em outro estudo com estudantes de Bauru 0,65% dos mesmos apresentavam sintomas graves de DTM, 5,81% tinham sintomas moderados e 4,84% tinham sintomas leves (Conti, 1996).

Atualmente a sigla DTM é a abreviatura mais comum para a disfunção temporomandibular, mas a terminologia variou muito ao longo dos anos. DTM foi sinônimo de desordens crâniomandibulares (DCM), uma denominação que muitos preferiam, especialmente durante os anos 80. Outros termos foram síndrome de Costen, síndrome da articulação

temporomandibular (ATM) e síndrome dor-disfunção miofascial (DDM). A história da DTM é repleta de controvérsias sobre muitos assuntos além da terminologia, como prevalência, diagnóstico, exigência e necessidade de tratamento, bem como sobre os métodos de tratamento. Provavelmente as teorias mais conhecidas sejam relativas à etiologia, em que alguns autores propuseram os fatores oclusais como sendo os mais importantes no desenvolvimento da DTM, enquanto outros consideram fatores psicológicos (Carlsson et al., 2006).

A etiologia das DTM é um assunto muito complexo e controverso, e tem sofrido mudanças ao longo do tempo, passou pela fase oclusionista em 1920 e 1930, onde a maloclusão era considerado o principal fator etiológico, entre 1950 e 1960, os músculos ocuparam lugar da ATM e da oclusão como origem da dor. Quando ficou óbvio que as DTM englobam um espectro de várias desordens, os conceitos etiológicos baseados em um único fator perderam a confiabilidade. Esta idéia de uma etiologia multifatorial se tornou mais aceita por volta do final dos anos 70 (Carlsson et al., 2006).

Atualmente uma abordagem complexa entre as relações das possíveis causas da DTM pode ser dividida em três categorias:

Fatores predisponentes: incluem uma mistura de fatores morfológicos, fisiológicos, psicossociais, e variações ambientais que combinadas a uma alta susceptibilidade individual levam a desenvolver DTM.

Fatores precipitantes: incluem uma combinação entre trauma, estresse, hiperfunção e possivelmente falha natural dos fatores inibitórios que levam ao aparecimento dos sintomas.

Fatores perpetuantes: hábitos parafuncionais, ganhos secundários em permanecer doente e efeitos deletérios de outros tratamentos (Greene, 1995).

Pacientes com DTM apresentam diminuição da qualidade de vida (Segu, 2003). Foi demonstrado que a DTM causou um forte impacto na qualidade de vida, e que alguns problemas funcionais, como dificuldades para mastigar alimentos aumentaram até quatro vezes (John, 2002). Uma pesquisa realizada com 1865 adultos mostrou que 72% relataram que problemas com a saúde bucal afetam diretamente a sua qualidade de vida (McGrath, 2001).

De acordo com o “Research Diagnostic Criteria” (RDC) a prevalência de DTM de origem muscular seria de 25%, das discopatias de 3,3%, e artrose de 4,2%. A maioria dos pacientes apresentava mais de um diagnóstico: 8,3% de transtornos musculares e discopatia, 21,7% de transtornos musculares e artrose; 2,5% de discopatias e artrose e 7,5% de transtornos musculares, discopatia e artrose (Dworkin SF, 1992). Em outro estudo 80% dos pacientes. De 61 casos apresentavam DTM muscular, 33% deslocamento do disco, e 48% artralgia/artrite/artrose (Plesh O., 2005).

3.2 Músculos da mastigação

Os músculos da mastigação desempenham papel fundamental no “sistema estomatognático”, sendo que a mastigação ocorre através da função destes músculos promovendo os contatos diretos entre os arcos dentais superior e inferior (Zarb, 2000). São quatro os músculos da mastigação: masseter, temporal, pterigóideo medial e lateral que por definição são os que promovem o toque dental, portanto os elevadores da mandíbula. (Federative Comitee on Anatomical Terminology, 1997). O músculo masseter está inserido acima no arco zigomático e no processo zigomático do maxilar, e abaixo na superfície externa do ramo e do ângulo da mandíbula, sua função (fibras superficiais) é principalmente elevar a mandíbula, e a das fibras posteriores e profundas, ajudar a realizar a retrusão da mandíbula. O masseter é inervado pelo nervo massetérico que parte do ramo anterior da divisão mandibular do nervo trigêmeo (V nervo craniano).

O músculo temporal está inserido acima, nas fossas temporais e com a superfície das fáscias temporais e, distalmente, no processo coronóide da mandíbula. A função do músculo é fundamentalmente fechar os maxilares. Além disso, as fibras posteriores, até certo ponto as fibras médias, empurram para trás, bilateralmente, a mandíbula; atuando unilateralmente elas desviam a mandíbula para o mesmo lado. O músculo temporal é inervado pelos nervos temporais profundos anterior e posterior, que se

ramificam da divisão anterior da porção mandibular do nervo trigêmeo (V nervo craniano) (Simons et al., 2005).

Os músculos da mastigação estão ativos durante uma grande variedade de funções motoras, como mastigação, deglutição e fonação, por exemplo. Para executar essa grande variedade de funções deve existir uma enorme aptidão em controlar a posição da mandíbula precisamente e instantaneamente na aplicação de forças. Esses músculos cumprem esse requerimento por possuir uma arquitetura complexa combinada a uma composição de fibras heterogêneas capazes de produzir uma grande variedade de forças em diferentes velocidades de contração (Korfage, 2005).

3.3 Histórico dos estudos realizados em tecido muscular

Em relação aos estudos sobre o tecido muscular, a maioria das pesquisas foram feitas em animais e os estudos feitos nos anos de 1873, 1874 e 1880, por Ranvier, em coelho, sugeriam uma diferença fisiológica entre as fibras vermelhas e brancas, correlacionando-as com contração lenta e rápida, respectivamente. Foi confirmado, também, um maior suprimento sangüíneo nos músculos vermelhos que nos brancos. Em 1884, Grützner et al., concluiu que os músculos de todos os vertebrados, incluindo o homem, eram compostos de dois tipos de fibras: uma fina e escura e outra larga e clara; definindo a cor escura como grânulos no sarcoplasma. Knoll (1891) notou que músculos muito ativos como os músculos oculares, da mastigação

e respiratórios eram compostos principalmente de fibras escuras. Em alguns animais havia músculos com fibras inteiramente vermelhas ou brancas e, em outros, uma mistura de fibras. Em aves domésticas, os músculos do peito eram brancos e os das pernas vermelho, em contraste com os pássaros de vôo, onde o músculo peitoral era vermelho e os das pernas, brancos. Também investigou as características dos grânulos e concluiu que eram de natureza lipídica. Bullard (1919) observou fibras claras, escuras e intermediárias e uma variação no tamanho das fibras de diferentes músculos do gato através da coloração. Sudan III. Paul e Sperling (1952) demonstraram que músculos brancos tinham uma menor quantidade de mitocôndria e baixa atividade respiratória, enquanto
músculos vermelhos eram ricos em mitocôndria e apresentavam alta atividade respiratória.

O desenvolvimento das técnicas histoquímicas possibilitou estudar o sistema enzimático, os componentes celulares das fibras musculares e correlacionar as atividades funcionais de cada fibra com sua morfologia. As primeiras investigações em amostras de autópsias humanas foram feitas por Wachstein, et al (1955), que notaram uma variação na atividade da succinato dehidrogenase (SDH) nas fibras e que as fibras mais reativas eram as de menor diâmetro (apud Dubowitz, 1985).

Segundo Dubowitz (1985), foram feitas quatro classificações dos tipos de fibras através de diferentes abordagens:

1- Aparência anatômica:

a. vermelha X branca;

b. escura X clara;

c. alta ou baixa granulação;

d. rica ou pobre em protoplasma;

e. diferenças subcelurares no microscópio eletrônico.

2- Comportamento fisiológico:

a. lento X rápido;

b. alta ou baixa resistência à fadiga.

3- Propriedades bioquímicas:

a. alta ou baixa atividade respiratória;

b. alta ou baixa enzima ou constituintes químicos.

4- Características histoquímicas:

a. conteúdo de enzima alto ou baixo;

b. perfil da enzima da fibra;

c. característica imunocitoquímica.

Apesar destas classificações, a situação é mais complexa, pois não existe uma clara correlação entre os tipos de fibras.

Os músculos dos mamíferos apresentam fibras musculares heterogêneas, com um perfil citoquímico, características bioquímicas, componentes fisiológicos e uma específica característica estrutural. Sendo assim, os tipos de fibras foram classificados em tipo I, IIA, IIB e IIC (Brooke e Kaiser, 1970). No entanto, essa terminologia tem variações de acordo com os diferentes pesquisadores.

As fibras do tipo I têm características citoquímicas que indicam principalmente um perfil de metabolismo aeróbio-oxidativo. As fibras IIA são tanto oxidativas como glicolíticas, as IIB são dotadas com um mecanismo metabólico anaeróbio-glicolítico e as IIC são fibras imaturas. As proporções dos tipos de fibras variam não só em diferentes músculos como em diferentes regiões do mesmo músculo (Carpenter e Karpati, 2001).

Por meio de métodos histoquímicos analisam-se duas propriedades dos tipos de fibras musculares de humanos: velocidade de contração e fadiga. As unidades motoras que se constituem de fibras do tipo I são de contração lenta e relativamente resistentes à fadiga, respondendo a uma velocidade de disparo neural de quase 10Hz. As unidades motoras do tipo IIB são de rápida contração e relativamente fatigáveis, respondendo à

freqüência de 50Hz e as unidades motoras do tipo IIA são de rápida contração e resistentes à fadiga (Carpenter e Karpati, 2001).

A nomenclatura que inclui características histoquímicas e fisiológicas tem sido adotada em alguns trabalhos:

a- fibras do tipo I: lenta contração e oxidativa;

b- fibras do tipo IIB: rápida contração e glicolítica;

c- fibras do tipo IIA: rápida contração e oxidativa e glicolítica.

3.4 Embriologia muscular

A tipagem das fibras musculares pode ser realizada também pela análise da composição das proteínas contráteis, tais como: miosina e suas isoformas.

A miosina é a principal proteína estrutural do filamento grosso e é altamente polimórfica. Ela é uma proteína estrutural e uma enzima responsável pela atividade ATPásica. Sua função é o ancoramento na linha Z e contração muscular. As fibras musculares são classificadas de acordo com a sua característica fisiológica mais importante que é a velocidade de contração.

As fibras musculares podem ser de dois tipos: contração lenta e contração rápida. Existem diferentes isoformas quimiomecânicas de miosina

que são bons marcadores para distinção dos diferentes tipos de fibras funcionais. Portanto, no músculo adulto, as fibras tipo I de contração lenta expressam miosina lenta, enquanto as fibras tipo II de contração rápida expressam miosina rápida (Dubowitz, 1985).

A composição da isoforma da miosina varia com o processo de maturação da fibra muscular.

A descrição da miogênese foi publicada por Sarnat (1994) que descreveu etapas do desenvolvimento embrionário da musculatura esquelética, a partir do conhecimento de sua dupla origem: ectodérmica e mesodérmica. No período pré-mioblástico (0 a 5ª semanas gestacionais), o ectoderma se diferenciará em somitos que originarão a derme e as células musculares primárias, os miócitos. O mesoderma lateral se diferenciará em perimísio e endomísio. No período mioblástico (5ª a 8ª semanas gestacionais), os mioblastos, provavelmente células mesodérmicas indiferenciadas, tornam-se filamentos finos de actina acumulados e não organizados paralelamente. Como todo processo de indução, a origem dos mioblastos é determinada geneticamente.

No período miotubular (8ª a 15ª semanas gestacionais), ocorre a fusão dos mioblastos em sincício multinuclear, tubulares, com os filamentos finos de actina alinhados paralelamente na periferia. Os filamentos grossos de miosina são sintetizados e localizados na região central dos miotúbulos.

O processo de fusão dos miotúbulos progride com a participação de filamentos extracelulares de actina. Surgem neste período outros filamentos intermediários, vimentina e desmina, integrando-se ao

citoesqueleto do miotúbulo. Por volta da 11ª semana de gestação surge a proteína distrofina na membrana subsarcolemal. A inervação da musculatura ocorre entre a 11ª-12ª semanas de gestação, na metade do estágio miotubular através de terminações nervosas, as quais se formam a partir da 9ª semana de gestação. No período miocítico (10ª a 20ª semanas de gestação), ocorre a diminuição da fusão dos miotúbulos e da atividade mitótica dos mioblastos precursores. As fibras musculares crescem em comprimento pela adição de sarcômeros terminais. Nesta fase, ocorre a reestruturação das miofibrilas, a diminuição de vimentina e desmina e o surgimento de miosina neonatal várias isoformas de cadeia pesada e leve. A diferenciação entre as isoformas de miosinas ocorre durante a gestação e após o nascimento, sendo este processo influenciado pela inervação e pelo tipo histológico das fibras.

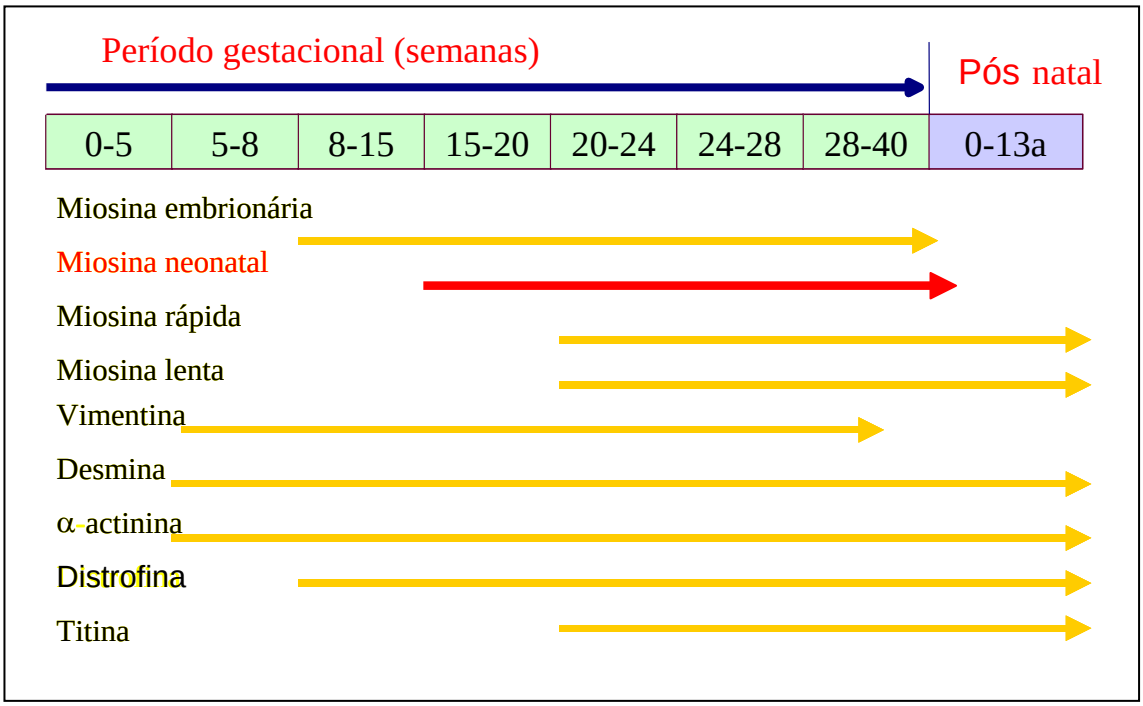


Figura 1: Representação embrionária

A miosina neonatal é uma proteína encontrada nas fibras em desenvolvimento, mais precisamente nos mioblastos rápidos, não sendo observada em fibras maduras. Sua expressão e identificação, além do período de desenvolvimento gestacional da fibra muscular, poderão ser decorrentes de processo de regeneração (Sarnat, 1991; Vajsar, 1993; Hamalainen, Pette, 1995).

Durante o desenvolvimento muscular, as isoformas de miosina sofrem transição de embrionária para neonatal, seguindo à forma adulta, sendo que as isoformas da cadeia pesada de miosina da fase de desenvolvimento são totalmente substituídas pelas isoformas rápida e lenta em fibras normais de músculos esqueléticos apendiculares e tronculares em adultos. As isoformas

de miosina específicas de estágios de desenvolvimento são expressas além desse período em alguns músculos crânio-faciais como masseter e extra-ocular. (Pette,1990).

Monemi (1999) encontrou 26,8% de miosina neonatal na região anterior superficial no músculo masseter de idosos, já na região superficial posterior a percentagem foi de 7%, e na região profunda de 12,5%.

A miosina neonatal está presente no músculo masseter ao longo da vida e existe um aumento em sua quantidade relativa durante o avanço da idade. A análise de PCR revela a presença de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) em adultos idosos. (Monemi, 1996).

3.5 Capacidade adaptativa muscular

Os tipos de fibras de um músculo são determinados pela unidade motora e o motoneurônio que inerva a fibra muscular determina o seu tipo. No entanto, se a fibra muscular for inervada por outro motoneurônio, diferente da original, esta irá mudar as suas características de acordo com a inervação atual. Isto indica a flexibilidade e adaptação dos tipos de fibras. Outros fatores também podem influenciar o tipo de fibra, como por exemplo, exercício físico aeróbio tende a aumentar a proporção de fibras do tipo I no músculo exercitado (Carpenter, Karpati, 2001).

As fibras apresentam alterações fenotípicas em resposta ao padrão do impulso nervoso, mas se admite também a existência de uma regulação

miogênica na sua determinação fenotípica. A regulação miogênica ocorre da seguinte forma: durante o desenvolvimento os mioblastos lentos primários apresentam miosina embrionária e lenta, persistindo apenas a miosina lenta na fibra muscular adulta; já, os mioblastos rápidos primários apresentam miosina embrionária e perinatal que são trocadas pelas isoformas rápidas nas fibras maduras. Portanto, a diferenciação entre fibras lentas e rápidas já ocorre na fase de mioblastos, época de inervação múltipla, trazendo evidências de que exista uma regulação miogênica para esta diferenciação (Gambke & Rubinstein, 1984; Kelly & Rubinstein, 1994; Ghosh & Dhoot, 1998).

A musculatura esquelética de mamíferos adultos possui grande capacidade de adaptação a demandas fisiológicas, como no crescimento, no treinamento e no trauma. Sendo as fibras musculares esqueléticas adultas caracteristicamente bem diferenciadas.

A idade pode prejudicar a função muscular, levando à diminuição da velocidade de contração (Booth et al., 1994). A idade está relacionada à mudanças na composição dos tipos de fibras (Monemi, 1998). As mudanças no número de capilares, alteração na composição dos tipos de fibras dos músculos da mastigação são as reações adaptativas mais freqüentes mencionadas na literatura (Hammarsten et al., 1980, Esbjornsson et al.,1993).

3.6 Calibre das fibras musculares

Os músculos apendiculares são compostos de fibras do tipo I e do tipo II em proporções e diâmetros aproximadamente iguais, sendo que o diâmetro dos músculos da mastigação e orofaciais são quase 50% menores que dos músculos apendiculares (Stal, 1987)

Geralmente as fibras dos músculos da mastigação são menores que as fibras de músculos esqueléticos apendiculares. O fato de apresentarem menor diâmetro facilita e aumenta a troca de oxigênio e nutrientes, consequentemente melhora a resistência à fadiga, especialmente nas fibras rápidas. Portanto, o menor diâmetro pode ser considerado uma vantagem dos músculos da mastigação (Korfage, 2005).

Claramente a atrofia contribui para a fraqueza por diminuir o calibre das fibras musculares, o que reduz a geração de força de contração. Mudanças na tipagem celular que ocorrem com a atrofia também afetam a habilidade muscular de sustentar a contração. Essa fadiga muscular leva a limitação funcional (Michael, 2000).

3.7 Capilares

O fluxo sanguíneo é responsável pela nutrição das células, energia e transporte de oxigênio ao tecido muscular, mantendo a homeostasia no músculo ativo, porém quando não é suficiente, pode levar o tecido à

isquemia, crise de energia e acúmulo de substâncias que sensibilizam os nociceptores musculares que levam à dor (Yu et al, 1992).

As fibras musculares esqueléticas tronculares e apendiculares de contração lenta contém uma rede de vasos sanguíneos e capilares bem mais extensa, para fornecer quantidade extra de oxigênio, enquanto as de contração rápida, tipo II apresentam suprimento sanguíneo menos extenso, visto que o metabolismo oxidativo tem importância secundária, menos mitocôndrias, também pelo papel secundário do metabolismo oxidativo (Guyton e Hall 1996).

O fluxo sanguíneo no músculo masseter é suprido principalmente por 4 grupos de artérias. Na porção superior a vascularização é realizada por ramificações da artéria facial superficialmente e medialmente pela artéria massetérica ramo da artéria maxilar, que corre medialmente e alcança a superfície medial do músculo perto de sua borda anterior. Na porção média do músculo uma ramificação da artéria maxilar, ou algumas vezes diretamente da artéria carótida externa atinge até a borda posterior do ramo da mandíbula até o músculo masseter (Ariji. 2001).

O músculo temporal pode ser dividido em três porções, quanto à vascularização, a anterior que recebe seu suprimento sanguíneo da artéria temporal anterior e profunda, a porção medial que é suprida pela artéria temporal posterior profunda e a porção posterior que é vascularizada pela artéria medial temporal (Burggasser et al., 2002).

Relatos de suprimento capilar em músculos esqueléticos de humanos sedentários são apenas de músculos apendiculares e tronculares, e a

maioria envolvendo músculos da perna. O parâmetro mais usado para descrever densidade capilar é o número de capilares em relação à área muscular (Stal et al., 1996). Schmalbruch (1986), concluiu que não existe diferença significativa na densidade capilar entre vários músculos apendiculares, observando que em média esses músculos apresentaram entre 300-400 capilares por mm^2, também foi mostrado que em exercícios contra resistência os músculos esqueléticos apendiculares apresentaram maior densidade capilar e maior oxigenação quando comparados os músculos não treinados, refletindo a relação entre função muscular e suprimento capilar.

A capilarização dos músculos esqueléticos é influenciada primariamente de acordo com o diâmetro das fibras, e é relativamente independente da tipagem das fibras (Ahmed, 1996).

Em músculos apendiculares uma maior densidade capilar foi observada em fibras do tipo I, em relação às do tipo II. As fibras do tipo I são conhecidas por apresentar maior capacidade oxidativa que as do tipo IIA, e principalmente que as do tipo IIB. A partir de estudos prévios já se sabe que a composição dos tipos de fibras dos músculos mandibulares e orofaciais é qualitativamente e quantitativamente diferente dos músculos apendiculares e tronculares (Eriksson e Thornell, 1994).

Stal et al. (1996) realizaram um estudo onde comparou a capilarização entre dois músculos apendiculares: bíceps braquial e primeiro interósseo dorsal e cinco músculos crânio faciais: zigomático maior e menor, orbicular da boca, bucinador e masseter.

Em relação ao número capilar por mm² o músculo masseter apresentou a maior densidade de 813 capilares por mm², e o bíceps braquial 440 capilares por mm², porém em relação ao número de capilares por fibra muscular o masseter apresentou a menor razão de 0,7 capilar por fibra, enquanto o bíceps a maior de 1,7 capilar por fibra muscular. Esse resultado foi relacionado à diferença de fibras por mm² onde na mesma área foram observadas 998 fibras por mm² no masseter e 250 fibras no bíceps braquial. Os resultados dos músculos apendiculares concordam com a literatura, porém a maior densidade capilar (cap/mm²) foi encontrada no músculo masseter, e até então não havia relato de uma densidade capilar tão alta na literatura. O maior número de capilar por fibra muscular foi encontrado nos dois músculos apendiculares, o que sugere um melhor suprimento capilar nesses músculos em relação aos músculos mandibulares. Entretanto o masseter apresentou uma rede de capilar mais extensa. Essa diversidade provavelmente reflete as diferenças entre os músculos e sua necessidade de suprimento sanguíneo em relação ao seu estado funcional.

Vários métodos imuoistoquímicos têm sido utilizados para análise dos capilares em músculos esqueléticos. Ulex europaeus agglutinin I - lectin (UEA I) é o método mais sensível e confiável como marcador endotelial quando comparado ao Von Willebrand factor (Stephenson et al., 1986). Com o método Ulex, os capilares são frequentemente mais fortemente e melhor marcados o que torna mais fácil o reconhecimento dos capilares (Qu et al., 1997).

Parsons et al., (1993) revelaram que capilares marcados por ULEX europaeus I, revelaram 6% mais capilares em relação ao método PAS amilase na mesma área.

Estudos com eletromiografia mostraram que pacientes que sofrem de DTM e cefaléia do tipo tensional, quando mastigam, apresentam uma contração mais longa e intensa, levando a distúrbios circulatórios aos músculos afetados (Christensen, 1981).

Os achados de Delcanho (1996) reforçaram o conceito de que indivíduos com dor muscular crônica após contração isométrica apresentam uma recuperação alterada devido a hipóxia.

Tendo em vista que a DTM de origem muscular apresenta etiologia idiopática, torna-se evidente a relevância de um estudo detalhado morfofuncional dessa musculatura levando-se em conta sua composição, metabolismo e função.

4 MÉTODOS

Foram obtidas 60 amostras dos músculos da mastigação (Anexo A), masseter e temporal, no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (São Paulo) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, conforme as normas e autorização do serviço e do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (Anexo B), com intervalo *pós-mortem* de até 18 horas, de ambos os sexos, de idades divididas por décadas (1ª a 9 ª décadas) no período de 28 de abril de 2006 a 04 de dezembro de 2007.

Os critérios de exclusão adotados foram:

- Indivíduos portadores de doenças infecto-contagiosas como AIDS e Hepatite
- Presença de infiltrado inflamatório e de tecido conjuntivo nos músculos coletados.

Tabela 1: população de estudo

Décadas	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**4ª**	**5ª**	**6ª**	**7ª**	**8ª**	**9ª**
Homem	4	1	3	6	5	6	5	4	3
Mulher	2	2	1	1	3	5	3	4	2

4.1 Caracterização das amostras musculares:

Os músculos utilizados para este experimento foram: masseter e temporal, sendo que o músculo masseter foi retirado de sua porção profunda, por via extra oral e o músculo temporal foi retirado de sua porção superficial média via superior, quando da abertura do crânio para retirada do encéfalo.

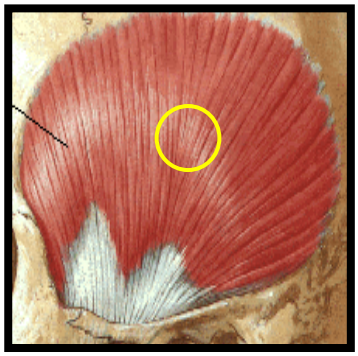


Fig 2: músculo temporal

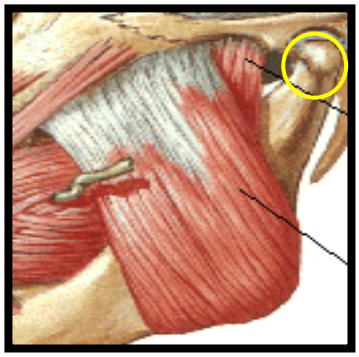


Fig 3:músculo masseter

O tamanho da amostra foi de 2X2X1cm. Logo após a retirada o músculo foi envolto em gaze umedecida em solução salina isotônica. Na bancada de congelação, o músculo foi preparado, sendo retirado o excesso de tecido adiposo, fáscia e nervos, que porventura acompanhassem o fragmento. O espécime foi recoberto com talco neutro, no sentido transversal das fibras e a seguir congelado diretamente em nitrogênio líquido a 170ºC negativos, por imersão direta, permanecendo mergulhado no nitrogênio líquido até seu completo congelamento. Os cortes foram realizados em criostato a -25ºC, em lâminas silanizadas, com 6µm de espessura, estocadas à -80ºC até os procedimentos histológicos e imunohistoquímicos.

4.2 Histologia

A coloração histológica usualmente empregada em rotina de análise de biópsia muscular esquelética em congelação é a hematoxilina-eosina (HE) (Anexo C). Nesta coloração os núcleos se apresentam em cor azul-violeta, fibras em rosa e tecido conjuntivo em rosa claro. Fibras basofílicas podem ser reconhecidas pela sua cor azulada. Estriações não são visíveis.

Todas as lâminas foram coradas por HE e avaliadas. Os casos que preencheram critérios de exclusão de infiltrado inflamatório, proliferação de tecido conjuntivo e músculos coletados de indivíduos portadores de doenças infecto-contagiosas foram excluídos do presente estudo.

4.3 Imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico das fibras musculares foi realizado por método de imunoperoxidase StreptABComplex/HRP através da utilização de anticorpos comerciais primários específicos para cada proteína do estudo, realizada em material congelado segundo o protocolo a seguir:

Tabela 2: anticorpos utilizados:

Anticorpo	Empresa	Clone	Diluição	Marcação
Ulex europaeus biotinilada Aglutinina I	Vector	B-1065	1/800	Células endoteliais
Anti-miosina Neonatal	Novocastra	WB-MHCn	1/20	Miosina neonatal
Anti-miosina rápida	WB-MYHCf	Novocastra	1/40	Miosina rápida
Anti-miosina lenta	WB-MYHCs	Novocastra	1/80	Miosina Lenta

Reação imunoistoquímica com amplificação pelo complexo streptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC), de acordo com princípio proposto por Hsu e colaboradores, adaptado às nossas condições laboratoriais.

Os cortes seriados foram fixados em acetona a 4ºC por 10 minutos.

Lavagem em água de torneira e água destilada por 5 minutos cada. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% em metanol, com três trocas de 10 minutos cada.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-tampão fosfato salina) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

Incubação das lâminas com anticorpo específico, diluído em tampão PBS contendo BSA 1.0% e NaN_3 0.1%, durante 30 minutos a 37ºC e em seguida 16 a 18 horas a 4ºC.

Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

Incubação com anticorpo secundário (específico para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário), em câmara úmida: 30 minutos a 37ºC. Na reação com Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABS), o anticorpo secundário deve estar biotinilado;

Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

Incubação com o complexo Streptavidina Peroxidase (Kit LSAB+, DAKO código K0690), pronto para uso, durante 30 minutos a 37ºC.

Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, USA) 0,6%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetilsulfóxido a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, em câmara escura e a 37°C.

O produto final da reação apresenta coloração acastanhada, depositado na região da célula em que ocorreu a ligação do antígeno (Ag) com o anticorpo primário.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagem em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

Desidratação dos cortes em banhos de álcool a 70%, a 95% e absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em Entellan (Merck) com lamínulas.

4.4 Análise imunoistoquímica

A análise da expressão das proteínas obtidas por reações imunoistoquímicas foi realizada por dois observadores, a calibração intra observador, (duas contagens no mesmo campo pelo mesmo observador em tempos diferentes) e inter observador (contagem do mesmo campo por dois observadores), foi realizada até se atingir uma margem de erro menor que 10%. A contagem foi realizada através do Programa CELL.

O programa "CELL" foi desenvolvido pela MEVIS Consultoria de Informática Médica, São Paulo, Brasil, com o objetivo de automatizar o processamento quantitativo e morfométrico de fibras musculares, partindo de imagens obtidas diretamente do microscópio óptico de uma câmara digital.

O "CELL" permite organizar as imagens em estudos, visualizá-las, calibrá-las em mm^2 e realizar a identificação e contagem de até três tipos de células diferentes num mesmo estudo, de forma automática ou semi-automática. Pode -se processar imagens nos formatos tif e jpg.

As imagens são convertidas à forma rgb de 8 bits por canal (24 bits por pixel). O processo de segmentação é baseado em máscaras de cores, com intervalos configuráveis para cada cor primária. Serão introduzidos

algoritmos de rejeição de objetos, baseados em valores limites da área e do fator de forma. O programa admite, também, a interação do pesquisador para o traçado manual das fronteiras.

4.5 Proporção das fibras analisadas

Foram analisadas as correspondências entre a proporção das fibras musculares marcadas com a miosina neonatal e capilares (ulex).

Para a análise e contagem da miosina neonatal foram contadas todas as fibras com marcação positiva na preparação imunoistoquimica e relacionadas com a contagem do número total de fibras. E para a reação com ULEX, foram contados o número total de capilares e relacionados com o número total das fibras e com a área total de cada campo, ou seja capilares por fibras e capilares por milímetro quadrado, foram analisadas pelo menos 500 fibras por caso, com aumento de 200 vezes.

4.6 Histograma da distribuição e diâmetro das fibras musculares

A distribuição do calibre das fibras de contração lenta e rápida das amostras foi realizada em programa de computação CELL em preparação

de imunoistoquímica com anticorpos anti-miosina lenta e anti-miosina rápida, segundo o protocolo anteriormente descrito.

Estas reações foram realizadas em conjunto com a pós graduanda Thatiana Bastos Guimarães, que utilizou as mesmas reações para análise de distribuição do tipo de fibras.

Os resultados foram apresentados na forma de histogramas e tabelas. O programa "CELL" foi desenvolvido adaptado para PC, com Windows 95198, com processador Intel Pentium li, 64 Mbytes de RAM e placa de vídeo SVGA 1280x1 024 True Color.

Foi realizado o histograma de expressão positiva de miosina neonatal, capilares por fibras, densidade capilar e diâmetro das fibras musculares.

4.7 Análise estatística

Para comparação de 2 grupos (comparação entre os gêneros e masseter e temporal) utilizou-se teste t de Student ou teste de Mann-Whitney.

Na comparação de 3 grupos (grupos etários: jovens adultos e idosos) utilizou-se a técnica de Análise de Variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 População de estudo

Foi coletado para o presente estudo um total de 60 amostras, sendo 24 amostras do gênero feminino e 36 amostras do gênero masculino.

A idade dos 24 indivíduos do gênero feminino, por ocasião da realização da autópsia, variou de 1 mês a 87 anos, completando as 9 décadas. Das 24 amostras coletadas 17 foram incluídas e 7 excluídas pelo diagnóstico final da autópsia de doenças infecciosas, por apresentarem infiltrado inflamatório, ou proliferação do tecido conjuntivo, na análise morfológica pela HE.

A idade dos 36 indivíduos do gênero masculino, por ocasião da realização da autópsia, variou de 1 mês a 87 anos, completando as 9 décadas. Das 36 amostras coletadas 20 foram incluídas e 16 excluídas do estudo pelos mesmos motivos citados acima.

As amostras incluídas no presente estudo estão discriminadas na tabela 3.

Tabela 3: distribuição do número de casos estudados por década nos gênero feminino e masculino

	Décadas								
	1°	**2°**	**3°**	**4°**	**5°**	**6°**	**7°**	**8°**	**9°**
Feminino	2	2	1	1	2	3	2	2	2
Masculino	2	1	2	3	3	2	2	3	2

5.2 Capilar por fibras

Os resultados da contagem do número de capilares dividido pelo número de fibras, separados por décadas estão discriminados na tabela 4 (feminino) e tabela 5 (masculino), seguidos de seus gráficos 1 (feminino) e 2 (masculino).

Tabela 4: número de capilares por fibras no gênero feminino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		Capilar/fibra	Média (DP)	Capilar/fibra	Média (DP)
Feminino	1	0,43	0,32 (0,16)	0,47	0,42 (0,07)
	1	0,21		0,37	
	2	0,75	0,76 (0,014)		
	2	0,77		0,45	
	3	0,62		0,46	
	4	0,54		0,41	
	5	0,78	0,77 (0,02)	0,78	0,77 (0,02)
	5	0,75		0,75	
	6	0,83		0,5	
	6	1,4	0,74 (0,39)	0,97	0,65 (0,24)
	6	0,65		0,8	
	7	0,5	0,51 (0,021)		
	7	0,53		0,9	
	8	0,47	0,51 (0,05)	0,84	0,96 (0,17)
	8	0,54		1,08	
	9	0,98	0,76 (0,32)	0,69	0,65 (0,06)
	9	0,53		0,6	

Tabela 5: número de capilares por fibras no gênero masculino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		Capilar/fibra	Média (DP)	Capilar/fibra	Média (DP)
Masculino	1	0,28	0,24 (0,06)	0,17	0,21 (0,05)
	1	0,2		0,24	
	2	0,91		0,62	
	3	0,46	0,67 (0,3)	0,88	0,77 (0,16)
	3	0,88		0,65	
	4	0,7		1,19	
	4	0,72	0,73 (0,04)	0,71	0,78 (0,38)
	4	0,78		0,44	
	5	0,5		0,95	
	5	0,73	0,66 (0,14)	0,77	0,76 (0,2)
	5	0,74		0,56	
	6	0,76	0,71 (0,07)	0,84	0,72 (0,18)
	6	0.66		0,59	
	7	0,64	0,94 (0,42)	0,68	0,75 (0,09)
	7	1,23		0,81	
	8	0,62		0,47	
	8	0,55	0,55 (0,1)		0,48 (0,01)
	8	0,48		0,49	
	9	0,66	0,72 (0,59)	0,59	0,47 (0,16)
	9	1,5		0,82	

Gráfico1: capilar por fibra no grupo feminino

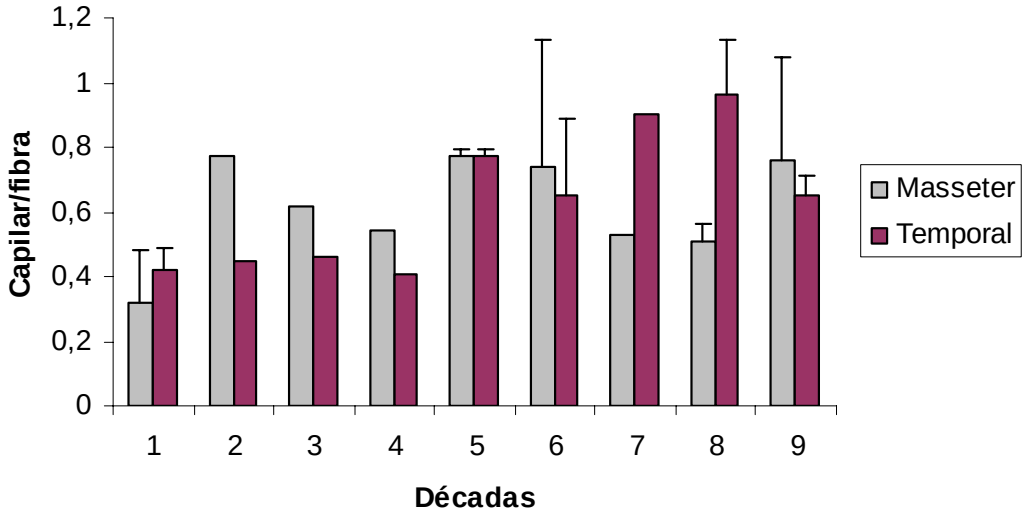
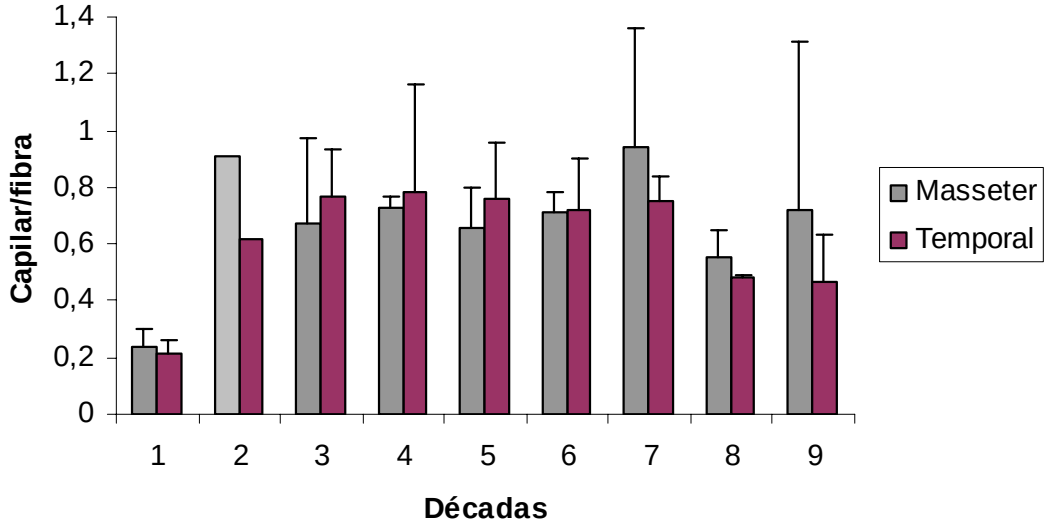


Gráfico 2: capilar por fibra no grupo masculino



O número de amostras por década não foi suficiente para permitir a análise estatística e, portanto agrupou-se as amostras por grupo etário

considerando-se grupo jovem (0 - 24 anos), grupo adulto (25 – 59 anos) e grupo idoso (acima de 60 anos).

A análise dos resultados com este tipo de grupamento é apresentado a seguir.

Tabela 6: número de capilar por fibra nos grupos etários nos músculos masseter e temporal

Músculo		**Grupo etário**			**p**
		Jovem n=8	**Adulto n=16**	**Idoso n =13**	
Masseter	Média (DP)	0,5 (0,26)	0,75 (0,20)	0,74 (0,34)	0,092
	Mediana	0,45	0,73	0,53	
	Min – max	0,21 - 0,91	0,5 - 1,41	0,47 - 1,51	
	Fem Média (DP)	0,47 (0,28)	0,80 (0,28)	0,61 (0,21)	
	Masc Média (DP)	0,46 (0,32)	0,72 (0,1)	0,86 (0,41)	
Temporal	Média (DP)	0,51 (0,23)	0,72 (0,22)	0,72 (0,23)	0,077
	Mediana	0,46	0,78	0,69	
	Min – max	0,17 - 0,88	0,41 - 1,19	0,34 - 1,1	
	Fem Média (DP)	0,43 (0,05)	0,67 (0,21)	0,82 (0,19)	
	Masc Média (DP)	0,48 (0,33)	0,74 (0,23)	0,64 (0,15)	

O número de capilares por fibras foi praticamente similar nos músculos masseter e temporal, sendo de 0,45 e 0,46 em jovens, 0,75 e 0,78 em adultos e 0,53 e 0,69 em idosos (p=0,092 e 0,077 respectivamente).

Os resultados estão apresentados na Tabela 6, e a representação gráfica no gráfico 3.

Gráfico 3: número de capilar por fibra nos grupos etários nos músculos masseter e temporal

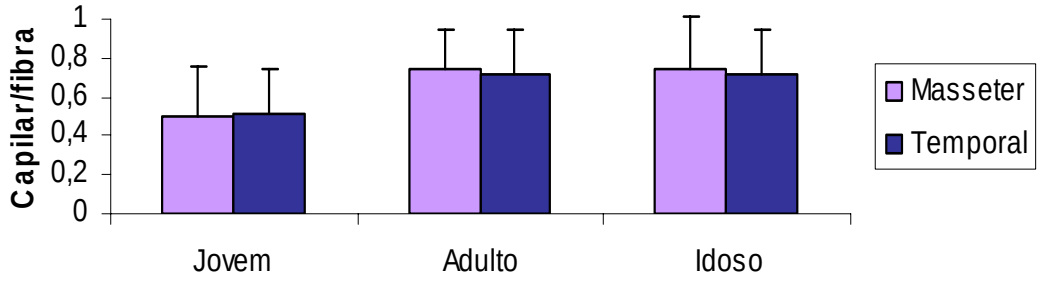
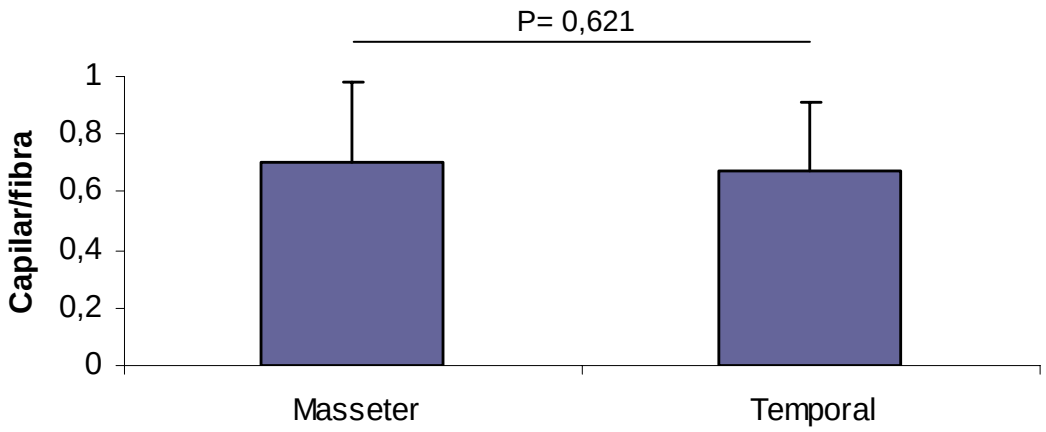


Tabela 7: resultados de capilar/fibra segundo as variáveis músculos Masseter e Temporal

	Músculo		**Diferença**
	Masseter	**Temporal**	**Temporal – Masseter**
Capilar/Fibra n = 37			
média (dp)	0,70 (0,28)	0,67 (0,24)	-0,02 (0,28)
mediana	0,66	0,68	0
mínimo – máximo	0,21 – 1,51	0,17 – 1,19	-0,67 – 0,55

Gráfico 4: número de capilar por fibra nos músculos masseter e temporal

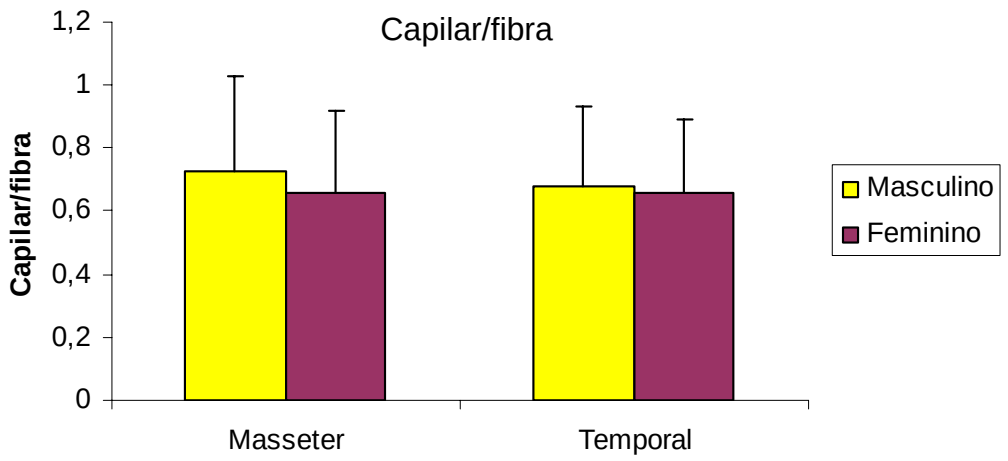


O número de capilares por fibras foi praticamente similar nos músculos masseter e temporal, sendo respectivamente 0,66 e 0,68.

Tabela 8: resultados de capilar por fibra segundo as variáveis gênero e músculos masseter e temporal

	Masculino	**Feminino**
	(n = 20)	**(n = 17)**
Masseter		
média (dp)	0,73 (0,30)	0,66 (0,26)
mediana	0,71	0,62
mínimo – máximo	0,28 – 1,51	0,21 – 1,41
comparação	p = 0,495	
Temporal		
média (dp)	0,68 (0,25)	0,66 (0,23)
mediana	0,66	0,69
mínimo – máximo	0,17 – 1,19	0,34 – 1,08
comparação	p = 0,756	

Gráfico 5: capilar por fibra nos grupos masculino e feminino



O número de capilares por fibras foi praticamente similar nos músculos masseter (gênero feminino 0,71 e masculino 0,62) e temporal (gênero feminino 0,66 e masculino 0,69), não apresentando significância estatística, (p=0,495 e p=0,756).

O número de capilares pode ser calculado ainda pelo número de capilares por área (densidade capilar). Esta análise foi realizada adicionalmente, porque, observou-se uma redução do calibre das fibras tipo II, o que pode propiciar uma queda irreal no número de capilar/fibras, se este for calculado pelo número de fibras. A análise da densidade capilar é apresentada a seguir.

5.3 Densidade Capilar

Os resultados da contagem do número de capilares mm², separados por décadas estão discriminados na tabela 9 (feminino) e tabela 10 (masculino), seguidos de seus gráficos 6 (feminino) e 7 (masculino).

Tabela 9: densidade capilar no gênero feminino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		Capilar/mm²	Média (DP)	Capilar/mm²	Média (DP)
Feminino	1	214	211,5 (3,54)	243	226 (24,04)
	1	209		209	
	2	198	199 (1,41)	140	138 (2,12)
	2	200		137	
	3	180		141	
	4	120		121	
	5	21	68,5 (67,18)	188	154 (48,08)
	5	116		120	
	6	115	194,67 (107,55)	100	129,33 (35,64)
	6	317		119	
	6	152		169	
	7	160	159 (0,7)	170	172,5 (3,53)
	7	159		175	
	8	134	135,5 (2,12)	173	98 (106,07)
	8	137		23	
	9	285	228,5 (79,9)	185	150 (49,5)
	9	172		115	

Tabela 10: densidade capilar no gênero masculino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		Capilar/mm²	Média (DP)	Capilar/mm²	Média (DP)
Masculino	1	360	361 (2,12)	260	262 (2,82)
	1	363		264	
	2	252		108	
	3	165	176 (15,56)	162	138,5 (33,23)
	3	187		115	
	4	175	206,33	141	158,67 (33,23)
	4	281		197	
	4	163		138	
	5	165	140,67 (42,15)	141	134,67 (35,92)
	5	165		167	
	5	92		96	
	6	124	140,5 (23,33)	190	145 (63,64)
	6	157		100	
	7	126	155 (41,01)	107	165 (82,02)
	7	184		223	
	8	104	102 (2,08)	111	112 (3,6)
	8	100		109	
	8	101		116	
	9	414	155 (76,37)	154	210 (79,2)
	9	306		266	

Gráfico 6: densidade capilar no gênero feminino nos músculos masseter e temporal

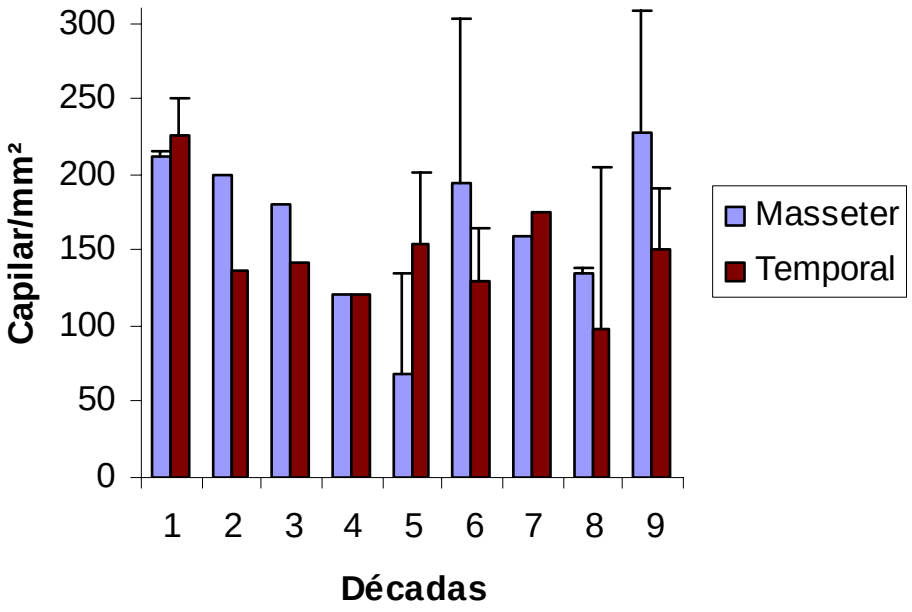
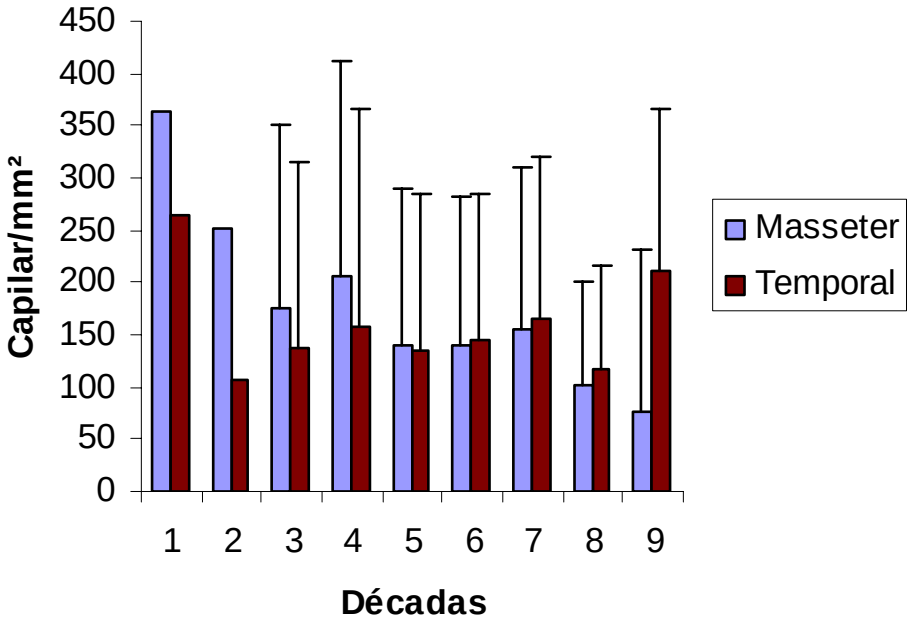


Gráfico 7: densidade capilar no gênero masculino nos músculos masseter e temporal



O número de amostras por década não foi suficiente para permitir a análise estatística e, portanto agrupou-se as amostras por grupo etário considerando-se grupo jovem (0 - 24 anos), grupo adulto (25 – 59 anos) e grupo idoso (acima de 60 anos).

A análise dos resultados com este tipo de grupamento é apresentado a seguir na tabela 11.

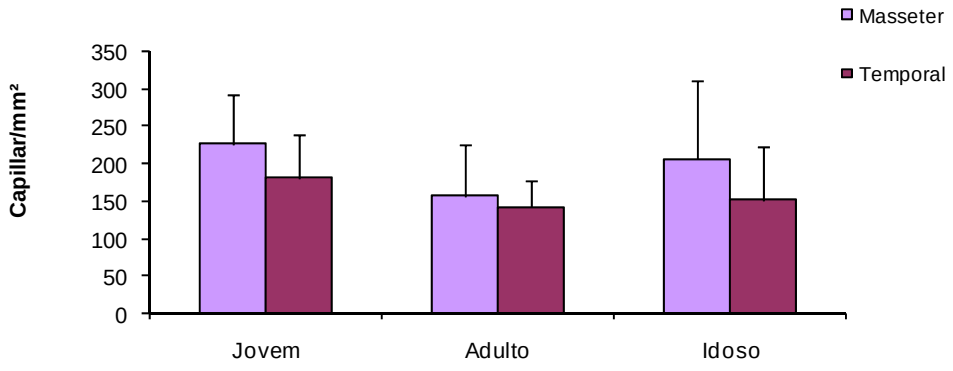
Tabela 11: densidade capilar por grupo etário nos músculos masseter e temporal

		Grupo etário			
		Jovem n=8	**Adulto n=16**	**Idoso n =13**	**p**
Masseter	Média (DP)	226,1 (66,3)	156,8 (68,8)	206,6 (105,2)	0,125
	Mediana	209	158	172	
	Min - max	165 – 363	21 – 317	101 – 414	
	Fem Média (DP)	200,7 (15)	156 (43)	248 (65)	
	Masc Média (DP)	205 (24)	163 (32)	239 (89)	
Temporal	Média (DP)	180,6 (58,8)	142,3 (34,4)	151,3 (71,5)	0,285
	Mediana	162	140	154	
	Min - max	108 – 264	96 – 197	23 – 266	
	Fem Média (DP)	178,4 (67)	139,5 (75)	149,3 (83)	
	Masc Média (DP)	159 (48)	146,7 (65)	157 (49)	

A densidade capilar foi praticamente similar nos músculos masseter e temporal, sendo de 226 e 180 em jovens, 156,8 e 142,3 em adultos e 206,6 e 151,3 em idosos (p=0,125 e 0,285 respectivamente).

Os resultados estão apresentados na Tabela 4, e a representação gráfica no gráfico 3.

Gráfico 8: Densidade capilar nos grupos etários, músculos masseter e temporal

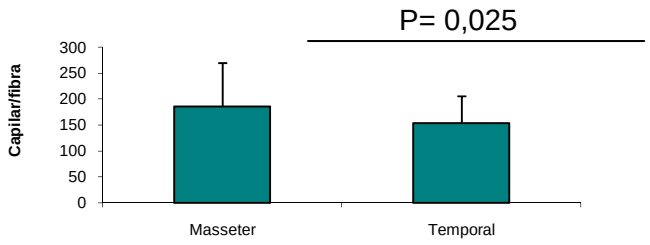


A tabela 12 representa os resultados de densidade capilar segundo as variáveis músculos Masseter e Temporal seguido de sua representação gráfica, no histograma 9.

Tabela 12: densidade capilar nos músculos masseter e temporal

	Músculo		**Diferença**
	Masseter	**Temporal**	**Temporal - Masseter**
Capilar/Fibra n = 37			
média (dp)	186,0 (83,2)	153,2 (52,8)	-32,8 (78,6)
mediana	165	141	-21,5
Mínimo – máximo	21 – 414	23 – 266	-260 – 167

Gráfico 9: Densidade capilar nos músculo masseter e temporal

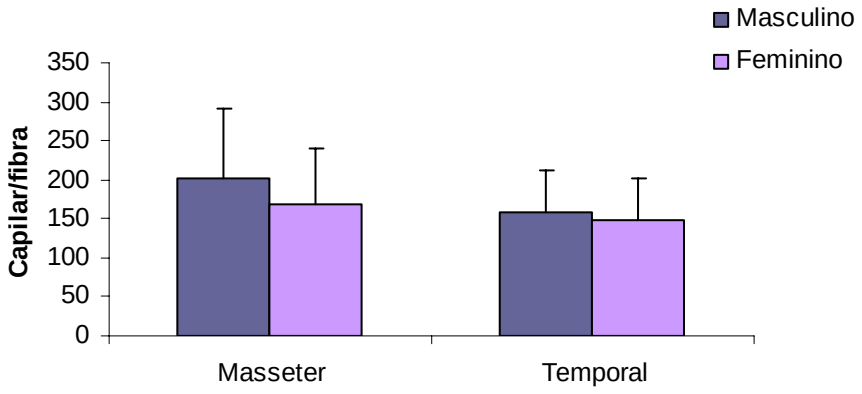


A densidade capilar foi maior no músculo masseter, estatisticamente significante.

Tabela 13: densidade capilar nos gêneros masculino e feminino, nos músculos masseter e temporal.

	Masculino	**Feminino**
	(n = 20)	**(n = 17)**
Masseter		
média (dp)	201,2 (91,3)	168,7 (72,1)
Mediana	165	159
mínimo – máximo	92 – 414	21 – 317
comparação	p = 0,278	
Temporal		
média (dp)	157,9 (54,0)	147,9 (52,8)
Mediana	141	141
mínimo – máximo	96 – 266	23 – 243
comparação	p = 0,599	

Gráfico 10: número de capilar por fibra no gênero masculino e feminino nos músculos masseter e temporal.



O número de densidade capilar foi praticamente similar nos músculos masseter (gênero feminino 168,7 e gênero masculino 201,2) e temporal (gênero feminino 147,9 e gênero masculino 157,9), não apresentando significância estatística, (p=0,278 e p=0,599).

5.4 Miosina neonatal

O resultado da contagem de miosina neonatal foi dividido por décadas, e discriminados na tabela 14 (gênero feminino) e tabela 15 (gênero masculino) seguido de seus gráficos 11 e 12.

Tabela 14: expressão positiva de miosina neonatal no gênero feminino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		% Miosina Neonatal	Média (DP)	% Miosina Neonatal	Média (DP)
Feminino	1	21,53	51,28 (42,07)	16,43	52,64 (51,2)
	1	81,03		88,84	
	2	5,38	10,33 (6,99)	4,29	
	2	15,27		34,49	19,39 (21,35)
	3	18,81		5,6	
	4	0		5,73	
	5	73,3	37,58 (50,52)	0,22	4,43 (5,95)
	5	1,85		8,63	
	6	3,08		3,13	
	6	86,5	50,97 (43,06)	51,92	
	6	63,32		6,77	20,61 (27,18)
	7	25,05		11,91	
	8	40,27	25,73 (20,57)	23,24	
	8	11,18		8,85	16,05 (10,18)
	9	31,63	16,22 (21,8)	12,76	
	9	0,8		27,2	19,98 (10,21)

Tabela 15: expressão positiva de miosina neonatal no gênero masculino

	Décadas	Masseter		Temporal	
		% Miosina Neonatal	Média (DP)	% Miosina Neonatal	Média (DP)
Masculino	1	93,39	74,8 (26,3)	57,85	62,15 (6,08)
	1	56,2		66,45	
	2	63,85		17,18	
	3	85,39	43,12 (59,78)	60,68	31,11 (41,82)
	3	0,85		1,54	
	4	52,49	36,69 (13,95)	37,64	40,5 (8,44)
	4	26,05		33,86	
	4	31,54		50	
	5	82,77	51,93 (41,7)	33,55	33,95 (23,16)
	5	4,48		11	
	5	68,54		57,31	
	6	3,14	9,16 (8,51)	21,22	22,55 (1,88)
	6	15,17		23,88	
	7	81,28	72,38 (12,59)	30,09	48,66 (26,26)
	7	63,47		67,23	
	8	30,6	28,95 (2,34)	0,58	1,32 (1,04)
	8	27,29		2,05	
	9	77,03	62,86 (20,04)	62,95	37,07 (36,61)
	9	48,69		11,18	

As figuras 4 e 5 representam as porcentagens destacadas nas tabelas 14 e 15..

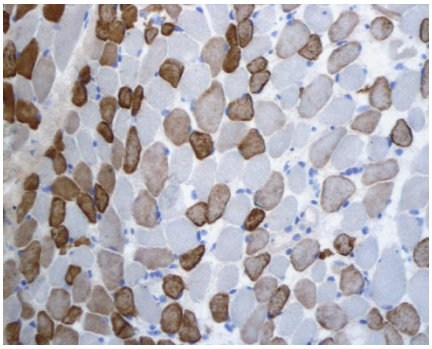
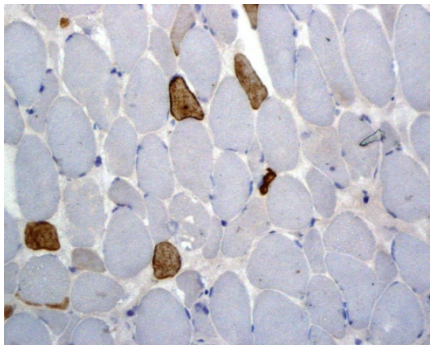
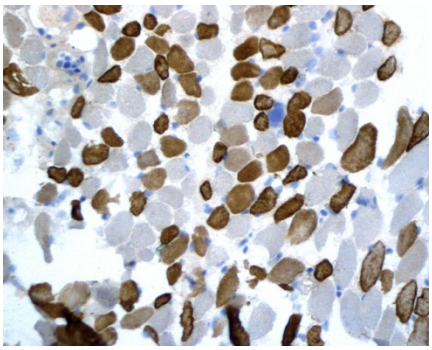
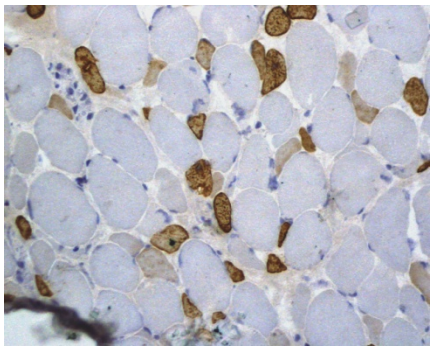
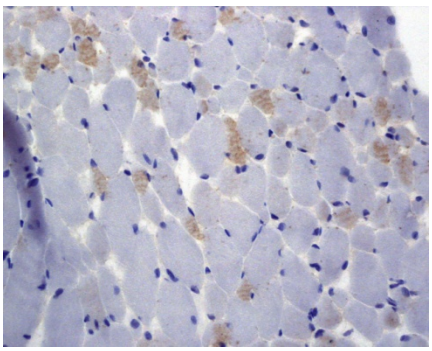
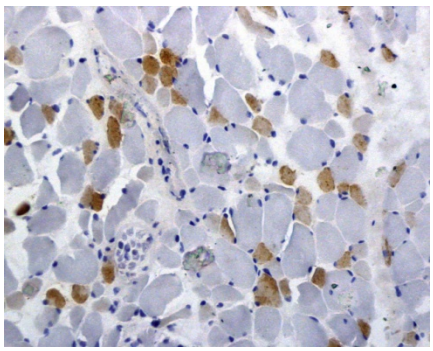
	Masseter	Temporal
5° década		
6°década		
7° década		

Figura 4: Coloração neonatal, gênero feminino

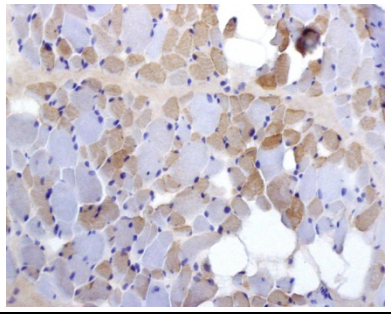
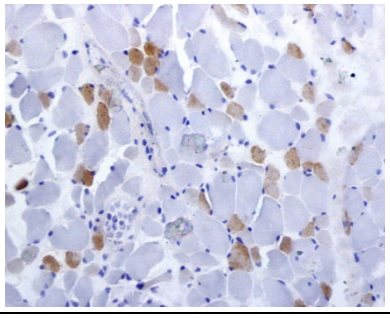
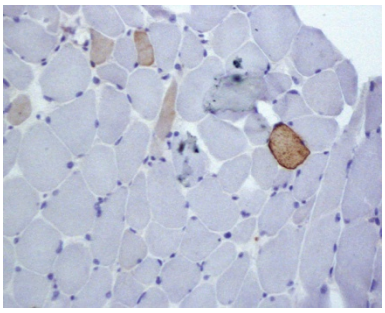
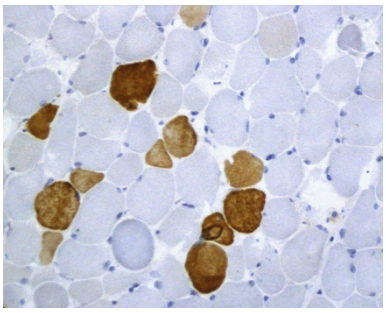
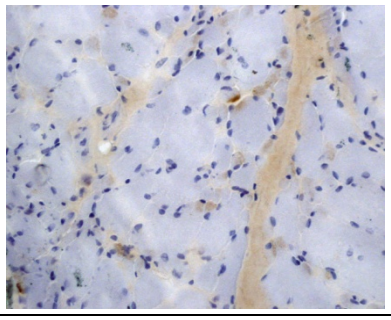
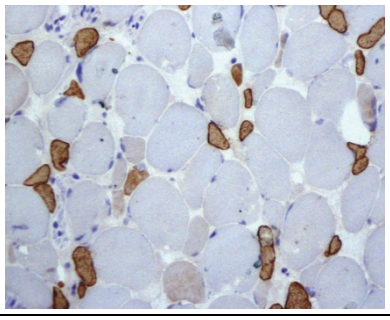
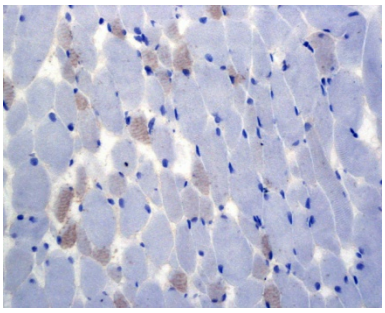
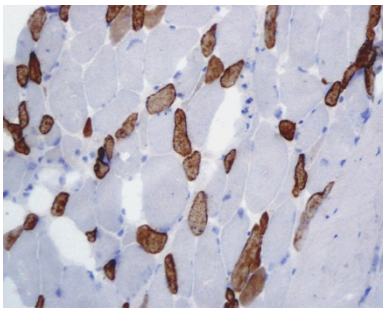
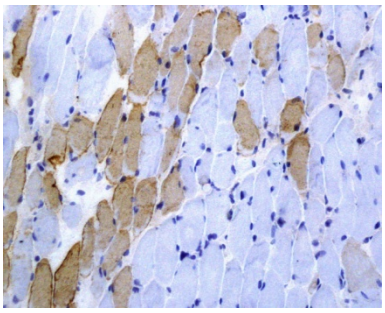
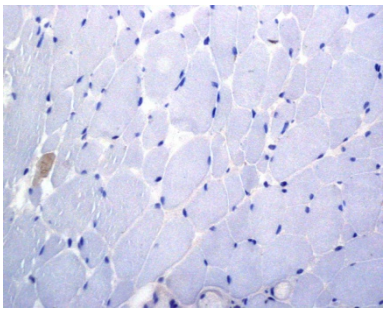
	Masseter	Temporal
2° década		
3° década		
5°década		
6° década		
7° década		

Figura 5: Coloração neonatal, gênero masculino

Gráfico 11: expressão positiva de miosina neonatal no gênero feminino

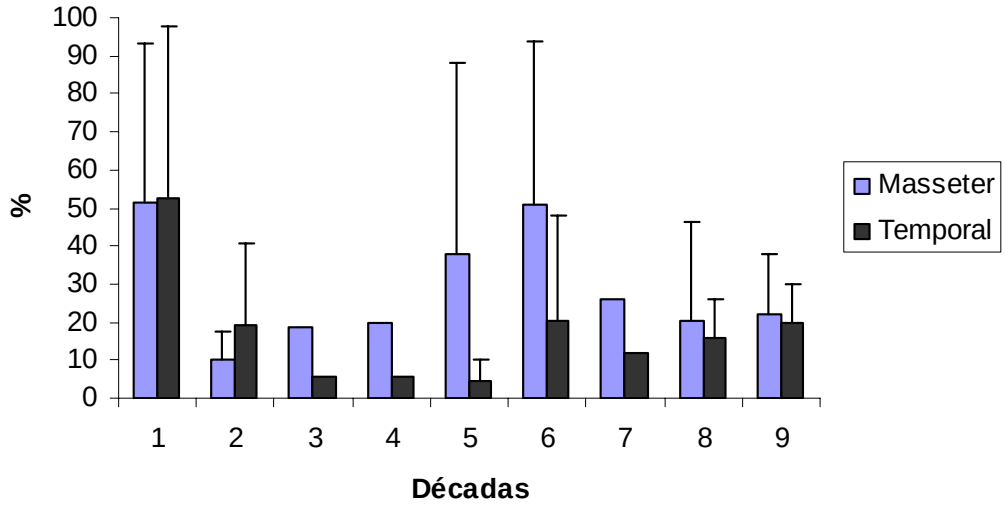
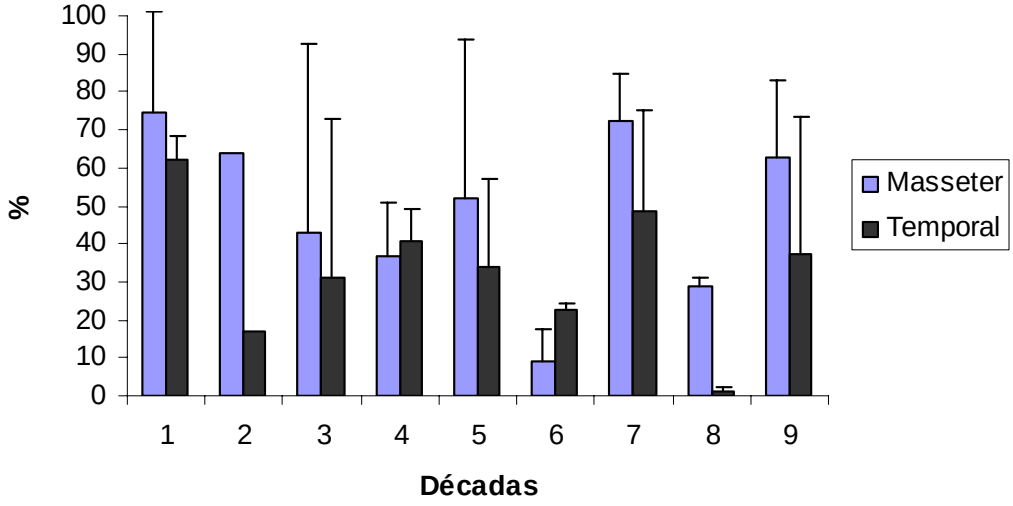


Gráfico 12: expressão positiva de miosina neonatal no gênero masculino



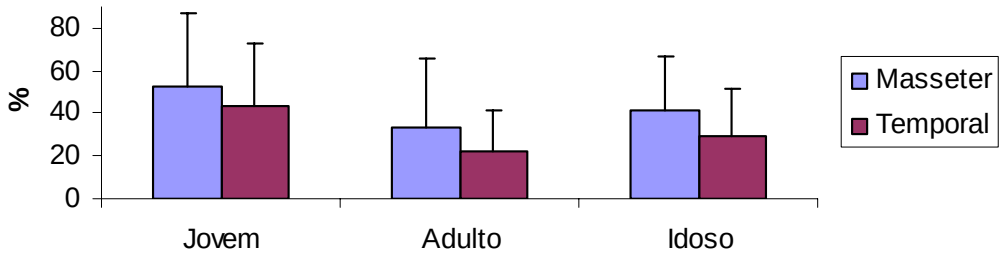
O número de amostras por década não foi suficiente para permitir a análise estatística e, portanto agrupou-se as amostras por grupo etário considerando-se grupo jovem (0 - 24 anos), grupo adulto (25 – 59 anos) e grupo idoso (acima de 60 anos).

A análise dos resultados com este tipo de grupamento é apresentado a seguir.na tabela 16, e sua representação em histograma no gráfico 13

Tabela 16: expressão positiva de miosina neonatal nos grupos etários

		Grupo etário			
		Jovem n=8	**Adulto n=16**	**Idoso n =13**	**p**
Masseter	Média (DP)	52,7 (34,4)	33,2 (32,4)	41,6(25,3)	0,348
	Mediana	60	22,4	35,9	
	Min - max	5,4 - 93,4	0,0- 86,5	0,8 - 81,3	
	Fem Média (DP)	30,8 (34,14)	35,27 (37,7)	21,79 (15,83)	
	Masc Média (DP)	74,71 (17,55)	31,67 (30,02)	54,73 (23,02)	
Temporal	Média (DP)	43,3 (29,6)	22 (19,6)	29,4 (22,5)	0,118
	Mediana	46,2	16,1	25,2	
	Min - max	4,3 - 88,8	0,2 - 57,3	2 - 67,2	
	Fem Média (DP)	36,52 (37,34)	35,54 (17,93)	16,79 (7,95)	
	Masc Média (DP)	50,54 (22,53)	30 (17,74)	29,01 (29,89)	

Gráfico 13: expressão positiva de miosina neonatal nos grupos etários



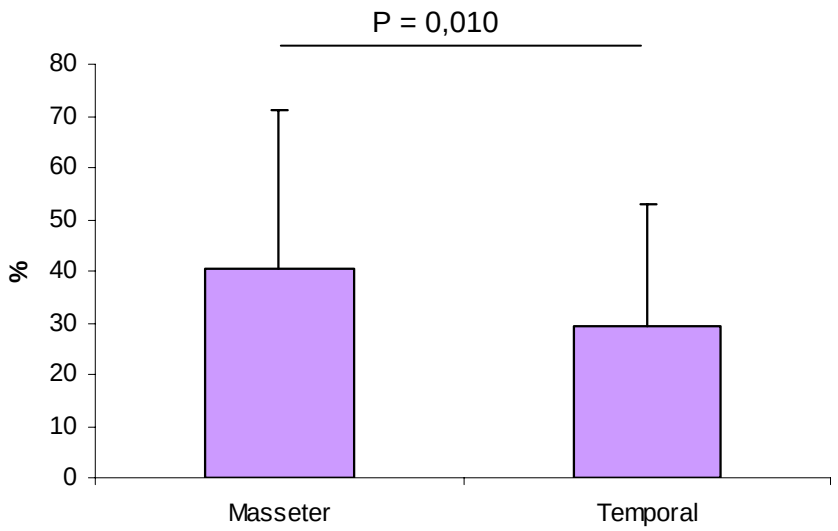
A porcentagem de expressão positiva de miosina neonatal foi praticamente similar nos músculos masseter e temporal e nos grupos etários, não apresentando significância estatística,sendo respectivamente p=0,348 e 0,118.

A tabela 17 representa os resultados da miosina neonatal, segundo as variáveis músculos masseter e temporal seguido de sua representação em histograma no gráfico 13

Tabela 17: expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal

	Músculo		**Diferença**
	Masseter	**Temporal**	**Temporal - Masseter**
Miosina Neonatal n = 37			
Média (dp)	40,4 (30,8)	29,2 (23,8)	-11,2 (24,8)
mediana	31,6	23,6	-8,2
mínimo – máximo	0,0 – 93,4	0,2 – 88,8	-73,1 – 27,4
comparação	p = 0,010 *		

Gráfico 14: expressão positiva de miosina neonatal nos músculos masseter e temporal



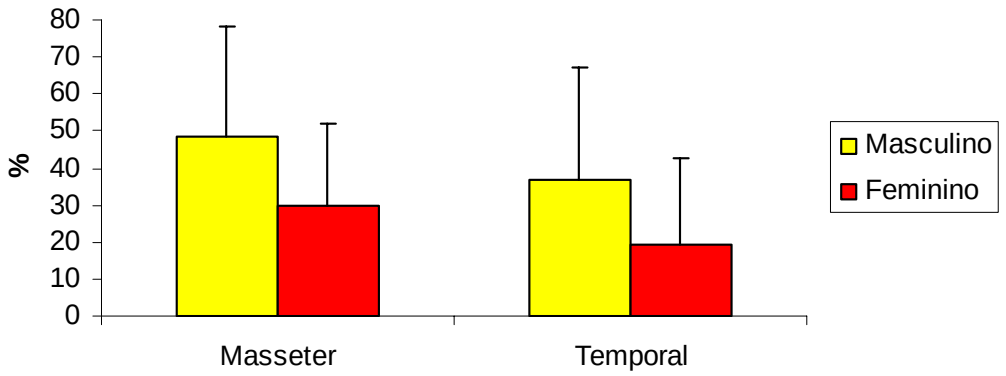
A porcentagem da expressão positiva de miosina neonatal foi estatisticamente significante na amostra total (p=0,010), com maior quantidade no músculo masseter.

A tabela 18 representa os resultados de miosina neonatal segundo as variáveis gênero e músculos masseter e temporal, seguida de sua representação em histograma no gráfico 15

Tabela 18: expressão positiva de miosina neonatal nos gêneros masculino e feminino

	Gênero	
	Masculino	**Feminino**
	(n = 20)	(n = 17)
Masseter		
média (dp)	48,7 (29,4)	29,9 (30,1)
mediana	54,3	20,2
mínimo – máximo	0,8 – 93,4	0,0 – 86,5
comparação	p = 0,068	
Temporal		
média (dp)	37,0 (22,0)	19,4 (23,0)
mediana	35,5	10,4
mínimo – máximo	1,5 – 67,2	0,2 – 88,8
comparação	p = 0,025 *	

Gráfico15: expressão positiva de miosina neonatal nos gêneros masculino e feminino



Resultado de expressão positiva de miosina neonatal segundo a variável gênero, apresentou resultado estatisticamente significante na % de Miosina Neonatal no músculo Temporal (p = 0,025), onde o Grupo masculino apresentou média significantemente maior do que a do Grupo feminino

Diferença não foi significante na percentagem de Miosina Neonatal no músculo Masseter (p = 0,068).

5.5 Diâmetro

A mensuração do diâmetro das fibras musculares está discriminado por décadas na tabela 19 (feminino) e 20 (masculino) seguido de seus gráficos 16, 17, 18 e 19.

Tabela 19: Diâmetro das fibras musculares discriminado por décadas no gênero feminino

		Masseter				Temporal			
	Décadas	rápidas	Média (DP)	lentas	Média (DP)	rápidas	Média (DP)	lentas	Média (DP)
Feminino	1	15,14	14,3 (1,19)	19,53	16,84 (3,8)	15,81	15,4 (0,59)	16,87	18,32 (2,04)
	1	13,46		14,15		14,98		19,76	
	2	39,13	37,53 (2,27)	44,59	44,8 (0,29)	24,02	19,83 (5,93)	27,76	27,67 (0,13)
	2	35,92		45,00		15,64		27,58	
	3	13,73		26,69		16,42		43,73	
	4	23,44		40,86		33,99		50,46	
	5	14,22	26,51 (17,38)	39,25	46,64 (10,45)	31,40	33,01 (2,27)	41,92	43,93 (2,84)
	5	38,80		54,03		34,61		45,93	
	6	39,81	27,64 (11,68)	51,04	41,84 (11,79)	37,69	27,91 (9,25)	46,70	41,11 (7,43)
	6	16,52		28,55		19,31		32,68	
	6	26,58		45,92		26,72		43,96	
	7	14,59	16,11 (2,14)	26,09	29,07 (4,21)	14,46	15,65 (1,68)	29,50	27,44 (2,92)
	7	17,62		32,04		16,83		25,37	
	8	21,93	17,72 (5,95)	33,05	29,61 (4,86)	34,66	26,57 (11,45)	42,11	37,96 (5,87)
	8	13,51		26,17		18,47		33,81	
	9	13,49	12,13 (1,92)	33,26	27,2 (8,58)	17,77	15,89 (2,67)	30,57	28,67 (2,69)
	9	10,77		21,13		14,00		26,76	

Tabela 20: diâmetro das fibras musculares discriminado por décadas no gênero masculino

	Década	Masseter				Temporal			
		rápidas	Média (DP)	lentas	Média (DP)	rápidas	Média (DP)	lentas	Média (DP)
Masculino	1	13,19	12,28 (1,29)	10,64	13,36 (3,85)	10,16	10,14 (0,04)	14,13	16,68 (3,61)
	1	11,36		16,08		10,11		19,23	
	2	26,06		35,04		40,78		45,18	
	3	16,95	30,58 (19,28)	26,57	35,01 (11,94)	49,44	45,85 (5,08)	54,93	50,71 (5,98)
	3	44,21		43,45		42,25		46,48	
	4	15,29	25,49 (11,48)	47,21	42,48 (7,85)	32,31	26,48 (5,15)	80,01	57,42 (19,56)
	4	23,26		33,42		22,57		46,43	
	4	37,92		46,82		24,55		45,83	
	5	15,88	25,57 (14,22)	30,05	36,34 (10,02)	16,68	28,16 (20,65)	30,13	32,03 (4,93)
	5	18,93		31,08		15,80		28,33	
	5	41,90		47,90		52,00		37,63	
	6	43,07	29,1 (19,76)	51,41	42,4 (12,75)	35,04	24,26 (15,25)	47,66	38,69 (12,69)
	6	15,12		33,38		13,48		29,72	
	7	31,45	24,2 (10,25)	40,93	37,22 (5,25)	28,30	21,72 (9,31)	45,74	39,15 (9,32)
	7	16,95		33,50		15,13		32,56	
	8	15,20	26,87 (14,03)	30,20	37,78 (7,87)	16,06	27,44 (12,95)	37,11	36,58 (2,49)
	8	38,54		45,35		38,81		36,05	
	8	13,37		34,08		16,72		40,79	
	9	21,09	17,61 (4,92)	45,42	36,09 (13,2)	20,19	16,47 (5,27)	41,97	36,81 (7,3)
	9	14,13		26,75		12,74		31,65	

Gráfico 16: Diâmetro das fibras no gênero feminino músculo masseter

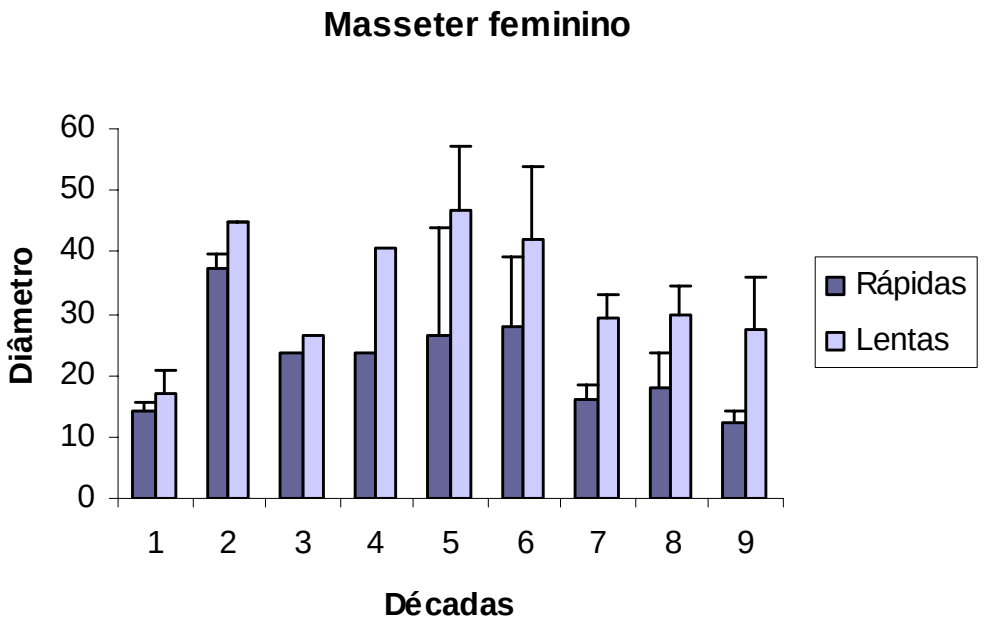


Gráfico 17: Diâmetro das fibras no gênero feminino músculo temporal

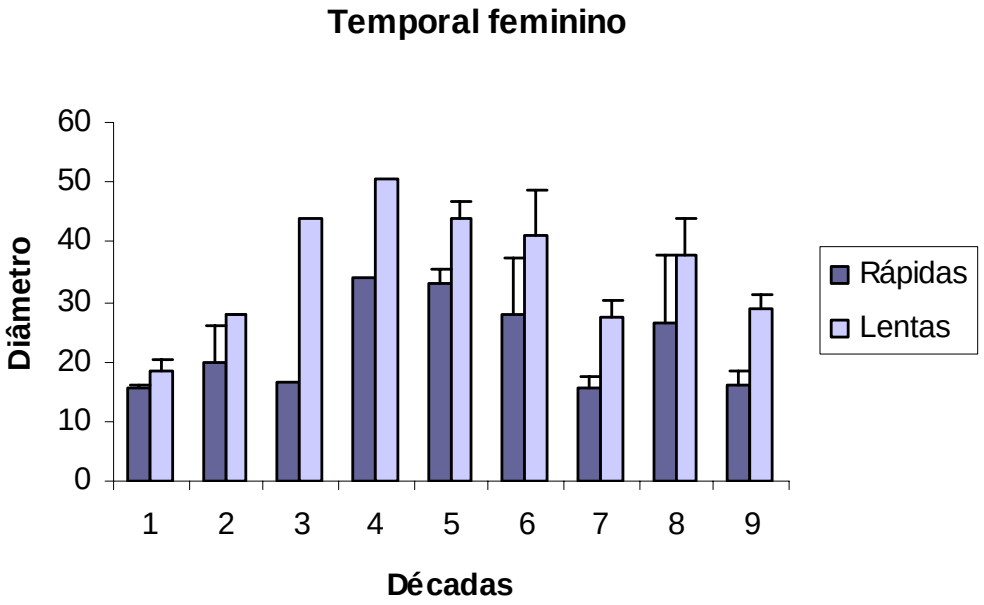


Gráfico 18: Diâmetro das fibras no gênero masculino músculo temporal

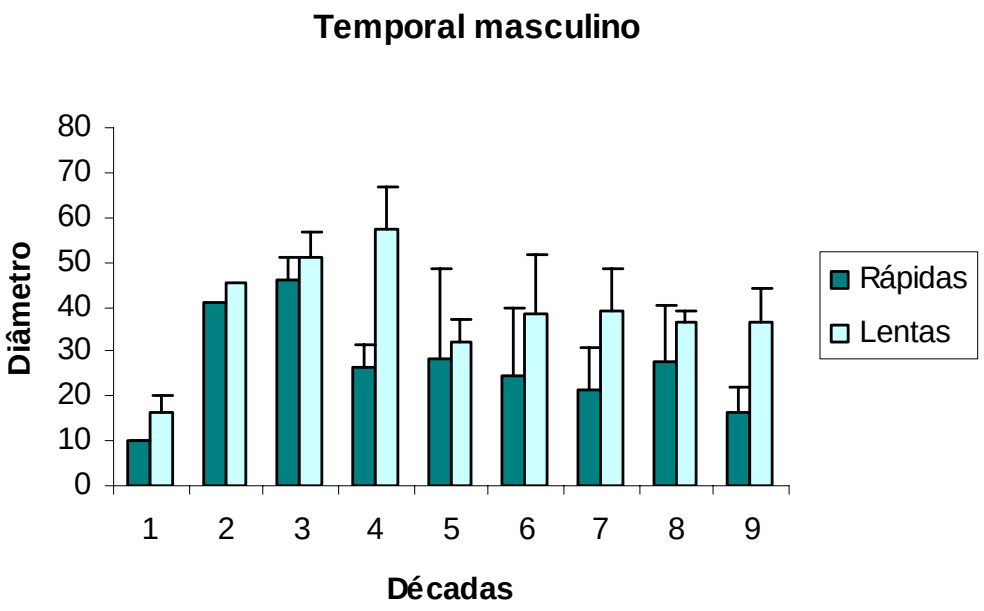
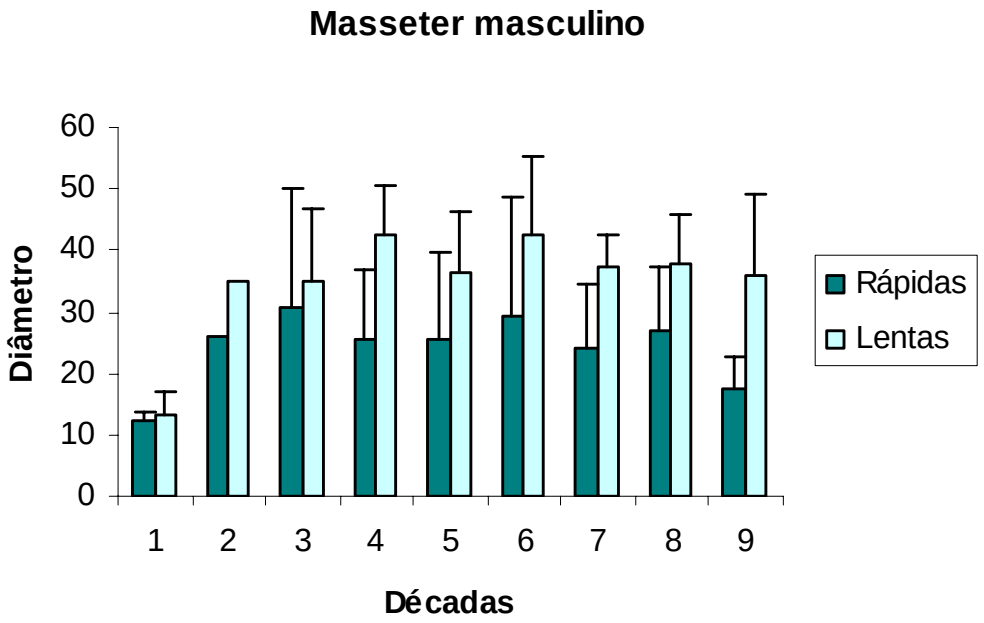


Gráfico 19: Diâmetro das fibras no gênero masculino músculo masseter



O número de amostras por década não foi suficiente para permitir a análise estatística e, portanto agrupou-se as amostras por grupo etário considerando-se grupo jovem (0 - 24 anos), grupo adulto (25 – 59 anos) e grupo idoso (acima de 60 anos).

A análise dos resultados com este tipo de grupamento é apresentado a seguir.na tabela 21, e sua representação gráfica nos histogramas 20 e 21.

Tabela 21: Diâmetro das fibras musculares discriminado por grupo etário

	Grupo Etário		
	Jovem	**Adulto**	**Idoso**
	(n = 8)	(n = 16)	(n = 13)
Masseter rápidas			
média (dp)	21,4 (10,9)	26,8 (11,9)	18,7 (8,0)
Mediana	16	23,4	15,2
mínimo – máximo	11,4 – 39,1	13,7 – 44,2	10,8 – 38,5
comparação		p = 0,123	
Masseter lentas			
média (dp)	26,5 (13,6)	40,7 (9,0)	32,9 (7,4)
Mediana	23,1	42,2	33,1
mínimo – máximo	10,6 – 45,0	26,7 – 54,0	21,1 – 45,4
comparação		p = 0,005 *	
Temporal rápidas			
média (dp)	22,6 (14,7)	28,4 (10,9)	20,3 (8,3)
Mediana	15,7	29,1	16,8
mínimo – máximo	10,1 – 49,4	13,5 – 52,0	12,7 – 38,8
comparação		p = 0,141	
Temporal lentas			
média (dp)	28,2 (14,5)	43,6 (12,1)	34,9 (6,3)
Mediana	23,7	44,9	33,8
mínimo – máximo	14,1 – 54,9	28,3 – 80,0	25,4 – 45,7
comparação		p = 0,006 *	

Gráfico 20: Diâmetro das fibras musculares nos grupos etários

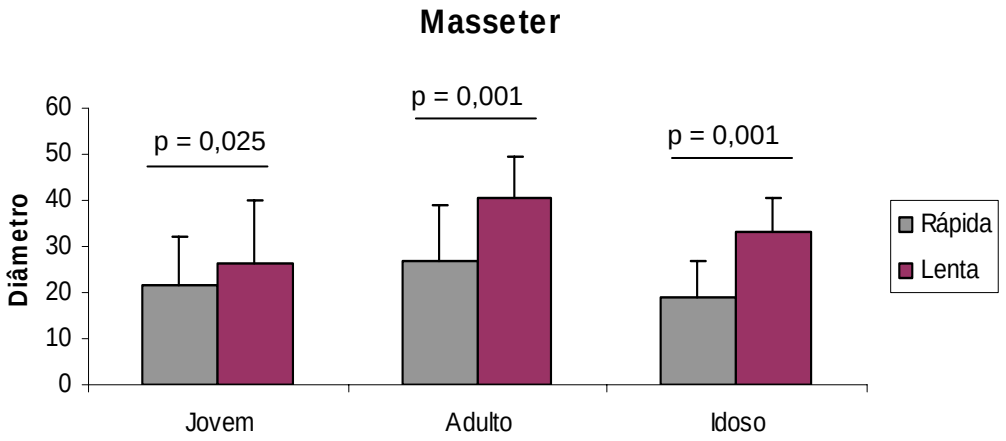
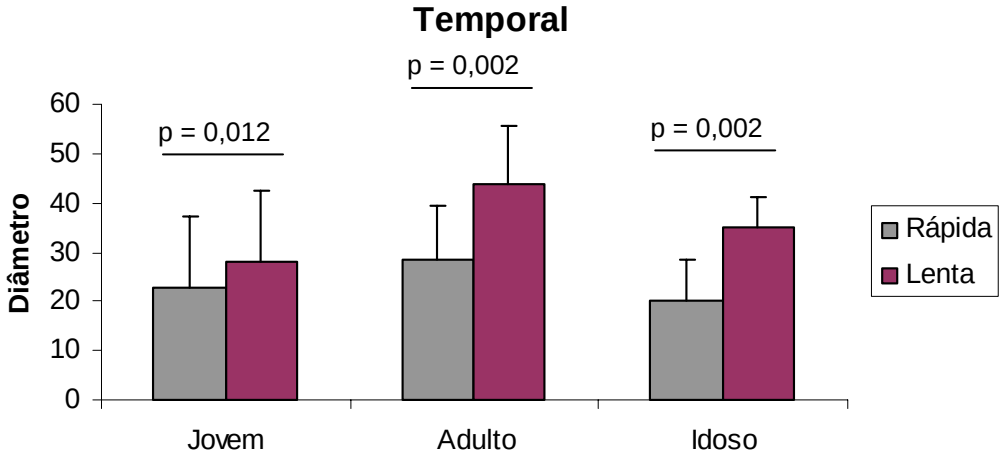


Gráfico 21: Diâmetro das fibras musculares nos grupos etários



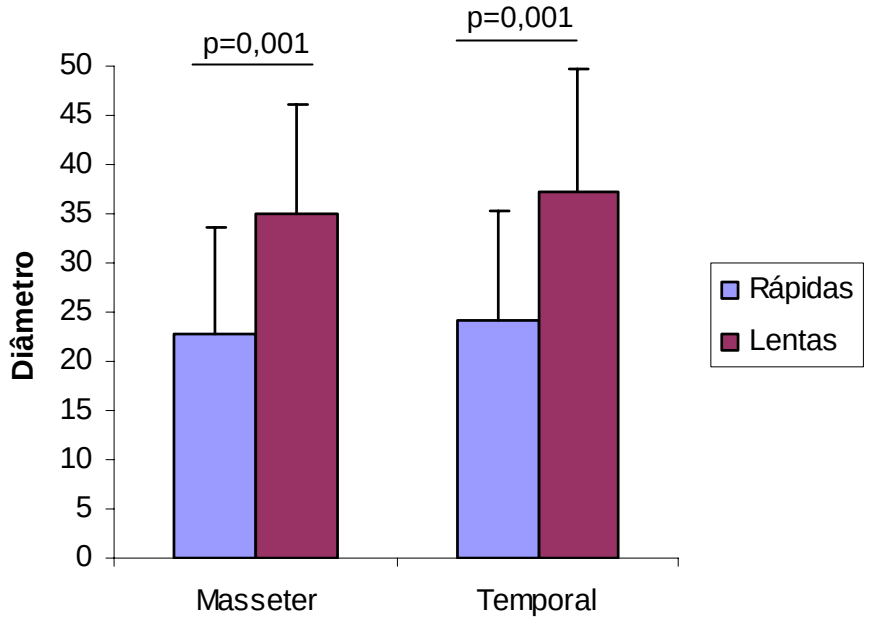
Os resultados da mensuração do diâmetro nos grupos etários foi estatisticamente significante na avaliação nos músculos masseter e temporal no grupo Jovem respectivamente p = 0,025 e p = 0,012, com maior diâmetro nas fibras lentas, grupo adulto músculos masseter p = 0,001 e temporal p = 0,002, com maior diâmetro nas fibras lentas, grupo idoso músculo masseter p = 0,001 e temporal p = 0,002, com maior diâmetro nas fibras lentas.

A tabela 22 representa os resultados da mensuração do diâmetro das fibras, segundo as variáveis músculos Masseter e Temporal seguido de sua representação gráfica, no gráfico 22.

Tabela 22: Diâmetro das fibras musculares nos músculos masseter e temporal

	Diâmetro das Fibras		**Diferença**
	rápidas	**lentas**	**Lentas – rápidas**
Masseter n = 37			
média (dp)	22,8 (10,9)	34,9 (11,0)	12,1 (7,1)
Mediana	17	33,4	11,5
mínimo – máximo	10,8 – 44,2	10,6 – 54,0	-2,6 – 31,9
comparação	p < 0,001 *		
Temporal n = 37			
média (dp)	24,3 (11,3)	37,2 (12,4)	12,9 (10,1)
Mediana	19,3	37,1	12,8
mínimo – máximo	10,1 – 52,0	14,1 – 80,0	-14,4 – 47,7

Gráfico 22: Diâmetro das fibras musculares nos músculos masseter e temporal



A mensuração do diâmetro na amostra total foi estatisticamente significante na avaliação no músculo Masseter ($p < 0,001$), com maior diâmetro nas fibras lentas e no músculo Temporal ($p < 0,001$), com maior diâmetro nas fibras lentas.

A tabela 23 representa os resultados da mensuração do diâmetro segundo as variáveis gênero e músculos masseter e temporal, seguida de sua representação gráfica, pelos gráficos 23 e 24.

Tabela 23: Diâmetro das fibras musculares nos gêneros masculino e feminino

	Masculino	**Feminino**
	(n = 20)	(n = 17)
Masseter rápidas		
média (dp)	23,7 (11,4)	21,7 (10,4)
Mediana	17,9	16,5
mínimo – máximo	11,4 – 44,2	10,8 – 39,8
comparação	p = 0,503	
Masseter lentas		
média (dp)	35,5 (10,8)	34,2 (11,5)
Mediana	33,8	33,1
mínimo – máximo	10,6 – 51,4	14,2 – 54,0
comparação	p = 0,732	
Temporal rápidas		
média (dp)	25,7 (13,3)	22,8 (8,5)
Mediana	21,4	18,5
mínimo – máximo	10,1 – 52,0	14,0 – 37,7
comparação	p = 0,429	
Temporal lentas		
média (dp)	39,6 (13,9)	34,4 (10,1)
Mediana	39,2	32,7
mínimo – máximo	14,1 – 80,0	16,9 – 50,5
comparação	p = 0,213	

Gráfico 23: Diâmetro das fibras musculares no músculo masseter

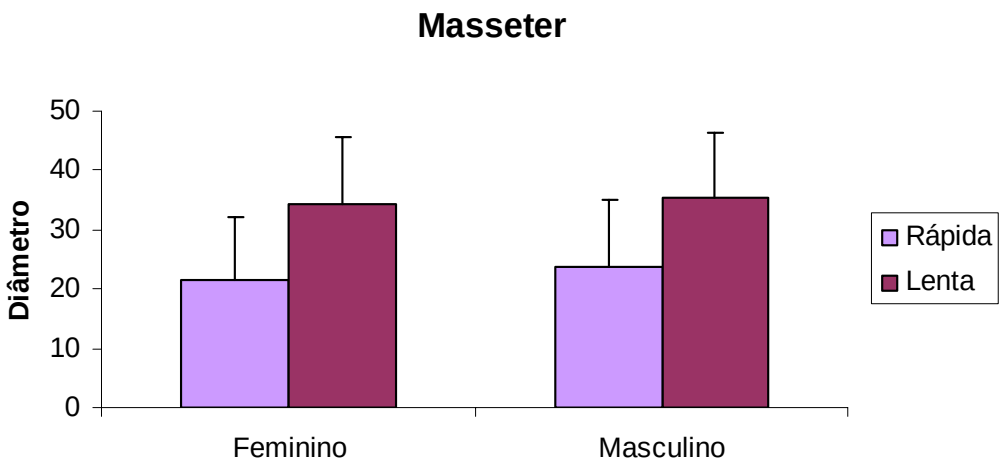
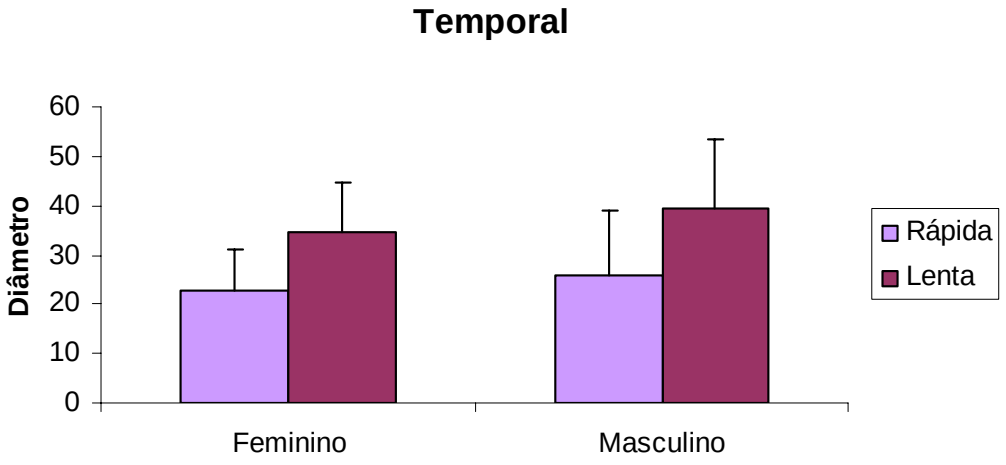


Gráfico 24: Diâmetro das fibras musculares no músculo temporal



Os resultados da mensuração do diâmetro segundo a variável gênero não, apresentaram resultados estatisticamente significantes no diâmetro das fibras rápidas (p = 0,503) e lentas no músculo Masseter (p = 0,732); rápidas (p = 0,429) e lentas no músculo Temporal (p = 0,213).

Gráfico 25: Representação linear da distribuição de capilar/fibra em ambos os gêneros

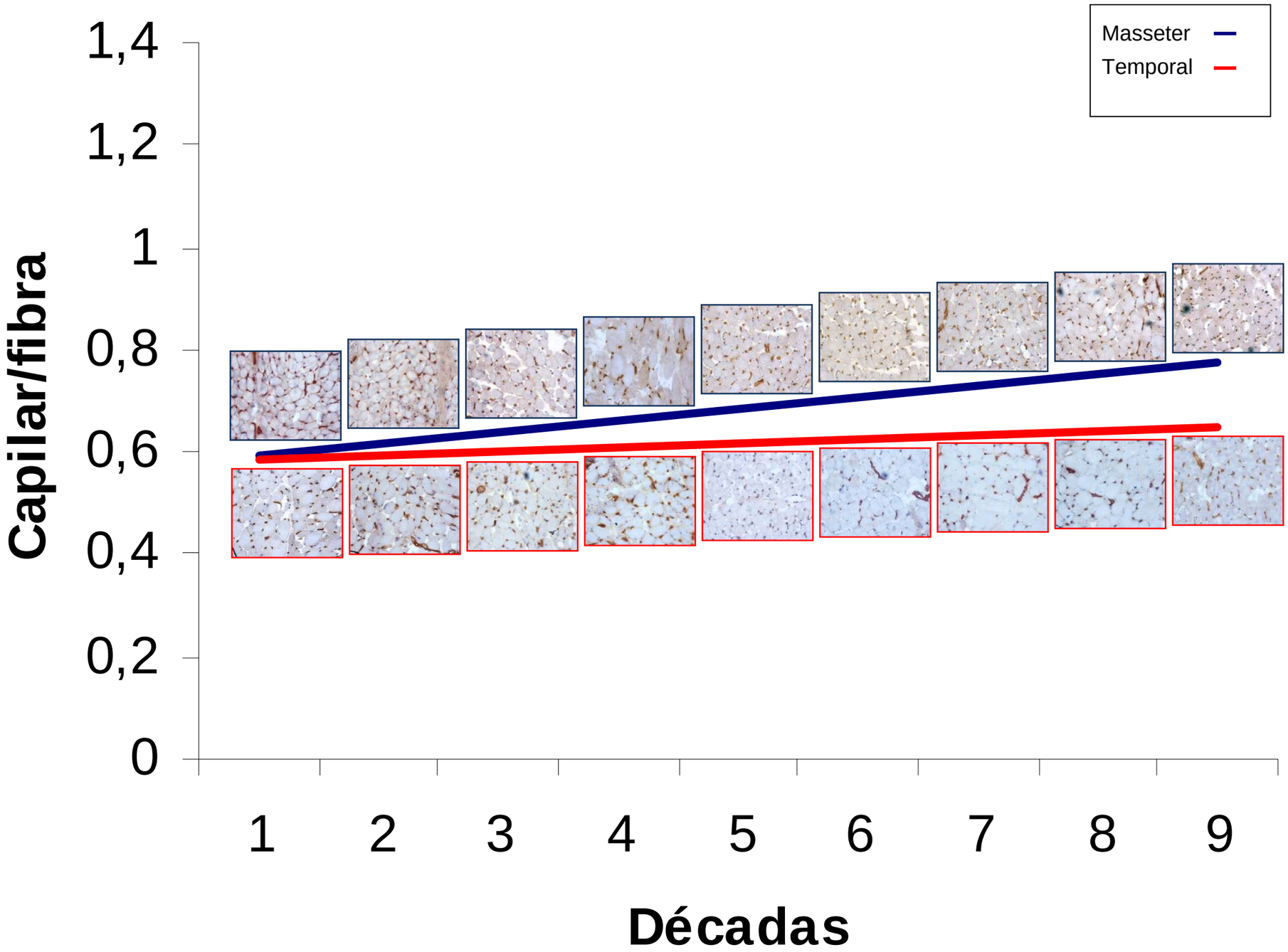
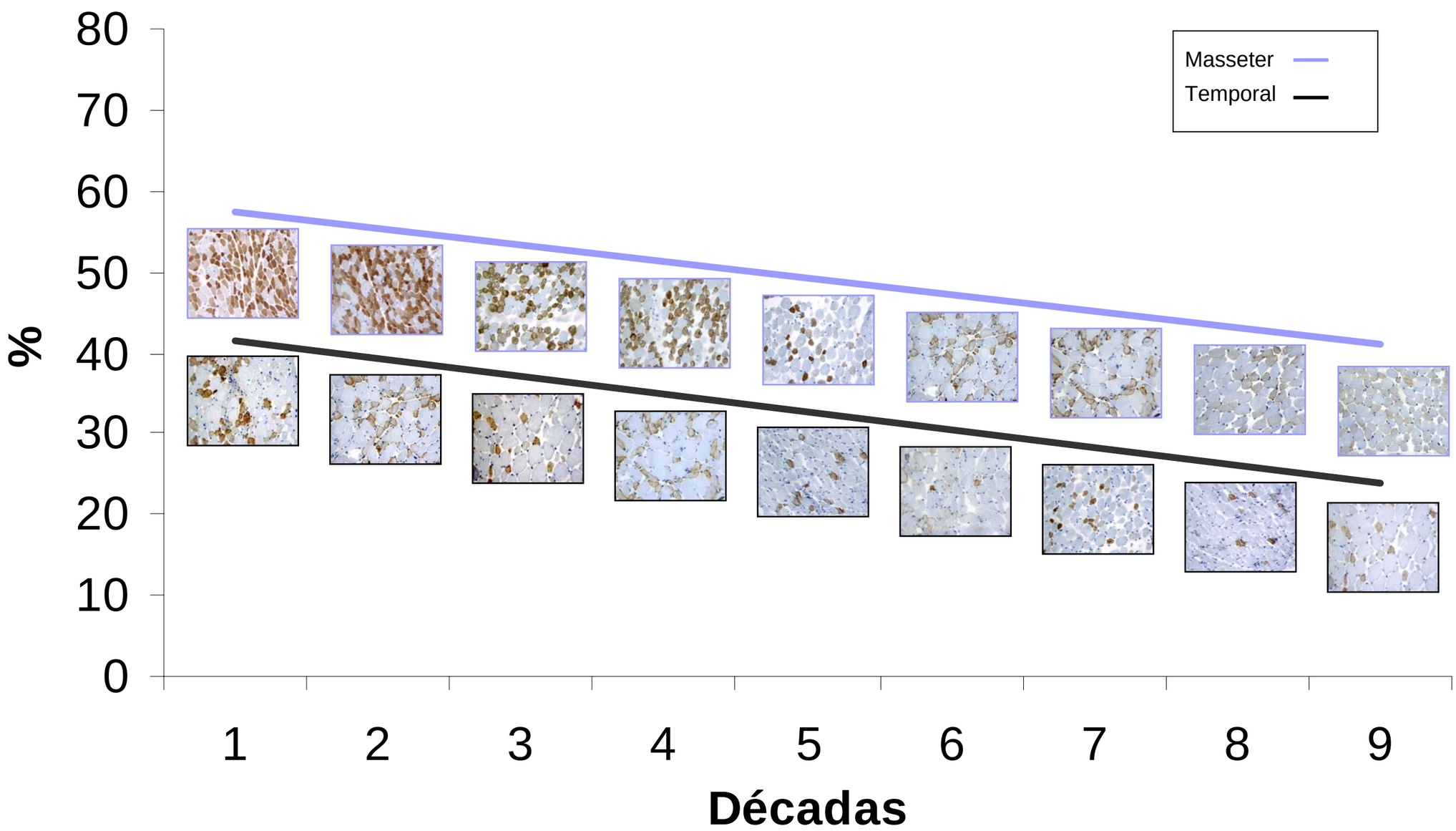


Gráfico 26: Representação linear da distribuição de miosina neonatal em ambos os gêneros.



6 DISCUSSÃO

6.1 Capilares

O presente estudo avaliou a presença de capilares nos músculos masseter e temporal da primeira a nona década através de duas metodologias, calculando-se em proporção ao número de capilares por fibras e capilares por área. Quando observado o número de capilares por mm², o músculo masseter apresentou em média 186 cap/mm², e no músculo temporal 153 cap/mm², menor do que o descrito na literarura (Stal 1995).

A densidade capilar em músculos da mastigação foi primeiramente descrita por Stal em 1995, onde por imunoistoquímica, utilizando-se anticorpo anti-laminina, avaliou-se grupos musculares com diferentes origens embriológicas, morfologia e função, divididos em orofaciais: zigomático maior, menor, orbicular da boca, bucinador e masseter, e apendiculares: bíceps braquial e 1° interosseo dorsal, coletados de cinco indivíduos, com idade média de 28 anos e intervalo *post-morten* de 1 a 3 dias. Os músculos orofaciais, em especial o masseter apresentaram a maior densidade capilar já relatada em músculos esqueléticos, 813 cap/mm², enquanto que o bíceps apresentou 440 cap/mm². Em relação ao número de capilares por fibras, os músculos apendiculares apresentaram maior capilarização que o músculo masseter sendo. 1,7 cap/fibra e 1 cap/fibra, respectivamente.

Em 1996, Ahmed et al, avaliou o número de capilares por fibra, e a densidade capilar (o número de capilares por área), de 15 amostras do músculo quadríceps femural de 10 homens e 5 mulheres através de imunoistoquímica (Ulex europaeus lectin) e o tipo de fibra através de histoquímica (ATPase), e observaram a densidade capilar 442 ± 52 cap/mm² e concluíram que o suprimento capilar é primariamente relacionado ao diâmetro das fibras e é relativamente independente do seu tipo.

O presente estudo apresentou resultados diferentes quando comparados com os de Stal, em relação à densidade capilar, isso pode estar relacionado a vários fatores, como por exemplo, a região do músculo onde foi feita a análise, o anticorpo e técnica utilizados na imunoistoquímica e fatores individuais como gênero, idade, tipo de dieta, presença de bruxismo, uso de prótese e ausência de dentes, sendo algumas destas características difíceis de se obter em se tratando de material biológico obtido de autópsias.

Em relação ao número de capilares dividido pelo número de fibras, observou-se no presente estudo média de 0,7 capilares/fibra no músculo masseter e 0,66 capilar/fibra no músculo temporal. Os resultados de Stal em relação ao número de capilares por fibra foi de 1,0 no masseter e 1,7 no temporal. As divergências nos resultados podem ser atribuídas aos fatores já citados anteriormente, e principalmente pode estar relacionada ao diâmetro das fibras musculares, já que o número de fibras influência diretamente o resultado, e quanto menor o diâmetro maior será o número de fibras, o que pode levar a uma razão menor que o esperado pelo cálculo por área.

Por esse motivo ficou clara a necessidade de se estudar a variação do calibre das fibras musculares.

6.2 Calibre das fibras musculares

Em relação ao calibre das fibras dos músculos masseter e temporal, a média do diâmetro observada das fibras do tipo I foi de 34,8µm e 37,2µm e do tipo II foi de 22,7µm e 24,6µm, respectivamente nos músculos masseter e temporal, através do programa de computação Nikon NIS-Elements BR 3.0. Concordando com o estudo de Ringqvist M. (1971) que mostrou que nos músculos da mastigação não havia uma diferença estatística significante entre o tamanho das fibras do músculo de homens e mulheres e que as fibras do tipo II geralmente eram dominantes em número e eram menores em diâmetro que as fibras tipo I. Ambos os tipos de fibras tinham diâmetro menor que os tipos de fibras correspondentes do músculo apendicular bíceps braquial.

Eriksson, et al (1983) também estudaram os músculos da mastigação e notaram que as fibras do tipo II eram menores em diâmetro quando comparadas a outros tipos de fibras e que este fato poderia estar relacionado às mudanças evolutivas nos hábitos mastigatórios.

Eriksson et al (1983), verificaram que o músculo e as subunidades destes músculos mostravam um padrão característico das fibras, tanto na freqüência relativa, quanto no diâmetro dos tipos de fibras, que o diferiam

significantemente entre as diferentes porções. Observaram a diferença entre os diâmetros das fibras tipo I e tipo II, sendo as fibras tipo II geralmente menores, o que deveria refletir em mudanças evolutivas nos hábitos mastigatórios, assim como em adaptação aos alimentos de diferentes texturas.

Geralmente as fibras dos músculos da mastigação tem diâmetro menor que as fibras dos músculos apendiculares e tronculares e isso facilita um aumento na troca de O^2 e nutrientes, levando a uma maior resistência à fadiga, especialmente nas fibras rápidas. Conseqüentemente, o menor diâmetro nas fibras dos músculos da mastigação pode ser considerado uma vantagem (Korfage 2005).

Kirkeby et al (2001), em estudos com amostras de partes bem definidas dos músculos masseter e temporal, concluíram que as fibras do tipo intermediário variam mais no diâmetro que as do tipo I e II, mas a maioria das fibras intermediárias foi menor que as do tipo I e maior que as do tipo II.

De acordo com os dados da literatura, existe uma especulação de que as fibras do tipo II, diminuem calibre e aumentam em número como passar da idade, para fazer essa associação foi estudada a expressão de miosina neonatal nessa musculatura como marcador de fibras em regeneração e renovação.

6.3 Miosina Neonatal

A miosina neonatal é uma proteína encontrada nas fibras em desenvolvimento, mais precisamente nos mioblastos rápidos, não sendo observada em fibras maduras. Sua expressão e identificação, além do período de desenvolvimento gestacional da fibra muscular, poderão ser decorrentes de processo de regeneração (Sarnat, 1991, Vajsar, 1993, Hamalainen, Pette, 1995). Nesse estudo onde foram avaliados os músculos masseter e temporal de 36 indivíduos da 1° a 9° década, foi observada a presença de miosina neonatal em todas as décadas em ambos os músculos, porém com um decréscimo com o passar da idade.

Soussi-Yanicostas et al (1990) observaram que o desenvolvimento do músculo masseter ocorria de maneira diferente a dos outros músculos. A MHC embrionária e neonatal, no músculo masseter, estavam presentes tanto durante a gestação (23 semanas = 7,9%) quanto após o nascimento (18 meses = 14,3%), permanecendo até a fase adulta (19,1%).No entanto, no músculo quadríceps essas cadeias de miosina eram substituídas por volta da 30° semana de gestação. Com este estudo demonstraram que a maturação histoquímica tardia estava ligada à diferenciação bioquímica tardia do músculo masseter quando comparado ao músculo quadríceps.

Stal em 1994, também notaram a presença da isoforma da MHC neonatal no músculo masseter e combinações de isoformas de miosina pesada, as quais não foram encontradas nos músculos orofaciais e apendiculares.

Monemi et al em 1996, estudando amostras do músculo masseter de 6 indivíduos idosos e 2 indivíduos adultos com intervalo *post morten* de 1 a 3 dias, concluíram que há um aumento de miosina neonatal com passar da idade. O que discorda com o presente estudo no qual o número da amostras utilizadas (35), ultrapassa em cinco vezes o número de amostras do estudo de Monemi.

Em 1999, Korfage et al, observaram a expressão de MyHC neonatal presente no músculo temporal, e esta apresentava-se em combinação com outras cadeias, sendo denominadas de fibras híbridas.

Monemi et al (1999) estudaram as diferenças da composição da cadeia de miosina pesada (MyHC) das fibras dos músculos, masseter e bíceps braquial de humanos durante o envelhecimento e concluíram que o fenótipo do músculo sofre modificações durante a idade. No masseter, mostraram uma significante diminuição da quantidade de MyHC lenta conforme aumentava a idade, ao mesmo tempo ocorria um aumento da MyHC neonatal e rápida.

Em amostras de autópsia, os músculos masseter, temporomandibular e zigomáticomandibular, continham um número abundante de fibras que eram positivas para miosina neonatal, enquanto que no músculo temporal, estas fibras eram em menor número e esparsas (Kirkeby et al,2001). Em nosso estudo, o músculo masseter apresentou maior número de expressão positiva de miosina neonatal quando comparado ao músculo temporal, no entanto, embora em menor número esta expressão se manteve presente em todas as décadas.

Em 2001 Korfage et al, avaliaram amostras de 8 indivíduios, 5 homens e 3 mulheres, com idades de 71,6 ± 15anos, de músculos suprahioídeos, infrahioídeos e da mastigação, e observaram a presença de miosina neonatal em 1%, 1%, e 10%, respectivamente.

A presença da isoforma de miosina neonatal em todas as décadas dos músculos masseter e temporal, constatada no presente estudo indica constante regeneração e/ou renovação celular nessa musculatura.

7 CONCLUSÃO

1- Em relação ao número de capilares por fibra, nos músculos masseter e temporal, da primeira a nona década, em média foi de 1 e 0,7 respectivamente. O número de capilares por mm², nos músculos masseter e temporal, não variou ao longo das nove décadas estudadas, e o número de capilares por mm², foi significantemente maior no músculo masseter quando comparado ao temporal, (p=0,025).

2- A miosina neonatal apresentou maior expressão no músculo masseter (p=0,01), no músculo temporal o grupo masculino apresentou maior média quando comparado ao feminino (p=0,025). Manteve-se presente em todas as décadas dos músculos masseter e temporal.

3- Observou-se o diâmetro das fibras do tipo II menores que as fibras do tipo I.

8 ANEXOS

Anexo A: Identificação dos pacientes						
Idade (anos)	Nome	Caso	Gênero	Registro	Inclusão	Exclusão
1 mês	S B L	53	F	HC-2006/651	x	
1	B R A	50	F	VO-2006/8312	x	
19	M A S A	2	F	HC- 2005/068	x	
20	G S	46	F	VO- 2006/7560	x	
27	F P F	40	F	HC-2006/484	x	
40	T R F C	52	F	HC-2006/640	x	
44	R S C	42	F	VO-2006/6768	x	
45	A M B	55	F	HC-2006/667	x	
45	M A A C C	13	F	HC- 2005/753	x	
47	RRO	14	F	HC-2005/0754	x	
51	V N W	15	F	HC- 2005/772		x
54	M A C	16	F	HC-2005/784	x	
58	A R S	18	F	HC-2005/791	x	
60	V G	41	F	VO-2006/6544		
61	M H	36	F	VO- 2006/5453	x	
61	J A N	43	F	VO-2006/6850		
63	N A E	10	F	HC- 2005/693		x
66	E F S	51	F	VO-2006/8495		x
71	F L C. R	48	F	HC-2006/586		x
78	G S O	57	F	VO-2006/10462		x
79	M N M	30	F	VO- 2006/4691	x	
80	A A C	54	F	HC-2006/9160		x
85	R S P	34	F	VO- 2006/5142	x	
87	M R O	49	F	VO-2006/8038	x	

Anexo B: Identificação dos pacientes						
Idade (anos)	Nome	Caso	Gênero	Registro	Inclusão	Exclusão
1 mês	J R P S	32	M	HC-2006/382	X	
2 meses	R A B	44	M	VO 2006/7010		X
1	C S S	37	M	VO-2006/6048	X	
9	V D A S	25	M	HC-2006/332		X
20	J M F N	60	M	HC-2007/255	X	
24	N R	19	M	HC-2005/790	X	
28	S R	59	M	HC-2007/210	X	
30	A V B	61	M	VO-2007/8845		X
34	J A S	31	M	VO- 2006/4847		X
34	G V F	23	M	HC-2006/0037	X	
35	J V S	26	M	VO-2006/4280	X	
38	A B L	6	M	HC-2005/661		X
38	E G	38	M	HC- 2006/456		X
39	C P	29	M	VO 2006/4630	X	
41	J C A S	4	M	HC-2005/657	X	
42	O A P S	47	M	HC-2006/562	X	
42	G M	62	M	VO 2007/672		X
42	R A A	56	M	VO-2006/9488	X	
49	A M	7	M	HC-2005/662		X
55	O A B	33	M	VO- 2006/4967		X
57	V N S	35	M	HC- 2006/395		X
58	E P C	3	M	HC-2005/638	X	
58	Vi B C	11	M	HC- 2005/701		X
59	S M B	9	M	HC-2005/692	X	
60	L J S	45	M	HC2006/523		X
63	C M L	17	M	HC-2005/0788	X	
63	A C S	39	M	VO- 2006/6314		X
63	J B A S	58	M	VO-2006/783		X
67	F S	20	M	HC-2005/806	X	
67	S Z	22	M	HC- 2006/0035		X
71	P O	28	M	Vo 2006/4554	X	
72	H L S	5	M	HC:2005/659	X	
76	A S	1	M	HC: 2005/0624		X
80	J P S	21	M	HC- 2005/830	X	
83	J V J	8	M	HC: 2005/663		X
87	D M L	12	M	HC- 2005/713	X	

Anexo C

Reação histológica Hematoxilina e Eosina.

Hematoxilina & Eosina (HE)

1. Filtrar a Hematoxilina de Harri.
2. Emergir os cortes nesta solução por 10 minutos.
3. Lavar em água corrente por 10 minutos.
4. Emergir os cortes na Eosina por 1 minuto.
5. Lavar.
6. Desidratar e montar.

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.03.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1016/05**, intitulado: **"Caracterização fenotípica quanto a composição do tipo celular e das proteínas na musculatura da mastigação"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie**

CAPPesq, 23 de Março de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
/VCN

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 16 de Janeiro de 2006.

À Diretoria Clínica
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Referente a solicitação de manifestação do SVO no projeto de pesquisa "Caracterização fenotípica quanto a composição do tipo celular e das proteínas na musculatura da mastigação" a ser desenvolvido no Departamento de Neurologia sob a responsabilidade da Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, estou de acordo com a retirada do material de autópsia e com a metodologia a ser empregada para tal estudo.

Atenciosamente,

Paulo Saldiva
Professor Titular
Departamento de Anatomia Patológica
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Paulo H. N. Saldiva
Chefe do Depto. de Patologia

Avenida Dr. Arnaldo, 455 – CEP 01246-903
Caixa Postal 54199 – São Paulo – SP

1/6/2006

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 03 de fevereiro de 2006.

Ao Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualuci
Diretor do SVO

Venho por meio desta solicitar a vossa autorização para a retirada de amostras dos músculos da mastigação em casos de autópsia do Serviço de Verificação de Óbito desta instituição para o desenvolvimento do projeto intitulado: "Caracterização fenotípica quanto a composição do tipo celular e das proteínas na musculatura da mastigação" a ser desenvolvido no Departamento de Neurologia. Este projeto faz parte da linha de pesquisa de estudo dos músculos do sistema estomatognático e contará com três alunas de pós-graduação para a execução do mesmo. Seguem em anexo o protocolo de pesquisa, o projeto correspondente e a autorização do Prof. Dr. Paulo H.N. Saldiva para a vossa apreciação.
Coloco-me a disposição para quaisquer informações adicionais necessárias e agradeço antecipadamente a atenção dispensada.

Atenciosamente,

Suely Kazue Nagahashi Marie
Professora Associada
Departamento de Neurologia
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo

Autorizado,

28/4/2006

Avenida Dr. Arnaldo, 455 - cep 01246-903.
Caixa Postal 54199 - São Paulo – SP

Anexo C: Autorizações

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados á obtenção de material de estudo para pesquisa científica

Título da Pesquisa: Caracterização fenótípica quanto a composição do tipo celular e das proteínas na musculatura da mastigação

Responsável: Karina Nassar Paloni, Mariana Brandão Ferreira e Thatiana Bastos Guimarães

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

9 REFERÊNCIAS

Anderson JD, Zarb GA, Evidence-based dentistry: prognosis. *J Prosthet Dent.* 2000 May;83(5):495-500.

Ariji Y, Kimura Y, Gotoh M, Sakuma S, Zhao YP, Ariji E. Blood flow in and around the masseter muscle: normal and pathologic features demonstrated by color Doppler sonography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Apr;91(4):472-82.

Arthur C. Guyton, John E. Hall. Tratado de fisiologia médica,1997ed.Santos

Booth FW, Weeden SH, Tseng BS. Effect of aging on human skeletal muscle and motor function. *Med Sci Sports Exerc*. 1994 May;26(5):556-60.

Burggasser G, Happak W, Gruber H, Freilinger G. The temporalis: blood supply and innervation. *Plast Reconstr Surg*. 2002 May;109(6):1862-9.

Canale C, Collesano V. Quality of life in patients with temporomandibular disorders Segù M, Lobbia S. *Minerva Stomatol*. 2003 Jun;52(6):279-87. Italian

Carlsson. Tratamento das Disfunções Temporomandibulares na Clínica Odontológica. Ed. Santos 2006.

Christensen LV. Progressive jaw muscle fatigue of experimental tooth clenching in man. *J Oral Rehabil*. 1981 Sep;8(5):413-20.

Colling-Salting, A. S.Enzyme histichemistry onn skeletal muscle of the human foetus. *J. Neuro. Sci*., v.39, p. 169-85, 1978.

Conti PC, Ferreira PM, Pegoraro LF, Conti JV, Salvador MC. A cross-sectional study of prevalence and etiology of signs and symptoms of temporomandibular disorders in high school and university students. *J Orofac Pain*. Summer;10 (3):254-62, 1996.

Delcanho RE, Kim YJ, Clark GT. Haemodynamic changes induced by submaximal isometric contraction in painful and non-painful human masseter using near-infra-red spectroscopy*. Arch Oral Biol*. 1996 Jun;41(6):585-96.

Dubowitz V. *Muscle biopsy: a practical approach*. 2nd ed. London: Bailiere Tindal; 1985. p.19-81.

Dworkin SF, LeResche L.; Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. Review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandibular Disorder* 1992; 6: 302-355.

Eriksson PO, Thornell LE. Histochemical and morphological muscle-fibre characteristics of the human masseter, the medial pterygoid and the temporal muscles. *Arch Oral Biol*.1983;28(9):781-95.

Eriksson PO, Butler-Browne GS, Thornell LE. Immunohistochemical characterization of human masseter muscle spindles. *Muscle Nerve*. 1994 Jan;17(1):31-41.

Esbjörnsson M, Jansson E, Sundberg CJ, Sylvén C, Eiken O, Nygren A, Kaijser L. Muscle fibre types and enzyme activities after training with local leg ischaemia in man. *Acta Physiol Scand.* 1993 Jul;148(3):233-41.

Ferner H. Eduard Pernkopf. Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia Anatomica. Thieme, 1998. Atlas of Topographical and Applied Human.

Genhardt K, Rentschler S, Fishman G, Sassoon DA. Cellular and cis-regulation of En-2 expression in the mandibular arch. *Mech Dev*. 2002 Feb;111(1-2):125-36.

Ghosh S, Dhoot GK Both avian and mammalian embryonic myoblasts are intrinsically heterogeneous. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998 Oct;19(7):787-95.

Greene CS. Etiology of temporomandibular disorders. *Semin Orthod.* 1995 Dec;1(4):222-8.

Heckmatt JZ, Sewry CA, Hodes D, Dubowitz V. Congenital centronuclear (myotubular) myopathy. A clinical, pathological and genetic study in eight children. *Brain*. 1985 Dec;108 (Pt 4):941-64

John MT, Patrick DL, Slade GD. The German version of the Oral Health Impact Profile--translation and psychometric properties. *Eur J Oral Sci*. 2002;110:425-33.

Karpati G. Neuromuscular disease from basic mechanisms to clinical management. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2001 Mar;2(3):172.

Kirkeby S, Garbarsch C. Histochemical studies of the masseter, the temporal and small zygomaticomandibular, and the temporomandibular masticatory muscles from aged male and female humans. Fiber types and myosin isoforms. *Cranio*. 2001 Jul;19(3):

Korfage JA, Van Rijden TM. Regional differences in fibre type composition in the human temporalis muscle., *J Anat*. 1999 Apr;194 (Pt 3):355-62

Korfage JA, Schueler YT, Brugman P, Van Eijden TM Differences in myosin heavy-chain composition between human jaw-closing muscles and supra- and infrahyoid muscles., *Arch Oral Biol*, 2001 Sep; 46 (9): 821-7

Korfage JA, Koolstra JH, Langenbach GE, van Eijden TM. Fiber-type composition of the human jaw muscles--(part 2) role of hybrid fibers and factors responsible for inter-individual variation.. *J Dent Res*. 2005 Sep;84(9):784-93

McGrath C, Comfort MB, Lo EC, Luo Y. Can third molar surgery improve quality of life A 6-month cohort study. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:759-63.

Mense, S. Peripheral mechanism of muscle nociceptor and local muscle pain. J. Muscle Skeletal Pain 1, 101-28

Michael K. Relationship of skeletal muscle atrophy to functional status: a systematic research review. *Biol Res Nurs*. 2000 Oct;2(2):117-31.

Monemi M, Eriksson PO, Dubail I, Butler-Browne GS, Thornell LE. Fetal myosin heavy chain increases in human masseter muscle during aging. *FEBS Lett* 1996 May 13;386(1):87-90

Erratum in:

FEBS Lett 1997 Feb 10;403(1):110.

Monemi M, Eriksson, PO, Kadi F, Butler-Browne GS, Thornell LE. Opposite changes in myosin heavy chain composition of human masseter and biceps brachii muscles during aging. *J Muscle Res Cell Motil*. 1999 May;20(4):351-61

Monemi M, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging*. J Neurol Sci.* 1998 Jan 21;154(1):35-48.

Chuls W, Stray-Gundersen JCapillarity os elite cross-country skiers: a lectin (*Ulex europaeus I*) marker. *Scand J Med Sci Sports* (2003) 3:207-216.

Parsons D, McIntyre K, S Pedroni CR, De Oliveira AS, Guaratini MI. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in university students. J Oral Rehabil. 2003 Mar; 30 (3):283-9.

Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990;116:1-76.

Plesh O, Sinisi SE, Crawford PB, Gansky SA. Diagnoses based on the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders in a biracial population of young women. *J Orofac Pain*. 2005 Winter;19(1):65-75.

Qu Z, Andersen JL, Zhou S Visualisation of capillaries in human skeletal muscle. *Histochem Cell Biol*. 1997 Feb;107(2):169-74.

Ringqvist M. Histochemical fiber types and fiber sizes in human masticatory muscles. *Scand J Dent Res*. 1971;79(5):366-8.

Ringqvist M. J. Fibre sizes of human masseter muscle in relation to bite force. *Neurol Sci*. 1973 Jul;19(3):297-305.

SK Ahmed, S Egginton, PM Jakeman, AF Mannion and HF Is human skeletal muscle capillary supply modelled according to fibre size or fibre type? *Exp Physiol* 1997;82;231-234

Sarnat HB. Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibres in developmental myopathies.*Acta Paediatr* Jpn. 1991 Apr;33(2):238-46.

Sarnat HB. New insights into the pathogenesis of congenital myopathies. *J Child Neurol*. 1994 Apr;9(2):193-201. Review

Segù M, Lobbia S, Canale C, Collesano V. *Minerva Stomato*l. 2003 Jun;52(6):279-87. Italian.

Simons / Travell - Dor e Disfunção Miofascial - Manual dos pontos-gatilho (v.1 - parte superior) 2005.

Schmalbruch H. Muscle regeneration: fetal myogenesis in a new setting. *Bibl Anat. 1986;(29):126-53.*

Soussi-Yanicostas N, Barbet JP, Laurent-Winter C, Barton P, Butler-Browne Transition of myosin isozymes during development of human masseter muscle. Persistence of developmental isoforms during postnatal stage. *GS Development* 1990 Feb;108(2):239-49.

Stål P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Enzyme-histochemical differences in fibre-type between the human major and minor zygomatic and the first dorsal interosseus muscles. *Arch Oral Biol*. 1987;32(11):833-41.

Stål P, Eriksson PO, Shiaffino S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *J Muscle Res Cell Motil*. 1994 Oct;15(5):517-34.

Stål P, Eriksson PO, Thornell LE.
Muscle-specific enzyme activity patterns of the capillary bed of human oro-facial, masticatory and limb muscles. *Histochem Cell Biol*. 1995 Jul;104(1):47-54.

Stål P, Eriksson PO, Thornell LE.
Differences in capillary supply between human oro-facial, masticatory and limb muscles *J Muscle Res*. 1996 17, 183-197 (1996).

Stedman HH, Kozyak BW, Nelson A, Thesier DM, Su LT, Low DW, Bridges CR, Shrager JB, Minugh-Purvis N, Mitchell MA. Myosin gene mutation correlates with anatomical changes in the human lineage. *Nature*. 2004 Mar 25;428(6981):415-8

Stephenson TJ, Griffiths DW, Mills PM. Comparison of Ulex europaeus I lectin binding and factor VIII-related antigen as markers of vascular endothelium in follicular carcinoma of the thyroid. Histopathology. 1986 Mar;10(3):251-60.

Tailun Hea,*, Stina Olssona, Jens Rosengren Daugaardb, Stavros Kiliaridisc.Functional influence of masticatory muscles on the fibre characteristics and capillary distribution in growing ferrets (Mustela putonusfuro)——a histochemical analysis. *Archives of Oral Biology* (2004) 49, 983—989

Yu XM, Hoheisel U, Mense S *Drugs Exp Clin Res.* 1992;18(11-12):447-59. Effects of a novel piperazine derivative (CGP 29030A) on nociceptive dorsal horn neurons in the rat.

Zarb G.A., Carlsson G.E. Sessle B.J., Mohl N.D. Disfunções da articulação temporomandibular e dos músculos da mastigação. 1ª ed. Munksgaard, Copenhage, 2000 cap 7, p.58-65 e p. 171-187.