Thatiana Bastos Guimarães

Caracterização da distribuição da miosina rápida, lenta e híbrida na musculatura da mastigação

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

Área de Concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

SÃO PAULO

2009

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	4
2 Revisão da Literatura.....	5
2.1 Disfunção temporomandibular.....	5
2.2 Anatomia dos músculos da mastigação.....	7
2.3 Histórico sobre os tipos de fibras do músculo esquelético.....	10
2.4 Tipos de fibras nos músculos da mastigação.....	13
2.4.1 Fibras musculares esqueléticas híbridas.....	15
2.5 Desenvolvimento e diferenciação das fibras musculares.....	18
2.6 Diferenças entre os músculos da mastigação e os músculos apendiculares e tronculares.....	20
2.7 Técnicas de tipagem de fibras.....	22
2.7.1 Técnica histoquímica.....	23
2.7.2 Reações Imunoistoquímicas.....	23
3 Métodos.....	25
3.1 Casuística.....	25
3.2 Métodos.....	25
3.2.1 Estudo histoquímico quantitativo morfológico.....	26
3.2.2 Estudo imunoistoquímico quantitativo.....	27
3.2.3 Análise imunoistoquímica.....	29
3.2.4 Dupla marcação.....	30
3.2.5 Isolamento das fibras musculares.....	30
3.2.6 Análise estatística.....	31

4 Resultados.....	32
4.1 População de estudo.....	32
5 Discussão.....	49
5.1 Distribuição dos tipos de fibras rápidas e lentas nos músculos masseter e temporal segundo o grupo etário.....	49
5.2 Comparações entre os músculos masseter e temporal.....	51
5.3 Comparações entre os sexos	52
5.4 Comparações entre os grupos etários e relação a porcentagem de dupla marcação.....	53
6 Conclusões.....	57
7 Anexos.....	58
8 Referências.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP.....	Adenosina trifosfato
ATpase.....	Adenosina trifosfato
HE.....	Hematoxilina e eosina
MyHC	Cadeia de miosina pesada
MyHC-cardíaca α	Cadeia de miosina pesada cardíaca
MyHC I= Fibras tipo I.....	Cadeia de miosina pesada lenta
MyHC IIA } MyHC IIX } MyHC IIB	=Fibras tipo II.....Cadeia de miosina pesada rápida
MyHC extra-ocular.....	Cadeia de miosina pesada extra-ocular
MyHC neonatal.....	Cadeia de miosina pesada neonatal
MyHC embrionária.....	Cadeia de miosina pesada
IM	Fibra híbrida
IIC.....	Fibra híbrida
MLC.....	Cadeia de miosina leve
M.....	Masseter
Q.....	Quadríceps

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 1ª década.....	33
Figura 1B	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 2ª década.....	33
Figura 1C	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 3ª década.....	33
Figura 1D	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 4ª década.....	33
Figura 1E	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 5ª década.....	33
Figura 1F	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 6ª década.....	33
Figura 1G	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 7ª década.....	33
Figura 1H	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 8ª década.....	33

Figura 1I	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo masculino na 9ª década.....	33
Figura 1J	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 1ª década.....	34
Figura 1K	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 2ª década.....	34
Figura 1L	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 3ª década.....	34
Figura 1M	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 4ª década.....	34
Figura 1N	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 5ª década.....	34
Figura 1O	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 6ª década.....	34
Figura 1P	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 7ª década.....	34

Figura 1Q	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 8ª década.....	34
Figura 1R	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo masculino na 9ª década.....	34
Figura 2A	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 1ª década.....	35
Figura 2B	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 2ª década.....	35
Figura 2C	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 3ª década.....	35
Figura 2D	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 4ª década.....	35
Figura 2E	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 5ª década.....	35
Figura 2F	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 6ª década.....	35

Figura 2G	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 7 ^a década.....	35
Figura 2H	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 8 ^a década.....	35
Figura 2I	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo temporal do sexo feminino na 9 ^a década.....	35
Figura 2J	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 1 ^a década.....	36
Figura 2K	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 2 ^a década.....	36
Figura 2L	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 3 ^a década.....	36
Figura 2M	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 4 ^a década.....	36
Figura 2N	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 5 ^a década.....	36

Figura 2O	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 6 ^a década.....	36
Figura 2P	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 7 ^a década.....	36
Figura 2Q	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 8 ^a década.....	36
Figura 2R	representa a cadeia de miosina pesada rápida e lenta no músculo masseter do sexo feminino na 9 ^a década.....	36
Figura 3	representa fibras com dupla marcação no músculo Masseter. A: miosina rápida, B: miosina lenta	47
Figura 4	fibras apresentando dupla marcação no músculo Temporal.....	47
Figura 5	fibra única apresentando dupla marcação.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagem de miosina rápida e lenta no músculo Temporal no sexo masculino.....	38
Gráfico 2	Porcentagem de miosina rápida e lenta no músculo Masseter no sexo masculino.....	38
Gráfico 3	Porcentagem de miosina rápida e lenta no músculo Temporal no sexo feminino.....	38
Gráfico 4	Porcentagem de miosina rápida e lenta no músculo Masseter no sexo feminino.....	38
Gráfico 5	Porcentagem de miosina rápida no músculo Masseter segundo o grupo etário.....	40
Gráfico 6	Porcentagem de miosina lenta no músculo Temporal segundo o grupo etário.....	40
Gráfico 7	Porcentagem de miosina rápida no músculo Masseter segundo o grupo etário.....	40
Gráfico 8	Porcentagem de miosina lenta no músculo Temporal segundo o grupo etário.....	40
Gráfico 9	Porcentagem de fibras híbridas por décadas no músculo Masseter.....	44
Gráfico 10	Porcentagem de fibras híbridas por décadas no músculo Temporal.....	44

Gráfico 11	Porcentagem de dupla marcação no músculo Masseter segundo o grupo etário.....	46
Gráfico 12	Porcentagem de dupla marcação no músculo Temporal segundo o grupo etário.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anatomia dos músculos da mastigação.....	9
Tabela 2	Classificação das fibras musculares esqueléticas.....	13
Tabela 3	Representação esquemática da evolução da cadeia de miosina pesada (MHC) durante o desenvolvimento do músculo Masseter (M) comparado ao músculo quadríceps (Q).....	22
Tabela 4	Casuística.....	25
Tabela 5	Lista dos Anticorpos empregados no estudo e a diluição utilizada	27
Tabela 6	Casuística.....	32
Tabela 7	Resultados da contagem de miosina rápida e lenta.....	37
Tabela 8	Comparação dos tipos de fibras (rápida e lenta) segundo o grupo etário.....	39
Tabela 9	Comparação entre a porcentagem de fibras rápidas e lentas.....	41

Tabela 10	Comparação dos músculos masseter e temporal.....	42
Tabela 11	Comparação entre os sexos dos músculos masseter e temporal.....	43
Tabela 12	Porcentagem de fibras apresentando dupla marcação.....	44
Tabela 13	Comparação segundo o grupo etário.....	45
Tabela 14	Comparação entre os sexos dos músculos masseter e temporal.....	46
Tabela 15	Resumo dos artigos.....	55

Resumo

Guimarães TB. *Caracterização da distribuição da miosina rápida, lenta e híbrida na musculatura da mastigação* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 75p.

Introdução: Os músculos da mastigação masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral são componentes essenciais do “sistema estomatognático”. A mastigação decorre da movimentação destes músculos. Além da função fisiológica, os músculos da mastigação estão envolvidos na disfunção temporomandibular (DTM) que é importante causa de dor, sons articulares e função mandibular irregular ou limitada. As DTM representam a maior causa de dor não dental na região orofacial, sendo a causa muscular a mais prevalente. O conhecimento detalhado da composição estrutural e funcional dos músculos da mastigação é fundamental para a compreensão dos mecanismos da DTM muscular. **Objetivos:** Analisar a distribuição da expressão das isoformas de miosina (rápida e lenta) e, a quantidade de fibras híbridas nos músculos temporal e masseter em material de autópsia da 1ª a 9ª décadas. **Casuística e métodos:** 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-morte de até 18 horas, de ambos os gêneros e com idades divididas por décadas (1ª a 9ª décadas). **Resultados:** Não houve diferença estatística significativa na porcentagem de fibras rápidas,

lentas e híbridas no músculo masseter e temporal quanto ao gênero, quanto à porcentagem de fibras rápidas e lentas na amostra total e nos grupos de jovens, adultos e idosos. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas na porcentagem de fibras rápidas do grupo de idosos, onde o masseter apresentou maior número de fibras rápidas. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados na porcentagem de fibras híbridas no músculo masseter, onde o grupo jovem apresentou mais fibras híbridas do que o adulto e este grupo mais que o grupo idoso. Também houve diferença significativa entre os grupos estudados na porcentagem de fibras híbridas no músculo temporal, onde o grupo jovem apresentou mais fibras do que o grupo adulto e idoso. **Conclusão:** Ao longo das nove décadas a porcentagem de fibras lentas foi similar a porcentagem de fibras rápidas nos músculos masseter e temporal. Quando a análise foi realizada separadamente comparando-se os músculos masseter e temporal houve diferença estatística ($p=0,023^*$) no grupo idoso com predomínio de fibras rápidas no músculo masseter. Observou-se fibras híbridas presentes desde a primeira década (1 mês de vida) persistindo até a nona década com predomínio no grupo jovem, presença decrescente ao longo das décadas no músculo masseter ($p < 0,001^*$). No músculo temporal observou-se predomínio de fibras híbridas no grupo jovem em relação aos grupos adulto e idoso ($p = 0,011^*$).

Descritores: fibras musculares de contração rápida, fibras musculares de contração lenta, fibras musculares híbridas, músculos mastigatórios.

Summary

Guimarães TB. *Characterization of fast, slow and hybrid fibers in masticatory muscles* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 75p.

Introduction: The masticatory muscles: masseter, temporalis, medial pterygoid and lateral pterygoid are essential components in the estomatognathic system. The mastication occurs through the function of these muscles, which provide direct contact between the upper and inferior arcades. In addition to their physiologic function, the masticatory muscles are involved in the temporomandibular dysfunction (TMD), which is an important cause of the pain, joint sounds and irregular or limited mandibular function. The TMD are seen as a distinct subgroup of rheumatologic and skeletal muscle disorders. They are the main cause of non dental pain in the orofacial area, being the muscular etiology as the most prevalent. The detailed understanding of structural and functional composition of the masticatory muscles is paramount to comprehend TMD due to muscle disorder.

Objective: To analyze the muscle fiber type distribution concerning fast and slow myosin expression, and the amount of hybrid fibers in temporalis and masseter muscles in autopsy samples from 1st to 9th decades of age.

Casuistics and methods: 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. **Results:** The percentage of slow muscle fiber in masseter and temporalis muscles were similar to the percentage of fast muscle fibers, when the samples were analyzed in the totality. However, when they were grouped in three different subgroups of ages: young, adult and old, elder subjects presented more fast than slow muscle fibers in masseter. There was no significant gender difference in masseter and temporalis muscles concerning fast and slow muscle fiber distribution. Significant difference of hybrid fiber distribution was observed among the young, adult and old groups. Young subjects presented more hybrid fibers than adult, who presented more than elder subjects in masseter. In temporalis, hybrid fibers were more observed within young group than adult or elder group. The presence of hybrid fiber was confirmed with the immunostaining of a single muscle fiber.

Conclusion: Slow and fast muscle fiber distribution is similar in both masseter and temporalis muscles in both gender subjects along the nine decades of age. However, when the samples were grouped in three subgroups of ages, fast muscle fibers significantly predominate ($p=0.023$) in masseter among the old group. Hybrid fibers were observed throughout the first to ninth decade of age. The frequency of hybrid fibers decreased significantly ($p<0.001$) with aging in masseter. In contrast, hybrid fibers were more observed among young than adult or old groups ($p=0.011$) in temporalis.

Descriptors: *muscle fibers, Fast-Twitch, Muscle Fibers, Slow-Twitch, hybrid fibers, masticatory muscles.*

1 Introdução

Os músculos da mastigação são componentes essenciais do “sistema estomatognático”. A mastigação decorre da movimentação destes músculos que promovem o contato direto entre os arcos dentais superior e inferior. São quatro os músculos da mastigação: Masseter, Temporal, pterigóideo lateral e pterigóideo medial.

O sucesso na atuação das atividades orais como falar, morder, engolir, mastigar requer o envolvimento de todos os músculos da mastigação. Para executar estas tarefas motoras estes músculos precisam ter a capacidade de controlar a posição da mandíbula com precisão na força aplicada para a execução do movimento, sendo isto possível devido a complexa arquitetura destes músculos. As fibras musculares podem ser classificadas em: tipo I (lentas e resistentes à fadiga) e tipo II (rápidas suscetíveis à fadiga). Esta velocidade de contração é principalmente dependente do conteúdo da cadeia pesada de miosina (Bottinelli et. al, 1996).

Em comparação aos músculos do tronco e dos membros, os músculos da mastigação, são bem diferentes. Os músculos da mastigação contêm fibras que são típicas do músculo em desenvolvimento, sendo característica marcante a frequência de fibras híbridas. Nos músculos dos membros e do tronco, as fibras híbridas são fibras em transição de um tipo para o outro, observadas predominantemente em condições específicas como o desuso, uso extremo (Klitgaard *et al.*, 1990), ou processo de

regeneração. (Pette *et al.*, 2002). Enquanto que nos músculos da mastigação estas estão presentes normalmente em grande quantidade (Kwa *et al.*, 1995; Bredman *et al.*, 1991; Stål *et al.*, 1994; Monemi *et al.*, 1999; Korfage *et al.*, 2000, 2001).

As fibras híbridas são fibras que expressam mais de uma isoforma de miosina. Por exemplo, fibras que expressam isoformas de miosina lenta (MyHC-I) e rápida (MyHC-II), serão mais rápidas do que as MyHC-I puras e mais lentas do que a MyHC-II, conferindo a estas fibras propriedades contráteis intermediárias.

Além de sua função fisiológica, os músculos da mastigação estão envolvidos na disfunção temporomandibular (DTM) que é importante causa de dor e queda de qualidade de vida da população em geral (Segu *et al.*, 2003).

Disfunção Temporomandibular (DTM) é um termo coletivo englobando um amplo aspecto de problemas clínicos, musculares e articulares na área orofacial. Estas desordens são caracterizadas principalmente pela dor, sons articulares e função mandibular irregular ou limitada. As DTM são consideradas como um subgrupo distinto das desordens reumatológicas e músculo-esqueléticas, e representam a maior causa de dor não dental na região orofacial (Zarb *et al.*, 2000).

Os sinais e sintomas de DTM são extremamente comuns. Estudos epidemiológicos sugerem que 50% a 60% da população geral tem algum sinal de DTM. A população adulta, de 20 a 40 anos, é a mais atingida. Uma forte predominância feminina foi observada em praticamente todas as

casuísticas clínicas de DTM (Okeson, 2000; Lund JP *et al*, 2002). A DTM mais comum é a de causa muscular.

Portanto, o conhecimento detalhado da composição estrutural e funcional dos músculos da mastigação é fundamental para a compreensão dos mecanismos da DTM muscular.

Não há descrição nos principais bancos de dados da literatura sobre a expressão das miosinas rápida, lenta e híbrida ao longo das décadas nos músculos da mastigação.

Este projeto tem, portanto, o objetivo de analisar a composição estrutural dos tipos de fibras quanto a expressão das isoformas de miosina rápida, lenta e híbrida na musculatura da mastigação.

1.1 Objetivos

Analisar os músculos Temporal e Masseter em material de autópsia da 1ª a 9ª décadas com o objetivo de:

1. Analisar a distribuição das fibras com expressão das isoformas de miosina (rápida e lenta).
2. Analisar a quantidade de fibras híbridas.

2 Revisão da Literatura

2.1 Disfunção temporomandibular

O sistema estomatognático está constituído dos dentes com as suas estruturas de suporte, ou seja, maxila, mandíbula, músculos da mastigação, articulações temporomandibulares, lábios, língua, bochecha e elementos vasculo nervosos (Paiva, Cavalcante 1997).

Os músculos da mastigação são componentes essenciais do “sistema estomatognático”. A mastigação decorre da movimentação destes músculos que promovem o contato direto entre os arcos dentais superior e inferior. São quatro os músculos da mastigação: Masseter, Temporal, pterigóideo lateral e pterigóideo medial.

As fibras superficiais do músculo Masseter elevam a mandíbula e as profundas retraem a mesma. A função do músculo Temporal é fechar a mandíbula sendo que as fibras posteriores e algumas fibras médias em ação bilateral retraem a mandíbula e em ação unilateral desviam a mandíbula para o lado ipsilateral (Simons *et al*, 2005).

Disfunção temporomandibular (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/cervical. Desta forma a DTM é considerada um subgrupo de disfunções músculoesqueléticas e reumatológicas gerais (Zarb *et al*, 2000).

Os sinais e sintomas de DTM são extremamente comuns. Estudos epidemiológicos sugerem que 50% a 60% da população geral tem algum tipo de DTM. A população adulta, de 20 a 40 anos, é a mais atingida (Okeson, 2000; Lund *et al*, 2002).

Pacientes com DTM apresentam diminuição da qualidade de vida (Segu *et al*, 2003). Murray *et al* (1996) e John *et al* (2002) demonstraram que a DTM causou um forte impacto na qualidade de vida de pacientes de um serviço de dor, e que alguns problemas funcionais, como dificuldades para mastigar alimentos aumentaram em até quatro vezes. Segundo McGrath *et al* (2003), em uma pesquisa realizada entre 1865 adultos, 72% relataram que problemas com a saúde bucal afetam diretamente a sua qualidade de vida.

No Brasil os dados são escassos, um estudo com estudantes universitários de 19 a 25 anos demonstrou que 68% apresentavam algum grau de DTM. (Pedroni *et al*, 2003) Em outro, 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 *et al*, 1996).

De acordo com o “*Research Diagnostic Criteria*” (Dworkin *et al*, 1992), a prevalência de transtornos musculares seria de 25%, das discopatias 3,3% e artrose de 4,2%. Sendo que 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 (LeResche, 1995). Em outro trabalho 80% das pacientes de 61 casos apresentavam DTM muscular, 33% deslocamento do disco, e 48% artralgia/artrite/artrose (Plesh O *et al*, 2005). Um outro estudo com 87 pacientes mostrou que 57,5% dos pacientes apresentavam desordem muscular (Lee L *et al*, 2008).

Segundo os dados acima e a observação clínica, a DTM mais comum é de causa muscular.

2.2 Anatomia dos músculos da mastigação

Os músculos da mastigação desempenham papel fundamental no “sistema estomatognático”, sendo que a mastigação ocorre através da movimentação destes músculos, promovendo o contato direto entre os arcos dentais superior e inferior. São quatro os músculos da mastigação: Masseter, Temporal, pterigóideo lateral e pterigóideo medial (Zarb, 2000).

O músculo Masseter é um músculo retangular, espesso, forte, recoberto pela fáscia massetérica. A fáscia insere-se no arco zigomático e nas bordas do ramo da mandíbula. O músculo Masseter, se estende do arco zigomático ao ramo da mandíbula.

Pode ser dividido em duas partes, uma superficial e outra profunda. A parte superficial, toma origem na margem inferior do osso zigomático, estendendo-se atrás até a metade do arco zigomático (sutura zigomatico-Temporal). A parte profunda, origina-se da margem inferior e face medial do arco zigomático, prolonga-se atrás até o limite da emiência articular. Assim a

parte superficial é mais anterior, e a profunda mais posterior. Esta disposição faz com que as fibras superficiais sejam mais inclinadas, e as profundas verticais.

Ambas as partes se inserem numa larga área que ocupa os dois terços inferiores da face lateral do ramo da mandíbula, as fibras da parte profunda mais acima e as da parte superficial mais abaixo.

Dos músculos da mastigação o músculo Masseter é o que eleva a mandíbula com maior potência. Por sua parte superficial, a mandíbula sobe ao mesmo em que desloca ligeiramente para frente, conforme o sentido oblíquo das fibras, a fim de ocluir os dentes. A parte profunda ajuda neste movimento de ascensão e age principalmente na manutenção da oclusão forçada por longos períodos.

O músculo Temporal é coberto pela fáscia Temporal, que se fixa acima da linha Temporal e margem do processo frontal do zigomático. Tal como um leque aberto, as porções anterior, média e posterior do músculo convergem num vasto tendão para espaço entre o crânio e o arco zigomático e se inserem no processo coronóide que aí se encontra.

O Temporal é mais um músculo de movimento do que de força. Suas fibras são paralelas e não trançadas como no Masseter, além de serem mais longas. Quando a mandíbula se eleva sem posição, como nos movimentos de falar ou fechar rapidamente a boca, as fibras do Temporal é que são requisitadas para esta função (Madeira, 2001).

A principal função das fibras do músculo Temporal é o fechamento da mandíbula. As fibras posteriores são ativadas de maneira consistente durante a retração mandibular (Simon *et al*, 2005)

Tabela 1: Anatomia dos músculos da mastigação (Madeira, 2001)

Músculo	Origem	Inserção	Inervação	Função
Masseter	Margem inferior do osso zigomático e margem inferior do arco zigomático.	Nos dois terços inferiores da face lateral do ramo da mandíbula.	Nervo massetérico ramo do mandibular (trigêmeo).	Eleva (com força) a mandíbula.
Temporal	Assoalho da fossa Temporal e superfície medial da fáscia Temporal.	Bordas e face medial do processo coronóide (crista Temporal) e borda anterior do ramo da mandíbula.	Nervos temporais profundos ramo do mandibular (trigêmeo).	Eleva a mandíbula (mais velocidade do que potência). Retrai a mandíbula com a porção posterior.

2.3 Histórico sobre os tipos de fibras do músculo esquelético

Em meados da segunda metade do século dezenove, houve uma preocupação dos pesquisadores em buscar uma explicação para a variação na cor da fibra dos músculos, nos aspectos fisiológico e estrutural. Ciaccio, em 1898, afirmou que as primeiras pesquisas sobre a variação na cor da fibra dos músculos datavam de 1678, quando Stefano Lorenzino, observando os músculos de animais, havia classificado as fibras musculares em brancas e vermelhas.

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.

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, comentou que 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 (Knoll, 1891 apud Dubowitz, 1985).

Músculos vermelhos eram ricos em mitocôndria e apresentavam alta atividade respiratória, enquanto músculos brancos apresentavam uma

menor quantidade de mitocôndria e baixa atividade respiratória conforme afirmação de Paul Sperling, em 1952.

Os métodos de histoquímica foram desenvolvidos na década de 50 possibilitando estudar o sistema enzimático, os componentes celulares das fibras musculares e correlacionar as atividades funcionais de cada fibra com sua morfologia (apud Guba *et al*, 1980).

As primeiras investigações em amostras de autópsias humanas foram feitas por Wachstein e Meisel, em 1955, que notaram uma variação na atividade da succinato desidrogenase (SDH) nas fibras e que as fibras mais reativas eram as de menor diâmetro.

Em 1960, Dubowitz e Pearse dividiram as fibras em dois tipos: tipo I e tipo II, comparando as atividades das fosforilases e desidrogenases. As tipo I apresentava alta atividade oxidativa e baixa glicolítica; ao contrário das fibras tipo II com baixa atividade oxidativa e alta glicolítica. A atividade enzimática observada nas fibras intermediárias não foi considerada pelos autores como outro tipo distinto de fibra.

Engel, em 1962, também descreveu dois tipos de fibras em humanos, baseado na atividade miofibrilar e de adenosina trifosfatase (ATPase): fibras tipo I com baixa atividade de ATPase e fibras tipo II com alta atividade ATPase.

Brooke, Kaiser (1970) definiram três tipos de fibras em músculo esquelético normal, com base na reação de ATPase, com pré-incubação variando o pH em 9,4, 4,6 e 4,3. As fibras do tipo I eram pouco reativas na ATPase com pH 9,4 e as fibras do tipo II eram mais reativas na ATPase com

pH 9,4 e foram subdivididas em: fibras tipo IIA, com fraca reação no pH 4,6 e 4,3; fibras tipo IIB, com forte reação no pH 4,6, mas fraca no pH 4,3; e, um subtipo de fibras IIC que apresentavam uma reação positiva residual no pH 4,3, mas negativa em um pH menor.

Com o desenvolvimento do conhecimento sobre proteínas, houve uma evolução para a classificação de acordo com a composição protéica e funcional dos tipos de fibras. Desta maneira as fibras musculares esqueléticas foram classificadas de acordo com a sua característica fisiológica mais importante que é a velocidade de contração em fibras de contração lenta e fibras de contração rápida (Dubowitz, 1985).

A tipagem das fibras musculares pode também ser realizada de acordo com a 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 da linha Z e contração muscular (Dubowitz, 1985).

Existem várias isoformas de miosina (proteínas que apresentam a mesma função, mas são codificadas por diferentes genes). Em humanos, essas isoformas de miosina codificadas por uma família de multigenes são agrupadas em 2 localizações distintas, 2 genes no cromossomo 14 e 6 no cromossomo 17. As isoformas são: MyHC (cadeia pesada de miosina) cardíaca, MyHC I (lenta), MyHC IIA (rápida), MyHC IIX/IIB (rápida), MyHC extra-ocular, MyHC embrionária, e MyHC neonatal (Korfage et al, 2000).

Em resumo, as fibras musculares esqueléticas podem ser classificadas de acordo com:

Tabela 2: Classificação das fibras musculares esqueléticas

	Atividade enzimática	Composição proteica
Tipo I	tipo I	miosina lenta
Tipo II	tipo IIA, IIX, IIB	miosina rápida
Híbridas	tipo IM, IIC	miosina rápida/lenta

A velocidade de contração das fibras musculares aumenta sucessivamente do tipo I para o tipo IIA, IIX/IIB, enquanto a fatigabilidade decresce na mesma ordem (Bottinelli *et al.*, 1996).

2.4 Tipos de fibras nos músculos da mastigação

Os primeiros trabalhos envolvendo músculos da mastigação são de Ringqvist (1973b) que avaliou 10 indivíduos com prognatismo mandibular (2 homens e 8 mulheres) com idades variando entre 18 e 33 anos, tentou relacionar o tamanho e a distribuição da porcentagem dos diferentes tipos de fibras no músculo Masseter com a oclusão. Entretanto, a autora não conseguiu correlacionar os parâmetros estudados de maneira significativa. A porcentagem de fibras do tipo I variou de 9 a 55%, das fibras tipo II variou de 28 a 89% e das fibras intermediárias de 1 a 35%. Em estudo subsequente (1974a) ampliando a amostra para 21 indivíduos (nove homens de 20 a 25 anos e 12 mulheres de 18 a 33 anos) a porcentagem de fibras do tipo I foi de

28,6 % (variando de 7,8 a 55,3%), das fibras tipo II foi de 57,2% (variando de 19,3 a 90,1%) e fibras intermediárias de zero a 46,3%.

De acordo com estudos feitos no músculo Temporal, pela mesma autora (1974b) em 11 pacientes (cinco homens e 6 mulheres de 18 a 33 anos) a média de fibras do tipo I foi de 31%, das fibras do tipo II foi de 64% e intermediárias foi de 5%.

Eriksson, Thornell (1983) estudaram 6 homens de 15 a 25 anos de 1 a 3 dias *post mortem*. Verificaram que cada músculo e as subunidades destes músculos mostravam um padrão característico das fibras tanto na frequência relativa, como no diâmetro dos tipos de fibras, que o diferiam significativamente entre as diferentes porções. Observaram a diferença entre os diâmetros das fibras tipo I e tipo II, sendo as fibras do tipo II geralmente menores, o que deveria refletir em mudanças evolutivas nos hábitos mastigatórios, assim como a adaptação aos alimentos de diferentes texturas.

Boyd *et al* (1984) coletaram amostras do músculo Masseter de 9 indivíduos (4 homens e 5 mulheres) de 14 a 31 anos submetidos a cirurgia de correção maxilar. Esses autores decreveram igual distribuição na porcentagem de fibras do tipo I e do tipo II.

Shaughnessy *et al* (1989) avaliou no músculo Masseter de 11 mulheres de 16 a 31 anos submetidas a cirurgia de correção maxilar. Relataram que a distribuição das fibras apresenta uma grande variação interindividual. Foi encontrado predomínio de fibras do tipo I $57 \pm 15,4\%$ em relação as fibras do tipo II $49 \pm 13,2\%$.

Segundo estudos de Bredman et al (1991) que avaliaram 5 amostras do músculo Masseter, 6 amostras do músculo Temporal e 1 amostra do músculo pterigóideo lateral de humanos, a MyHC α -cardíaca foi encontrada em fibras que continham MyHC rápida ou rápida e lenta, mas nunca em fibras que continham apenas MyHC lenta. A fibra MyHC α -cardíaca apresentava uma velocidade de contração intermediária entre as fibras MyHC lenta e rápida e tinham uma atividade de ATPase três vezes maior que a fibra MyHC lenta. Em seus experimentos verificaram uma distribuição mais vasta das fibras MyHC α -cardíaca. A fibra MyHC α -cardíaca só era encontrada no músculo esquelético originário da parte craniana de um embrião (incluindo o coração).

2.4.1 Fibras musculares esqueléticas híbridas

As fibras híbridas são aquelas que expressam mais de uma isoforma de miosina, portanto as fibras que expressam MyHC I e II serão mais rápidas do que as MyHC I e mais lentas do que a MyHC II.

Os músculos da mastigação quando comparados aos músculos dos membros e do tronco são bem diferentes. Além das fibras rápidas e lentas, esses músculos contêm fibras neonatais. Outra característica notável é que uma grande quantidade dessas fibras são híbridas.

Stal *et al* (1994) estudaram 5 homens com idade média de 15 a 41 anos e notaram tanto similaridades como diferenças entre os músculos orofaciais (zigomático, bucinador, orbicular da boca), Masseter e do membro (bíceps braquial e primeiro músculo interósseo), no conteúdo da cadeia

pesada de miosina e cadeia leve de miosina, porém cada músculo possuía sua própria identidade distinta. O Masseter continha isoformas de miosina aberrantes, tais como MyHC neonatal e α -cardíaca e combinações únicas de isoforma de cadeia pesada. Esta combinação não foi encontrada nos músculos do membro e oro-facial. No Masseter foram detectadas os tipos de fibras I, IM (híbrida), IIC (híbrida) e IIB, entretanto as fibras do tipo IIA foram raras. Descreveram as fibras de acordo com suas expressões de isoformas da MyHC e distinguiram até dois tipos diferentes de fibras nos músculos oro-faciais e dos membros e até quatro no músculo Masseter. Os músculos oro-faciais e dos membros expressavam cinco cadeias leves de miosina e o Masseter oito tipos sendo que uma delas foi a forma fetal, a qual não estava presente nos músculos esqueléticos do adulto. Os resultados provavelmente refletem como os músculos se desenvolveram para responder a demandas funcionais específicas.

Monemi *et al* coletaram amostras da parte anterior e posterior da porção superficial e profunda do músculo Masseter e bíceps braquial de 6 indivíduos idosos (58 a 83 anos; média de 74 anos) e 5 adultos jovens (19 a 25 anos) de 1 a 3 dias *post mortem*. Em estudo de 1996, observaram uma proporção relativamente maior das fibras do tipo IM e tipo II e constataram uma diminuição na proporção de fibras do tipo I em trabalho publicado em 1998. Já em 1999, notaram que ocorria um aumento da MyHC neonatal, rápida e híbrida com o passar da idade. No entanto, notaram aumento de fibras MyHC lentas no bíceps com o avançar da idade . As mudanças no

Masseter do idoso ocorriam em regiões específicas sendo mais significativas na porção superficial.

Korfage, Van Eijden (1999) estudaram 7 cadáveres caucasianos (4 homens e 3 mulheres com idade média de 71,6 anos $\pm$ 15 anos) e observaram diferenças regionais na composição dos tipos de fibras no músculo Temporal humano. Descreveram a presença de 24% de fibras do tipo I e 57% de fibras intermediárias na porção posterior do músculo, enquanto observaram 46% de fibras tipo I na porção anterior do músculo Temporal. A presença de fibras musculares rápidas puras, tipo IIA e IIX foi constante em todo o músculo. Não detectaram diferença significativa na composição quanto aos tipos de fibras I, IIA e IIX na porção média deste músculo. As fibras musculares puras do tipo IIB não foram encontradas. As fibras MyHC neonatal e fibras MyHC α -cardíaca também estavam presentes em combinações diversas com as fibras com outros tipos de cadeia no músculo Temporal. As fibras híbridas apresentavam MyHC α -cardíaca ou MyHC fetal e foram encontradas em todos os músculos temporais analisados em abundância (31%).

Korgage et al (2001) obtiveram 8 amostras dos músculo de fechamento da mandíbula (Temporal, Masseter, pterigóideo medial e pterigóideo lateral), supra - hioideos (estilohioideo, milohioideo, geniohioideo, digástrico) e infra - hioideos (esternohioideo, esternotiroideo, tireóideo) de cadáveres caucasianos (5 homens e 3 mulheres) com idade média 71,6 $\pm$ 15 anos. Concluíram que os músculos de fechamento continham 10,8 $\pm$ 7% de IIA, 10,1 $\pm$ 9,2% de IIX, 36,6 $\pm$ 7,0% de tipo I, 42,4 $\pm$ 9,3% de fibras híbridas.

Os músculos de fechamento apresentavam 4.2 vezes menos fibras tipo IIA, 5.2 vezes mais fibras híbridas que os músculos supraiohídeo, e 3.9 vezes menos fibras tipo IIA e 3.2 vezes mais fibras híbridas que os músculos infraioídeos.

Korfage et al (2003) avaliaram 218 fibras por separação eletroforética de 4 cadáveres caucasianos (12 a 36 horas *post mortem*), 117 fibras na região posterior do músculo Temporal, 52 fibras do ventre anterior do digástrico e 52 fibras do ventre posterior do digástrico. Os autores encontraram no músculo Temporal 26,3% de fibras tipo I, 14,9% de fibras do tipo II e 58,8% de fibras híbridas.

2.5 Desenvolvimento e diferenciação das fibras musculares

Colling-Saltin (1978), analisando amostras de músculos fetais de humanos através de técnicas histoquímicas, verificaram que na 20ª semana gestacional, 100% das fibras musculares eram indiferenciadas. Descreveram o surgimento da fibra de grande calibre (2%), também denominada de Wohlfart B (diâmetro médio de 12,4µ) entre a 21ª e a 25ª semanas de gestação. Nas semanas seguintes, até a 30ª semana de gestação, 97% das fibras eram indiferenciadas (diâmetro médio de 8,4µ), 3% eram fibras tipo I (diâmetro médio de 10,4µ), 2% eram fibras tipo I de grande calibre (diâmetro médio de 16,9µ), 32% eram fibras tipo I normal (diâmetro médio de 8,5µ), 20% eram fibras tipo IIA (diâmetro médio de 13,7µ) e 5% eram do tipo IIB (diâmetro médio de 13,7µ). Entre 38ª e 42ª semanas de gestação, 17% das fibras eram indiferenciadas (diâmetro médio de 14,8µ). 1% eram tipo I com

grande calibre (diâmetro médio de 22,8 μ) 37% eram fibras do tipo I normais (diâmetro médio de 14,7 μ), 38% eram fibras IIA (diâmetro médio de 16,8 μ) e 7% eram fibras tipo IIB (diâmetro médio de 17 μ).

Notaram que o número de fibras indiferenciadas diminuía proporcionalmente ao surgimento de fibras tipo I. Após o nascimento, ocorria a continuação do processo de maturação e diferenciação das fibras musculares, sendo mais evidente no 1^o ano de vida estabilizando-se na fase adulta. Na idade adulta, o mosaico era composto por 1 a 2% de fibras indiferenciadas, 55% de fibras tipo I, 32% de fibras tipo IIA e 12% de fibras tipo IIB. Estes valores foram obtidos de estudos do músculo quadríceps femoral, no qual a proporção entre as fibras do tipo I e II foi de 1:1. No músculo bíceps braquial, esta relação encontrava-se modificada, apresentando a proporção entre as fibras tipo I, IIA e IIB de 1:1: 1.

Fidzianska (1980), utilizando células musculares indiferenciadas notou que entre a 7^a e 10^a semanas de gestação ocorre a transição de mioblastos para miotubúlos primários formando um padrão típico do sarcômero com bandas A, Z, I e M. Entre a 11^a e a 15^a semanas de gestação, ocorre a fusão dos miotúbulos primários, originando miotúbulos maduros. Entre a 15^a e a 22^a semanas de gestação ocorre acentuada mudança na estrutura e organização das células musculares. O período entre a 22^a e a 24^a semanas de gestação parece ser o último estágio da miogênese humana quando ocorre fusão de células indiferenciadas com os miotúbulos maduros, formando as fibras musculares imaturas, as quais sofrerão processo de maturação até a 30^a semana.

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 neonatal 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 *et al*, 1984; Kelly *et al*, 1994; Ghosh *et al*, 1998).

2.6 Diferenças entre os músculos da mastigação e os músculos apendiculares e tronculares

Os músculos da mastigação diferem dos músculos apendiculares em alguns aspectos.

Primeiro, os músculos da mastigação apresentam muitas fibras híbridas, sendo que muitas dessas fibras co-expressam miosina fetal ou cardíaca. (Korfage *et al*, 2001, Stal *et al*, 1994; Sciote *et al*, 1994, Monemi *et al*, 1999).

Segundo, nos músculos apendiculares e tronculares as fibras rápidas apresentam maior diâmetro do que as lentas, sendo que nos músculos da mastigação as fibras rápidas e neonatais apresentam diâmetro menor do que as fibras do tipo I (Soussi-Yanicostas *et al*, 1990).

Terceiro, existe uma diminuição na quantidade de fibras lentas com o passar da idade, ao mesmo tempo que ocorre um aumento das fibras rápidas, já no bíceps braquial tem aumento da miosina lenta com o passar da idade (Monemi *et al*, 1999; Langenbach *et al*, 2008).

Quarto, o período de maturação das fibras nos músculos da mastigação é mais prolongado quando comparado aos músculos apendiculares e tronculares.

Soussi-Yanicostas *et al* (1990) sugeriram que o controle do desenvolvimento do músculo Masseter envolve mecanismos diferentes dos outros músculos do corpo. Estes autores demonstraram que a MyHC embrionária e fetal eram expressas no desenvolvimento perinatal e pós-natal. A MyHC lenta e MyHC rápida são expressas com tempo mais tardio no Masseter do que no quadríceps. Na 24^a semana observa-se apenas as isoformas embrionária e neonatal. Na 37^a semana a miosina neonatal é a isoforma predominante, já na fase adulta a MyHC lenta foi a isoforma mais frequentemente observada. Em contrapartida, no quadríceps as miosinas rápidas e lentas já eram predominantes na 37^a semana de gestação. Com anticorpos diretos contra diferentes isoformas de MyHC, foi possível demonstrar através da técnica de imunoistoquímica que o Masseter na 37^a semana de gestação era menos desenvolvido que outros músculos esqueléticos no mesmo estágio. Além de uma grande quantidade de MyHCs embrionária e neonatal e pequena quantidade de MyHC rápida e lenta presente no músculo, havia também uma diferença na maturação

morfológica. O Masseter estava sujeito a um período muito prolongado de maturação como demonstrado por dados bioquímicos e imunoistoquímicos.

Tabela 3: Representação esquemática da evolução da cadeia de miosina pesada (MyHC) durante o desenvolvimento do músculo Masseter (M) comparado ao músculo quadríceps (Q) (Soussi-Yanicostas et al, 1990)

		24 semanas		37 semanas		18 meses			
Adulto									
M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q
MyHC _{emb}	+	+	↓	↓	+	-	+	-	-
MyHC _{neonatal}	-	+	+	↓	+	↓	+	-	-
MyHC _f	-	-	↓	+	+	+	+	+	+
MyHC _s	-	-	↓	+	+	+	↑	+	+

MyHC_{emb} - Cadeia de miosina pesada embrionária

MyHC_{neonatal} - Cadeia de miosina pesada neonatal

MyHC_f - Cadeia de miosina pesada rápida

MyHC_s - Cadeia de miosina pesada lenta

↓ pouca quantidade de fibras

↑ muita quantidade de fibras

2.7 Técnicas de tipagem de fibras

A tipagem das fibras pode ser feita através de métodos histológicos, histoquímicos e imunoistoquímicos (Dubowitz, 1985).

2.7.1 Técnica histoquímica

As fibras musculares podem ser classificadas de acordo com a atividade miofibrilar da adenosina trifosfatase (ATPase). No pH 4.3 as fibras do tipo I apresentam reatividade escura e as do tipo II mais claras. No pH 4.6, as fibras do tipo I reagem mais do que no pH 4.3, no entanto, as fibras tipo II variam, sendo que as fibras IIA são inibidas e reagem mais fracamente e as fibras do tipo IIB reagem mais fortemente. No pH 9.4 as fibras tipo I são reativas numa tonalidade mais clara, as fibras tipo II são mais escuras e as intermediárias usualmente não são vistas nessa reação (Dubowitz, 1985).

2.7.2 Reações Imunoistoquímicas

A classificação baseada na isoforma de miosina é similar a classificação histoquímica pela ATPase. Porém alguns problemas são encontrados na técnica de histoquímica. Existem dúvidas relacionadas a esta técnica, como por exemplo na identificação de fibras de coloração intermediária, a falta de reprodutibilidade em diferentes laboratórios e a nomenclatura usada. Não é possível a identificação das fibras que expressam miosina neonatal e/ou miosina cardíaca na técnica histoquímica (Shiaffino et al, 1989).

O método imunoistoquímico, por sua vez é mais preciso uma vez que reconhece o antígeno por um anticorpo específico (Junqueira e Carneiro, 2000). Desta forma é possível a identificação precisa das fibras tipo I de

contração lenta que expressam a miosina lenta e as fibras tipo II de contração rápida que expressam miosina rápida utilizando-se de anticorpos específicos para cada tipo de miosina, rápida e lenta.

Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais. Os anticorpos policlonais que reconhecem um "pool" de proteínas com similaridades ao antígeno em questão quando aplicados ao músculo humano têm mostrado tipos de fibras comparáveis com aqueles demonstrados histoquimicamente (Biller *et al* 1980). Outros autores (Thornell *et al* 1984) têm demonstrado que o uso de anticorpos policlonais contra miosina podem revelar diferenças entre os grupos reconhecidos via método histoquímico, levando a conclusão que o uso destes anticorpos policlonais é pouco preciso na tipagem das fibras.

Assim sendo torna-se necessário o uso de anticorpos monoclonais específicos para a finalidade de identificação dos tipos de fibras.

3 Métodos

3.1 Casuística

Foram obtidas 60 amostras dos músculos da mastigação (Masseter e Temporal) do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (São Paulo) da USP, conforme as normas do serviço, e autorizado pelo comitê de ética e pesquisa da faculdade de medicina da USP, com intervalo *post-mortem* de até 18 horas, de ambos os sexos, de idades divididas por décadas. Foram incluídas 37 amostras da 1ª a 9ª décadas no período de 28 de abril de 2006 a 04 de dezembro de 2007.

Tabela 4: Casuística

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

3.2 Métodos

Os músculos utilizados para este experimento foram: Masseter e Temporal, sendo que o músculo Masseter foi retirado de sua porção profunda, por via extraoral e o músculo Temporal médio foi retirado por via superior, quando da abertura do crânio para retirada do encéfalo. O tamanho das amostras foram de 2 x 2 x 1 cm.

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 acompanhavam o fragmento. O espécime foi fixado em cortiça, dispondo-se o fragmento muscular com direcionamento do maior eixo das fibras ortogonal ao plano da cortiça para permitir cortes transversais das fibras musculares e o fragmento foi recoberto com talco neutro. A seguir congelado diretamente em nitrogênio líquido a 170°C negativos, por imersão direta, permanecendo mergulhado no nitrogênio líquido até seu completo congelamento. As amostras foram armazenadas em um freezer a 80°C negativos até o seu uso.

Os cortes foram realizados em criostato a -25°C, em lâminas silanizadas, com 6µm de espessura e foram armazenadas em freezer à -80°C até os procedimentos histológicos e imunoistoquímicos.

Os critérios de exclusão foram pacientes com doenças infecto contagiosas e amostras com infiltrado inflamatório.

3.2.1 Estudo histoquímico qualitativo morfológico

A morfologia das fibras dos músculos tais como quantidade, a posição dos núcleos e estruturas citoarquiteturais normais das fibras musculares foram analisadas através da coloração histológica hematoxilina e eosina usualmente empregada em rotina de análise morfológica de biópsia muscular esquelética em congelação. As amostras que demonstraram infiltrado inflamatório, proliferação de tecido conjuntivo e/ou outras anormalidades estruturais nas fibras musculares foram excluídas da presente análise.

3.2.2 Estudo imunoistoquímico quantitativo

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.

Tabela 5: Lista dos Anticorpos empregados no estudo e a diluição utilizada

Anticorpo monoclonal	Clone	Empresa	Diluição
Anti-miosina rápida	WB-MYHCf	Novocastra	1:40
Anti-miosina lenta	WB-MYHCs	Novocastra	1:80

A técnica de imunoperoxidase StreptABComplex/HRP foi realizada em material congelado segundo o protocolo a seguir:

- Fixação dos cortes seriados em acetona gelada a 4°C por 10 minutos. Lavar com água corrente e água destilada por 5 minutos; Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol, com três trocas de 10 minutos cada.
- Lavagens em água corrente e água destilada.
- Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina bovina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida: 1 hora a 37°C e 18 horas (overnight) a 4 °C;
- 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 37°C. Na reação com Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABS), o anticorpo secundário deve estar biotilado;

- Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.
- Incubação com Complexo Peroxidase-anti-peroxidase (Kit LSAB+, DAKO código K0690), em câmara úmida: 30 minutos a 37°C;
- 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 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.

3.2.3 Análise imunoistoquímica

A análise da expressão de miosinas rápida e lenta obtidas por reações imunoistoquímicas foi realizada interobservador e intraobservador e a diferença entre eles foi menor do que 10%.

A distribuição dos tipos de isoformas de miosina rápida e lenta ao longo das décadas foi estudado através da quantidade de célula de cada tipo.

Foram analisadas 500 fibras de cada amostra nas reações imunoistoquímicas para miosina rápida e miosina lenta com aumento de 200x 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, visualizá-las, calibrá-las 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 ou 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. Foram 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.

3.2.4 Dupla marcação

A análise da quantidade de fibras híbridas nos músculos Masseter e Temporal foi realizada através de fotografias obtidas de cortes seriados em campos da mesma região na reação de miosina rápida e lenta.

Para se obter a porcentagem de fibras híbridas foram contadas as fibras com marcação tanto com a miosina rápida como com a miosina lenta. O resultado foi dividido pelo número total de fibras sendo contadas no mínimo 500 fibras.

3.2.5 Isolamento das fibras musculares.

Foi realizado o isolamento e a fixação da fibra do músculo Temporal de um cadáver de 42 anos. O fragmento foi posicionado com um alfinete e fixado com um elastômero à base de silicone e submerso em 2% de paraformaldeído em 0.1M de tampão de fosfato por 30 minutos, seguido de lavagens com tampão PBS e fixação em metanol gelado (-20°C) por 6 minutos. A amostra foi conservada em 50% glycerol a 4°C por 24 horas e posteriormente conservada por 15 dias a -20°C.

Após retirar as fibras do freezer foi feita a dissecação até a obtenção de fibras únicas e estas fibras foram incubadas com o anticorpo anti-miosina

lenta, novocasta, 1:80; a imunoistoquímica foi realizada segundo o protocolo descrito acima.

3.2.6 Análise estatística

Para comparação de 2 grupos (sexo, comparação entre Masseter e Temporal) utilizou-se *teste t de Student* ou *teste de Mann-Whitney*.

Na comparação de 3 grupos (idade) utilizou-se a técnica de Análise de Variância (ANOVA) ou *teste de Kruskal-Wallis*.

4 Resultados

4.1 População de estudo

Foram coletados para o presente estudo um total de 60 amostras, sendo 37 amostras do sexo masculino e 23 do sexo feminino.

A idade dos 36 indivíduos variou de 1 mês a 87 anos, completando as 9 décadas. Das 37 amostras coletadas do sexo masculino 20 foram incluídas e 16 excluídas do estudo e das 23 amostras coletadas do sexo feminino 17 foram incluídas e 6 excluídas do estudo pelo diagnóstico final da autópsia, por doenças infecciosas, por apresentarem infiltrado inflamatório ou proliferação de tecido conjuntivo, na análise morfológica pela HE.

A média das idades está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Casuística

Décadas	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª
Masculino	7 meses	20	26	36	41,6	58,5	65	73	83,5
Feminino	7 meses	19,5	27	40	45	54,3	62	78,5	86

As figuras 1 e 2 apresentam a expressão da miosina rápida e lenta nos músculos Temporal e Masseter nos indivíduos do gênero masculino e feminino nas diferentes décadas.

Figura 1A: apresentação da expressão de miosina rápida e lenta no músculo Temporal nos indivíduos do gênero masculino nas diferentes décadas.

Figura 1B: apresentação da expressão de miosina rápida e lenta no músculo Masseter nos indivíduos do gênero masculino nas diferentes décadas.

Figura 2A: apresentação da expressão de miosina rápida e lenta no músculo Temporal nos indivíduos do gênero feminino nas diferentes décadas.

Sexo feminino-músculo Masseter			
	Miosina Rápida	Miosina Lenta	Décadas
J			1ª década
K			2ª década
L			3ª década
M			4ª década
N			5ª década
O			6ª década
P			7ª década
Q			8ª década
R			9ª década

Figura 2B: apresentação da expressão de miosina rápida e lenta no músculo Masseter nos indivíduos do gênero feminino nas diferentes décadas.

A tabela 7 apresenta a contagem da miosina rápida e lenta das 37 amostras divididas por gênero e década nos músculos Masseter e Temporal, representação gráfica nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

Tabela 7: Resultados da contagem de miosina rápida e lenta.

Década	Masseter				Temporal				
	Lenta	Média±D.P.	Rápida	Média±D.P.	Lenta	Média±D.P.	Rápida	Média±D.P.	
Masculino	1	98,6	87,3±16,0	71,9	81,0±12,8	96,0	95,6±0,6	82,4	78,2±5,9
		76,0		90,0		95,1		74,0	
	2	81,7		76,7		58,7		60,1	
	3	80,6	58,9±30,7	97,2	88,8±12,0	59,4	57,2±3,2	85,4	82,5±4,1
		37,2		80,3		54,9		79,7	
	4	91,3	76,1±34,1	30,6	54,3±27,7	80,4	74,9±5,1	59,7	57,6±6,5
		100,0		47,7		70,4		62,7	
		37,0	84,7	74,0	50,3				
	5	95,6	68,3±24,3	41,6	62,8±18,7	74,3	66,7± 20,1	71,7	71,7±17,2
		60,2		76,8		81,9		54,6	
		49,2	70,0	44,0	88,9				
	6	68,3	60,1±11,7	74,2	81,0±9,6	73,0	65,1±11,2	59,4	71,6±17,3
		51,8		87,8		57,1		83,8	
	7	89,4	79,9±13,4	76,1	78,5±3,3	67,0	66,9±0,1	42,8	46,0±4,5
		70,4		80,8		66,8		49,1	
	8	69,8	62,0±7,9	57,7	66,7±9,1	60,7	61,4±7,3	52,5	62,1±11,8
		54,1		75,7		62,1		71,7	
		61,7	68,7	74,0	50,3				
9	67,3	81,3±19,7	95,1	83,9±15,8	61,1	64,0±4,0	84,0	66,6±24,7	
	95,2		72,7		66,8		49,1		
Feminino	1	65,9	73,0±10,0	100,0	76,9±32,7	78,3	63,3±21,2	98,3	79,4±26,7
		80,0		53,8		48,3		60,5	
	2	44,0	59,4±21,8	99,9	82,3±25,0	57,2	64,9±10,8	71,4	69,4±2,9
	74,8	64,6		72,5		67,3			
	3	89,2		75,9		76,1		89,3	
	4	80,0		53,8		48,3		60,5	
	5	92,5	89,4±4,5	24,4	39,9±21,9	70,4	79,0±12,1	64,9	56,4±12,0
		86,2		55,4		87,5		47,9	
	6	54,5	71,4±14,8	97,8	93,5±9,4	70,9	64,9±17,4	63,5	72,5±16,4
		82,4		100,0		78,6		62,6	
		77,2	82,7	45,3	91,4				
	7	67,9	53,3±20,7	55,4	66,7±15,9	66,0	50,6±21,9	33,1	55,4±31,5
38,7		77,9		35,1		77,7			
8	73,4	51,2±31,4	58,1	79,1±29,6	68,6	54,9±19,5	58,1	67,0±12,5	
	29,0		100,0		41,1		75,8		
9	66,4	80,1±19,3	72,5	56,1±23,3	69,9	75,7±8,1	85,7	56,7±41,1	
	93,7		39,6		81,4		27,6		

% de Miosina Rápida e Lenta nos Músculos Masseter e Temporal

Gráfico 1

Temporal Masculino

Gráfico 2

Masseter Masculino

Gráfico 3

Temporal Feminino

Gráfico 4

Masseter Feminino

Décadas

O número de amostras por década não foi suficiente para permitir a análise estatística, portanto a amostra foi dividida por grupo etário: jovem até 25 anos, adulto de 26 a 59 anos e idoso acima de 60 anos.

Por restrição de número de casos os grupos de recém-nascidos, crianças e jovens foram agrupados no grupo denominado Jovem.

Nas comparações entre os grupos etários foram encontrados os seguintes resultados: não houve diferença significativa na % de fibras rápidas e lentas nos músculos Masseter e Temporal ($p = 0,112$, $0,824$, $0,068$ e $0,889$, respectivamente).

Os resultados estão apresentados na tabela 8 e a representação gráfica nos gráficos 5, 6, 7 e 8.

Tabela 8: Comparação dos tipos de fibras (rápida e lenta) segundo o grupo etário.

Músculos		Jovem (n = 8)	Adulto (n = 16)	Ioso (n = 13)	P
Masseter	Rápida (%)	média $\pm$ dp	85,3 $\pm$ 12,7	67,8 $\pm$ 22,9	0,112
		mediana	90,5	72,7	
		mínimo – máximo	64,7 – 100,0	39,6 – 100,0	
	Lenta (%)	média $\pm$ dp	71,0 $\pm$ 18,4	67,5 $\pm$ 19,4	0,824
		mediana	75,4	68	
		mínimo – máximo	44,0 – 98,6	29,1 – 95,3	
Temporal	Rápida (%)	média $\pm$ dp	77,3 $\pm$ 11,9	60,5 $\pm$ 20,3	0,068
		mediana	76,6	58,1	
		mínimo – máximo	60,2 – 98,8	27,6 – 88,5	
	Lenta (%)	média $\pm$ dp	67,3 $\pm$ 24,2	63,5 $\pm$ 12,6	0,889
		mediana	66	66,8	
		mínimo – máximo	21,2 – 96,0	35,2 – 81,5	

Variáveis segundo o grupo etário

Gráfico 5

Gráfico 6

Gráfico 7

Gráfico 8

Grupo etário

Nas comparações entre as porcentagens de fibras rápidas e lentas foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na avaliação no músculo Masseter e Temporal na amostra total ($p = 0,639$ e $0,435$ respectivamente);
- diferença não significativa na avaliação no músculo Masseter e Temporal no grupo jovem ($p = 0,175$ e $0,301$ respectivamente); no grupo adulto ($p = 0,674$ e $0,441$ respectivamente); e no grupo idoso ($p = 0,648$ e $0,710$ respectivamente).

Os resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Comparação entre a porcentagem de fibras rápidas e lentas.

Músculos		Porcentagem de Fibras		Diferença	P	
		Rápida	Lenta	Rápida- Lenta		
Masseter	Amostra Total (n =37)	média ± dp	72,9 (19,6)	70,2 (19,5)	-2,7 (34,4)	0,639
	Jovem (n=8)	média ± dp	85,3 (12,7)	71,0 (18,4)	-14,3 (26,8)	0,175
	Adulto (n = 16)	média ± dp	67,8 (22,9)	72,1 (21,1)	4,3 (39,9)	0,674
	Idoso (n = 13)	média ± dp	71,6 (16,3)	67,5 (19,4)	-4,1 (31,5)	0,648
Temporal	Amostra Total (n =37)	média ± dp	68,5 (17,0)	64,8 (17,3)	-3,6 (27,9)	0,435
	Jovem (n=8)	média ± dp	77,3 (11,9)	67,3 (24,2)	-10,0 (25,4)	0,301
	Adulto (n = 16)	média ± dp	70,5 (14,1)	64,7 (17,8)	-5,8 (29,3)	0,441
	Idoso (n = 13)	média ± dp	60,5 (20,3)	63,5 (12,6)	3,0 (28,3)	0,710

Nas comparações entre os músculos Masseter e Temporal foram encontrados os seguintes resultados:

-diferença não significativa na % de fibras rápidas e lentas na amostra total ($p = 0,158$ e $0,063$ respectivamente);

-diferença não significativa na % de fibras rápidas e lentas no grupo jovem ($p = 0,073$ e $0,574$ respectivamente); no grupo adulto ($p = 0,632$ e $= 0,116$ respectivamente) e no grupo Idoso ($p = 0,023^*$), com maior quantidade no músculo Masseter; e lentas ($p = 0,229$).

Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Comparação dos músculos Masseter e Temporal.

Músculos		Músculo		Diferença Temporal - Masseter	<i>P</i>	
		Masseter	Temporal			
Rápida	Amostra Total (n =37)	média ± dp	72,9 (19,6)	68,5 (17,0)	-4,4 (18,8)	0,158
	Jovem (n=8)	média ± dp	85,3 (12,7)	77,3 (11,9)	-8,0 (10,7)	0,073
	Adulto (n=16)	média ± dp	67,8 (22,9)	70,5 (14,1)	2,7 (22,4)	0,632
	Idoso (n=13)	média ± dp	71,6 (16,3)	60,5 (20,3)	-11,1 (15,5)	*0,023
Lenta	Amostra Total (n =37)	média ± dp	70,2 (19,5)	64,8 (17,3)	-5,4 (15,4)	0,063
	Jovem (n=8)	média ± dp	71,0 (18,4)	67,3 (24,2)	-3,7 (17,8)	0,574
	Adulto (n = 16)	média ± dp	72,1 (21,1)	64,7 (17,8)	-7,3 (17,6)	0,116
	Idoso (n = 13)	média ± dp	67,5 (19,4)	63,5 (12,6)	-4,0 (11,5)	0,229

Nas comparações entre os sexos foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de fibras rápidas e lentas no músculo Masseter ($p = 0,984$, $0,604$ respectivamente);
- diferença não significativa na % de fibras rápidas e lentas no músculo Temporal ($p = 0,870$ e $0,534$ respectivamente).

Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Comparação entre os sexos dos músculos Masseter e Temporal

Músculos			Sexo		<i>P</i>
			Masculino	Feminino	
Masseter	Rápida (%)	média $\pm$ dp	72,9 (17,1)	73,0 (22,8)	0,984
	Lenta (%)	média $\pm$ dp	71,8 (19,8)	68,4 (19,6)	0,604
Temporal	Rápida (%)	média $\pm$ dp	68,9 (15,2)	67,9 (19,4)	0,870
	Lenta (%)	média $\pm$ dp	66,5 (16,6)	62,9 (18,5)	0,534

Os resultados da contagem da porcentagem de fibras que apresentaram dupla marcação estão discriminados na tabela 12 e a representação gráfica nos gráficos 9 e 10.

Tabela 12: % de fibras com dupla marcação

		% de fibras com dupla marcação								
	Décadas	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
Temporal (n=9)	Masculino	86	25	45	43	39	23	19	24	28
	Feminino	80	52	30	10	20	24	25	30	49
Masseter (n=9)	Masculino	68	54	58	39	31	28	33	23	22
	Feminino	60	60	49	31,5	27	24	16	19	10

% de fibras híbridas nos músculos Masseter e Temporal

Gráfico 9

Gráfico 10

Masseter

Temporal

Décadas

■ Masculino

■ Feminino

Nas comparações entre os grupos etários e relação a percentagem de dupla marcação foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença estatisticamente significativa na % de dupla marcação no músculo Masseter ($p < 0,001^*$), onde o grupo Jovem apresentou média significativamente maior do que a dos demais grupos e o grupo adulto apresentou média significativamente maior do que a do grupo idoso (jovem > adulto > idoso);
- diferença estatisticamente significativa na % de dupla marcação no músculo Temporal ($p = 0,011^*$), onde o grupo jovem apresentou média significativamente maior do que a dos demais grupos, que não se diferenciaram de forma significativa (jovem > (adulto = idoso)).

Os resultados estão apresentados na tabela 13 e a representação gráfica nos gráficos 11 e 12.

Tabela 13 – Comparação segundo o grupo etário

Músculos		Grupo Etário			P
		Jovem (n = 5)	Adulto (n = 7)	Idoso (n = 6)	
Masseter	Dupla marcação (%)				
	média $\pm$ dp	60,0 $\pm$ 5,1	32,8 $\pm$ 8,6	20,5 $\pm$ 7,1	
	mediana	60,0	31,0	20,5	$p < 0,001^*$
	mínimo – máximo	54,0 – 68,0	24,0 – 49,0	10,0 – 33,0	
Temporal	Dupla marcação (%)				
	média $\pm$ dp	57,6 $\pm$ 25,3	27,0 $\pm$ 11,3	29,2 $\pm$ 10,0	
	mediana	52,0	24,0	26,5	$p = 0,011^*$
	mínimo – máximo	25,0 – 86,0	10,0 – 43,0	19,0 – 49,0	

Variáveis segundo o grupo etário

Gráfico 11

Masseter

Gráfico 12

Temporal

Grupo etário

Dupla Marcação

Nas comparações entre os sexos nos músculos Masseter e Temporal foram encontrados os seguintes resultados:

- diferença não significativa na % de dupla marcação no músculo Masseter e Temporal ($p = 0,354$ e $0,965$ respectivamente).

Os resultados são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Comparação entre os sexos dos músculos Masseter e Temporal

Músculos		Sexo		<i>P</i>
		Masculino (n=9)	Feminino (n=9)	
Dupla Marcação (%)	Masseter	média ± dp	39,5 (16,5)	0,354
			32,9 (18,9)	
	Temporal	média ± dp	36,9 (20,7)	0,965
			35,5 (21,3)	

A figura 3 apresenta fibras com dupla marcação em secção transversal no músculo Masseter de um cadáver de 41 anos do gênero masculino.

Figura 3: 41 anos - ♂: Músculo Masseter

A- miosina rápida

B- miosina lenta

A figura 4 apresenta fibra com dupla marcação em corte longitudinal no músculo Temporal de um cadáver de 24 anos do gênero masculino.

Figura 4: 24 anos-♂: Músculo Temporal

miosina rápida

A figura 5 apresenta fibra única no músculo Masseter em um cadáver de 42 anos do gênero masculino.

Figura 5: 42 anos-♂: Músculo Masseter

miosina lenta

↑ Miosina lenta
↑ Fibra não corada

5 Discussão

Disfunção temporomandibular (DTM) é um conjunto de distúrbios articulares e musculares na região orofacial, caracterizada principalmente por dor, ruídos nas articulações e função mandibular irregular ou com desvio. Portanto, a DTM inclui distúrbios relacionados à articulação e ao complexo muscular mastigatório cervical. A DTM é considerada um subgrupo de disfunções músculo-esqueléticas e reumatológicas gerais (Zarb *et al*, 2000). A DTM mais comum é a de causa muscular.

Portanto, o conhecimento detalhado da composição estrutural e funcional dos músculos da mastigação é fundamental para a compreensão dos mecanismos da DTM muscular. Na escassez de estudos sistematizados sobre a composição dos tipos de fibras musculares esqueléticas nos músculos da mastigação ao longo dos anos, o presente estudo, utilizando imunoistoquímica, analisou em 37 amostras distribuídas da 1^a a 9^a décadas a distribuição da expressão das isoformas de miosina (rápida e lenta) e a quantidade de fibras híbridas nos músculos Temporal e Masseter.

5.1 Distribuição dos tipos de fibras rápidas e lentas nos músculos Masseter e Temporal segundo as nove décadas

A percentagem de fibras lentas foi similar a percentagem de fibras rápidas (diferença estatisticamente significativa) entre os músculos Masseter e Temporal.

Existem divergências nas publicações com relação a composição das fibras nos músculos da mastigação (Tabela 15).

Embora possam haver outros fatores determinantes influenciando a distribuição das fibras musculares como as diferentes formas que as pessoas ativam seus músculos durante o ato de mastigar ou o tipo de alimentação, (Kemsley *et al* 2003; Koolstra, 2002), o presente resultado demonstra que os músculos Temporal e Masseter apresentaram distribuições similares de fibras de contração rápida e lenta, e estas não variaram de modo significativo ao longo dos anos de vida.

De fato, os relatos na literatura de Maxwell *et al* 1980, Saito *et al*, 2002 e Langenbach *et al*, 2003, nos alertam para o fato da necessidade de comparação dos achados morfológicos em relação ao estado funcional do comportamento mastigatório. Esta sugestão, no entanto, foi de difícil execução tratando-se de uma amostragem de autópsia onde as informações do estado funcional eram escassos ou inexistentes. Esta tarefa foi cumprida parcialmente com o acréscimo do exame bucal quanto a presença ou ausência de dentes (Anexo I). Adicionalmente, um questionário para obtenção dos dados pertinentes poderia ser aplicado aos familiares mais próximos. Esta estratégia poderá ser incorporada em estudos futuros.

A variação do formato facial em humanos pode também estar associado com diferenças na performance mastigatória, o que poderia refletir em diferenças na composição das fibras. Adicionalmente, Boyd *et al* 1984 (Tabela 15) decreveram que há distribuição igual na porcentagem de fibras

do tipo I e do tipo II no músculo Masseter. Entretanto esta afirmação não foi demonstrada em trabalhos subseqüentes.

Quanto ao fator idade influenciando a composição das fibras musculares, Larsson, *et al*, 1979 descreveram que o avançar na idade leva a mudanças sistêmicas e alterações no uso muscular. Em músculos apendiculares e tronculares ocorre redução da área da fibra muscular no corte transversal com o envelhecimento. Estima-se que o músculo perca cerca de 10% de sua força por ano a partir dos 50 anos.

A fatigabilidade aumenta e a proporção de fibras muda. No Masseter de idosos a proporção de fibras I diminui enquanto a proporção de fibras II aumenta (Monemi, 1998) Tabela 15.

5.2- Comparações entre os músculos Masseter e Temporal

No presente estudo, não encontramos diferença estatística significativa na porcentagem de fibras rápidas e lentas na amostra total e nos grupos de jovens, adultos e idosos. Foi encontrado diferença estatisticamente significativa apenas na porcentagem de fibras rápidas do grupo de idosos, onde o Masseter apresentou mais fibras rápidas.

Geralmente os músculos de fechamento não diferem muito entre si em relação a composição das fibras (Korfage *et al* 2000).

Korfage 2001 estudando os músculos de fechamento da mandíbula (Temporal, Masseter, pterigóideo medial e pterigóideo lateral), supra-hioideos (estilohioideo, milohioideo, geniohioideo, digástrico) e infra-hioideos

(esternohioideo, esternotiroideo, tireóideo) concluiu que a porcentagem não diferiu entre os grupos de músculos. Os três grupos de músculos apresentavam na média iguais porcentagens de fibras do tipo I e IIX. Entretanto, as porcentagens de fibras IIA e híbridas diferiam significativamente entre os músculos de fechamento e de abertura.

Os resultados do presente estudo corroboram os dados apresentados na literatura reforçando a idéia de que músculos com funções similares não devam diferir na porcentagem da composição de fibras.

5.3-Comparações entre os sexos

Em nosso estudo não encontramos diferença estatística significativa na porcentagem de fibras rápidas, lentas e híbridas no músculo Masseter e Temporal quanto ao gênero.

Tuxen *et al* 1999 observaram diferenças na proporção de fibras rápidas e lentas no músculo Masseter em 13 adultos jovens de 20 a 26 anos. Eles encontraram uma grande quantidade de fibras do tipo II no Masseter dos homens e grande quantidade de fibras tipo I em IM em mulheres, no entanto os autores não mostraram se houve algum tratamento estatístico para os dados específico de tipo de fibra. Reader *et al* 2001 observaram que a castração de ratos adultos não alterou a proporção de fibras do músculo Masseter.

O fato de não termos encontrado diferença estatística significativa na porcentagem de fibras rápidas, lentas e híbridas no músculo Masseter e Temporal entre homens e mulheres pode ser em parte explicada pelo fato

destes músculos desempenharem funções muito semelhantes (carga, força, distensão) em ambos os sexos. Ao contrário do que ocorre, por exemplo, com os músculos apendiculares.

5.4 Comparações entre os grupos etários em relação a porcentagem de dupla marcação

Embora a presença de fibras híbridas nos músculos da mastigação tenha sido relatado por diversos autores desde 1994 (Tabela 15), a sistematização da presença deste tipo de fibra ao longo dos anos não foi realizado ainda na literatura.

O presente estudo demonstrou a presença das fibras híbridas desde a primeira década (1 mês de vida) persistindo até a nona década, diferentemente do que se encontra nos músculos apendiculares (Klitgard *et al* 1990).

Isso pode ocorrer porque os músculos da mastigação podem executar funções específicas que requerem fibras com características intermediárias.

Uma provável explicação para este achado é o fato dos músculos da mastigação requererem fibras com características intermediárias para a execução da função específica.

Adicionalmente pode-se levantar a hipótese de que os músculos da mastigação estão em processo constante de lesão e regeneração estimulando as células satélites a reparar o dano. Durante o processo de regeneração as fibras expressariam miosinas de diferentes isoformas.

Foi demonstrado em dissecação de fibra única (Figura 5) que a expressão protéica ao longo da fibra não é homogênea. Isto pode ocorrer devido ao fato das fibras musculares conterem muitos núcleos expressando diferentes isoformas de miosina levando a presença de fibras híbridas.

Em nosso estudo encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados na porcentagem de fibras híbridas no músculo Masseter ($p < 0,001^*$), onde o grupo jovem apresentou mais fibras híbridas do que o adulto e este grupo mais que o grupo idoso (Gráfico 11).

Também houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados na porcentagem de fibras híbridas no músculo Temporal ($p = 0,011^*$), onde o grupo jovem apresentou mais fibras do que o grupo adulto e idoso.

Em resumo, observou-se uma distribuição similar de fibras musculares de contração rápida e lenta nos músculos Masseter e Temporal ao longo das nove décadas analisadas.

O resultado mais interessante foi a manutenção da presença de fibras híbridas nestes músculos da mastigação ao longo de todas as décadas estudadas, contrariamente ao observado nos músculos apendiculares.

Estes achados, embora observacionais, nos permitem especular que o mecanismo de manutenção/renovação e/ou adaptação à função ocorre de modo distinto nestes músculos.

A associação dos presentes achados ao comportamento funcional poderá ser abordada futuramente para melhor compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos.

Tabela 15: Resumo dos artigos: **Músculo Masseter**

Autor /ano	Metodologia	n	Faixa etária (anos)	Fibras (%)		
				Tipo I	Tipo II	Híbridas
Ringqvist, 1973	Cirurgia: biópsia muscular. Método: histoquímico de NADH, fosforilase, ATPase	10 (2 ♂ e 8 ♀)	18-33	9-55	28-89	1-35
Ringqvist, 1974	Cirurgia biópsia muscular. Método: histoquímico de NADH, fosforilase, ATPase	21 (9 ♂ e 12 ♀)	20 -50 18 - 33	29	57	14
Eriksson, 1983	Cadáveres de 1 a 3 dias <i>post mortem</i> . Método: histoquímico de NADH, fosforilase, ATPase	6 ♂	15-25	62	29	7
Boyd, 1984	Cirurgia: biópsia Método: histoquímico de NADH e ATPase .	9 (4 ♂ e 5 ♀)	14-31	51	49	
Shaughnessy, 1989	Cirurgia: biópsia Método: histoquímico de NADH e ATPase .	11 ♀	16-31	57	43	
Stal, 1994	Cadáveres de 1 a 3 dias <i>post mortem</i> . Método: histoquímico de ATPase e imunoistoquímico	5 indivíduos	15-41	62	29	9
Monemi, 1998	Cadáveres de 1 a 3 dias <i>post mortem</i> Método: histoquímico de ATPase e imunoistoquímico.	6 idosos 5 adultos	19 - 25	67	23	10
			58-83	47	34	19
Korfage, 2001	Cadáveres de 12 a 36 horas <i>post mortem</i> . Método: imunoistoquímico	8 (5 ♂ e 3 ♀)	72	37	21	42
Guimarães e Ferreira 2009 *	Cadáveres até 18 horas <i>post mortem</i> . Método: imunoistoquímico	37 (20 ♂ e 17 ♀)	1 mês-87	65	72	36

Continuação da tabela **Músculo Temporal**

Autor /ano	Metodologia	n	Faixa etária (anos)	Fibras (%)		
				Tipo I	Tipo II	Híbridas
Ringqvist, 1974	Cirurgia biópsia muscular. Método: histoquímico de NADH, fosforilase, ATPase	21 (9 ♂e 12 ♀)	20 -50 18 - 33	31	64	5
Eriksson, 1983	Cadáveres de 1 a 3 dias <i>post mortem</i> . Método:histoquímico de NADH, fosforilase e	6 ♂	15-25	53	39	8
Korfage, 2003	Cadáveres de 12 a 36 horas <i>post mortem</i> . Método: imunoistoquímico e eletroforese.	8 (5 ♂e 3 ♀)	71,6 ± 15	26	15	59
Guimarães e Ferreira 2009 *	Cadáveres até 18 horas post mortem. Método: imunoistoquímico	37 (20 ♂e 17 ♀)	1 mês-87	62	66	36

* A distribuição diferencial por década está apresentada nas Tabelas 7 e 12

6 Conclusões

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- 1- Ao longo das nove décadas a percentagem de fibras lentas foi similar a percentagem de fibras rápidas nos músculos Masseter e Temporal. Quando a análise foi realizada separadamente comparando-se os músculos Masseter e Temporal houve diferença estatística ($p=0,023^*$) no grupo idoso com predomínio de fibras rápidas no músculo Masseter.
- 2- Observou-se fibras híbridas presentes desde a primeira década (1 mês de vida) persistindo até a nona década com predomínio no grupo jovem, presença decrescente ao longo das décadas no músculo Masseter ($p < 0,001^*$). No músculo Temporal observou-se predomínio de fibras híbridas no grupo jovem em relação aos grupos adulto e idoso ($p = 0,011^*$).

7 Anexos

Anexo I: Identificação dos pacientes quanto a idade, nome, gênero, registro, condição dentária, critérios de inclusão e exclusão (doenças infecto-contagiosas ou infiltrado inflamatório).

Idade (anos)	Nome	Gênero	Registro	Condição dentária	Inclusão	Exclusão
1 mês	J R P S	M	HC-2006/382	Desdentado total	X	
2 meses	R A B	M	VO 2006/7010	Desdentado total		X
1	C S S	M	VO-2006/6048	Desdentado total	X	
9	V D A S	M	HC-2006/332	Dentado		X
20	J M F N	M	HC-2007/255	Dentado	X	
24	N R	M	HC-2005/790	Dentado	X	
28	S R	M	HC-2007/210	Dentado	X	
30	A V B	M	VO-2007/8845	Dentado		X
34	J A S	M	VO- 2006/4847	Desdentado total		X
34	G V F	M	HC-2006/0037	Dentado	X	
35	J V S	M	VO-2006/4280	Dentado	X	
38	A B L	M	HC-2005/661			X
38	E G	M	HC- 2006/456	Dentado		X
39	C P	M	VO 2006/4630	Dentado	X	
41	J C A S	M	HC-2005/657	Dentado	X	
42	O A P S	M	HC-2006/562	Dentado	X	
42	G M	M	VO 2007/672	Dentado		X
42	R A A	M	VO-2006/9488	Dentado	X	
49	A M	M	HC-2005/662			X
55	O A B	M	VO- 2006/4967	Desdentado total		X
57	V N S	M	HC- 2006/395	Desdentado total		X
58	E P C	M	HC-2005/638		X	
58	V i B C	M	HC- 2005/701			X
59	S M B	M	HC-2005/692		X	
60	L J S	M	HC2006/523	Desdentado total		X
63	C M L	M	HC-2005/0788		X	
63	A C S	M	VO- 2006/6314	Desdentado total		X
63	J B A S	M	VO-2006/783	Dentado		X
67	F S	M	HC-2005/806		X	
67	S Z	M	HC- 2006/0035	Desdentado total		X
71	P O	M	Vo 2006/4554	Desdentado parcial	X	
72	H L S	M	HC:2005/659	Desdentado total	X	
76	A S	M	HC: 2005/0624			X
80	J P S	M	HC- 2005/830	Desdentado total	X	
83	J V J	M	HC: 2005/663			X
87	D M L	M	HC- 2005/713		X	

Idade (anos)	Nome	Gênero	Registro	Condição dentaria	Inclusão	Exclusão
1 mês	S B L	F	HC-2006/651	Desdentada total	x	
1	B R A	F	VO-2006/8312	Desdentada total	x	
19	M A S A	F	HC- 2005/068		x	
20	G S	F	VO- 2006/7560	Dentada	x	
27	F P F	F	HC-2006/484	Dentada	x	
40	T R F C	F	HC-2006/640	Dentada	x	
44	R S C	F	VO-2006/6768	Desdentada total	x	
45	A M B	F	HC-2006/667	Dentada	x	
	M A A C					
45	C	F	HC- 2005/753		x	
47	R R O	F	HC-2005/0754		x	
51	V N W	F	HC- 2005/772			x
54	M A C	F	HC-2005/784		x	
58	A R S	F	HC-2005/791		x	
60	V G	F	VO-2006/6544	Desdentada total		
61	M H	F	VO- 2006/5453	Desdentada total	x	
61	J A N	F	VO-2006/6850	Dentada		
63	N A E	F	HC- 2005/693			x
66	E F S	F	VO-2006/8495	Desdentada total		x
71	F L C. R	F	HC-2006/586	Dentada		x
78	G S O	F	VO-2006/10462	Dentada		x
79	M N M	F	VO- 2006/4691	Desdentada total	x	
80	A A C	F	HC-2006/9160	Dentada		x
85	R S P	F	VO- 2006/5142	Desdentada total	x	
87	M R O	F	VO-2006/8038	Dentada	x	

Anexo II: Técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (HE): Avalia a organização básica do tecido e das estruturas celulares Núcleo em azul, fibras musculares em rosa e o tecido conjuntivo em rosa claro.

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.

Anexo III: Autorizações

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

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

APROVAÇÃO

O Presidente da 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 17.10.06, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **925/06**, intitulado "Caracterização da distribuição da miosina rápida e lenta e expressão da miostatina 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**

Pesquisador(a) Executante: **SRA. THATIANA BASTOS GUIMARÃES**

CAPPesq, 17 de outubro de 2006

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

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

116/2006

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

Antevidado,

28/4/2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

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

Título da Pesquisa: Caracterização fenotípica 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

8 Referências

Billeter R, Weber H, Lutz H, Howald H, Eppenberger HM, Jenny E. Myosin types in human skeletal muscle fibers. *Histochemistry*. 1980;65:249-59.

Boyd SB, Gonyea WJ, Finn RA, Woodard CE, Bell WH. Histochemical study of the Masseter muscle in patients with vertical maxillary excess. *J Oral Maxillofac Surg*. 1984;42:75-83.

Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fibre types: how many and what kind? *Arch Neurol*. 1970;23:369-79.

Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C (1996). Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J Physiol* 495:573-586.

Bredman JJ, Wessels A, Weijs WA, Korfage JAM, Soffers CAS, Moorman AFM. Demonstration of cardiac-specific myosin heavy chain in masticatory muscles of human and rabbit. *Histochem J*. 1991;23:160-70.

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*. 1996 Summer;10 (3):254-62.

Colling-Saltin AS. Enzyme histochemistry on skeletal muscle of the human fetus. *J Neurol Sci*. 1978;39:169-85.

Dworkin SF, LeResche L.; Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. Review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandibular Disorder*. 1992; 6: 302-55.

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

Dubowitz V, Pearse AGE. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature*. 1960;185:701.

Engel WK. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*. 1962;12:778.

Eriksson P-O, Thornell L-E. Histochemical and morphological muscle-fibre characteristics of human Masseter, the medial pterigoid and Temporal muscles. *Archs Oral Biol*. 1983;28:781-95.

Fidzianska A. Human ontogenesis. I. Ultrastructural characteristics of developing human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1980;39:476-86.

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.

Gambke B, Rubinstein NA. A monoclonal antibody to the embryonic myosin heavy chain of rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1984;259:12092-100.

Gauthier GF, Lowey S. Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J Cell Biol* 1979;81:10-25.

Ghosh S, Dhoot GK. Evidence for distinct fast and slow myogenic cell lineages in human fetal muscle. *J Muscle Res Cell Motility.* 1998;19:431-41.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 29-31.

Kelly AM, Rubinstein NA. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel GA, Franzini-Armstrong C Eds. *Myology* 2. New York: McGraw-Hill; 1994. p. 119-33.

Kemsley EK, Defernez M, Sprunt JC, Smith AC . Eletromyographic responses to prescribe mastigation. *J Eletromyogr Kinesiol.* 2003;13:197-207.

Klitgaard H, Zhou M, Schiaffino S, Betto R, Salviati G, Saltin B. Ageing alters the myosin heavy chain composition of single fibres from human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1990;140:55-62.

Koolstra JH. Dynamics of the human masticatory system. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13:366-376.

Korfage JA, Van Eijden TM. Regional differences in fibre type composition in the human Temporalis muscle. *J Anat*. 1999;194:355-362.

Korfage JA, Brugman P, Van Eijden TM. Intermuscular and intramuscular differences in myosin heavy chain composition of the human masticatory muscles. *J Neurol Sci*. 2000;178:95-106.

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;46:821-27.

Korfage JA, Van Eijden TM. Myosin heavy-chain isoform composition of human single jaw-muscle fibers. *J Dent Res*. 2003;82:481-485.

Kwa SH, Weijs WA, Jüch PJ. Contraction characteristics and myosin heavy chain composition of rabbit Masseter motor units. *J Neurophysiol*. 1995;73:538-49.

Langenbach GE, van de Pavert S, Savalle W, Korfage J, Van Eijden T. Influence of food consistency on the rabbit Masseter muscle fibres. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:81-84.

Langenbach G.E.J., Wessel T.V., Brugman P, Korfage J.A.M. Is fiber type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development? *Cells Tissues Organs.* 2008; 87:307-315.

Larsson L, Grimby G, Karlsson J (1979). Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol* 46:451-456.

Lee L.T.K, Yeung K.W.K, Wong M.C.M, Mc Millan A. S. Diagnostic sub-types, psychological distress and psychosocial dysfunction in southern Chinese people with temporomandibular disorders *Journal of Oral Rehabilitation.* 2008; 35; 184–190.

LeResche L. Research.; Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. In: Friction JR, Dubner R (eds). Orofacial pain and temporomandibular disorders. *New York: Raven Press.* 1995; 189-203.

Lujan-Climent M, Martinez-Gomis J, Palau S, Ayuso-Montero R, Salsench J, Peraire M. Influence of static and dynamic occlusal characteristics and muscle force on masticatory performance in dentate adults. *Eur J Oral Sci.* 2008;Jun;116(3):229-36.

Lund J.P, Lavigne G.J, Dubner R, Sessle BJ. *Dor orofacial*. 1ª ed. São Paulo: Quintessence, 2002.

Madeira MC. *Anatomia da face*. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2001. cap.4, p78-90.

Maxwell LC, McNamara JA Jr, Carlson DS, Faulkner JA. Histochemistry fibres of Masseter and Temporalis muscles of edentulous monkeys *Macaca mulatta*. *Arch Oral Biol* 1980; 25:87-93.

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.

Monemi M, Eriksson P-O, Dubail I, Butler-Browne GS, Thornell L-E Fetal myosin heavy chain increases in the human Masseter muscle during aging. *FEBS Lett* 1996;386:87-90.

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

Monemi M, Eriksson P-O, Kadi F, Butler-Browne GS, Thornell L-E. Opposite changes in myosin composition of human Masseter and biceps braquial muscles during aging. *J Muscle Res Cell Motil*. 1999;20:351-61.

Murray H, Locker D, Mock D, Tenenbaum HC. Pain and the quality of life in patients referred to a craniofacial pain unit. *J Orofac Pain*. 1996; 4:316-22.

Okeson JP. *Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão*. 4ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. cap.9, p181-240.

Paiva JP, Cavalcante HCC. Oclusão natural. *Oclusão-noções e conceitos básicos*. Natal: Ed. Universitária UFRN; 1997. p 67-76.

Paul MH, Sperling E. The cyclophorase system: correlation of cyclophorase activity and mitochondrial density in striated muscle. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1952;79:352.

Pette D, Sketelj J, Skorjanc D, Leisner E, Traub I, Bajrovic F. Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23:215-21.

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.

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.

Polgar J, Johnson MA, Weightman D, Appleton D. Data on fibre size in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci.* 1973;19:307- 18.

Reader M, Schwartz G, English AW. Brief exposure to testosterone is sufficient to induce sex differences in the rabbit Masseter muscle.
Cells Tissues Organs. 2001;169:210-217.

Ringqvist M. Fibre sizes of human Masseter muscle in relation to bite force. *J Neurol Sci* 1973b;19:297-305.

Ringqvist M. Size and distribution of histochemical fibre types in Masseter muscle of adults with different states of occlusion. *J Neurol Sci* 1974a;22:429-38.

Ringqvist M. A histochemical study of Temporal muscle fibers in denture wearers and subjects with natural dentition. *Scand J Dent Res* 1974b;82:28-39.

Saito T, Ohnuki Y, Yamane A, Saeki Y. Effects of diet consistency on the myosin heavy chain mRNAs of rat Masseter muscle during postnatal development. *Arch Oral Biol* 2002;47:109-115.

Santana Pereira JA, de Haan A, Wessels A, Moorman AF, Sargeant AJ. The ATPase histochemical profile of rat type IIX fibres: correlation with myosin heavy chain immunolabelling. *Histochem J.* 1995; 27:715-22.

Sciote JJ, Kentish JC. Unloading shortening velocities of rabbit Masseter muscle fibres expressing skeletal or α -cardiac myosin heavy chains. *J Physiol.* 1996; 492:659-67.

Sciote JJ, Rowlerson AM, Hopper C, Hunt NP. Fibre type classification and myosin isoforms in the human Masseter muscle. *J Neurol Sci.* 1994;126:15-24.

Stal P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Enzyme-histochemical differences in fibre type between the human major and minor zygomatic and first dorsal interosseus muscle. *Archives of Oral Biology* 1987;32:833-841.

Stal P, Eriksson P-O, Schiaffino S, Butler-Browne GS, Thornell L-E. Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory. *J Muscle Res Cell Motil.* 1994;15:517-34.

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

Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, *et al.* Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1989; 10:197-205.

Simons G D; Travell JG; Simons LS. *Dor e Disfunção Miofascial: Manual dos pontos –gatilho* -2ed. Artmed, 2005.

Shaughnessy T, Fields H, Westbury J. Association between craniofacial morphology and fiber-type distributions in human Masseter and medial pterygoid muscles. *Int J Adult Orthod Orthognath Surg*. 1989; 4:145-155.

Soussi-Yanicostas N, Barbet JP, Lauret-Winter C, Barton P, Brutler-Browne GS. Transition of myosin isozymes during development of human Masseter muscle. *Development*. 1990;108:239-49.

Thornell L-E, Edstron L, Billeter R, Bluther-Browne GS, Kjorell U, Whalen RG. Muscle fibre type composition in distal myopathy (Welander). An analysis with enzyme- and immuno-histochemical, gel-electrophoretic and ultrastructural techniques. *J Neurol Sci*. 1984;65:269-92.

Tuxen A., Bakke M, Pinholt E.M. Comparative data from young men and women on Masseter muscle fibres, function and facial morphology. *Archives of Oral Biology* 44 (1999) 509-18.

Wachstein M, Meisel E. The distribution of demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscle. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955; 483.

Zarb G.A, Carlsson GE Sessle BJ, Mohl ND. *Disfunções da articulação temporomandibular e dos músculos da mastigação*. 1ª ed. Munksgaard, Copenhagen, 2000 cap 7, p.58-65 e p. 171-187.