**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

Daniela Mizusaki Iyomasa

**Avaliação morfofisiológica do músculo pterigóideo lateral e da sensibilidade
nociceptiva orofacial em ratos com hipofunção mastigatória.**

Ribeirão Preto
2014

Daniela Mizusaki Iyomasa

Avaliação morfofisiológica do músculo pterigóideo lateral e da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos com hipofunção mastigatória.

Dissertação apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi.

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Iyomasa, Daniela Mizusaki

Avaliação morfofisiológica do músculo pterigóideo lateral e da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos com hipofunção mastigatória. Ribeirão Preto, 2014.

121 p.: il.; 30 cm

“Versão corrigida da Dissertação de Mestrado. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”; apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade.

1. Estresse. 2. Músculo. 3. Exodontia. 4. Morfofisiologia. 5. Comportamento de dor orofacial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: IYOMASA, Daniela Mizusaki

Título: Avaliação morfofisiológica do músculo pterigóideo lateral e da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos com hipofunção mastigatória.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.
Área de Concentração: Biologia Oral

Aprovado em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e irmãs, pelo amor incondicional, minha eterna
gratidão. Amo vocês.*

*À minha tia Cristina Ioshie Mizusaki (in memoriam) por me inspirar a
seguir a carreira acadêmica, que eu consiga seguir seus passos com
tanta retidão quanto você. Saudades eternas.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, por me mostrar todos os dias que é possível, por olhar tão especialmente por mim.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi**, por ter me acolhido tão abertamente em seu laboratório, me ensinado tantas coisas, por sua dedicação, força, apoio, paciência. Nunca conseguirei expressar toda minha gratidão.

Aos meus pais, **Masayasu e Mamie**, por serem minha fortaleza, minha certeza, por me fazerem lembrar sempre quem eu fui, quem eu sou e quem quero me tornar. Por todo o sacrifício que fizeram por nós. Vocês são o melhor reflexo do que quero me tornar. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor, por serem tão maravilhosos. Nada seria possível sem vocês.

Às minhas irmãs, **Renata e Juliana**, ainda que distantes sempre presentes nos meus dias, nas minhas dificuldades. Por me ouvirem, me aconselharem, por estarem sempre me apoiando e me dando forças para seguir em frente. Porque vocês são a minha outra metade.

Ao meu namorado **Renato**, pela paciência, por entender minhas ausências, por me apoiar incondicionalmente em todas as minhas decisões, por estar sempre ao meu lado me dando forças e me ajudando a extrair o melhor de mim.

Agradeço **a todos os professores que compõem esta banca**, pela sua disponibilidade, meus agradecimentos pelas sugestões e apoio prestados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo fomento durante a execução deste projeto (Processo FAPESP: 2011/16139-2).

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, corpo docente, funcionários e colegas de pós-graduação**, pela receptividade, pela ajuda e por entenderem sempre minhas dificuldades.

À **Yamba Carla Lara Pereira**, por seu carinho, por ter se tornado uma grande amiga, dentro e fora do laboratório, por ter dividido comigo seus ensinamentos, angustias, me ensinado a superar as dificuldades e estar sempre ao meu lado.

Aos “irmãos” **Rodrigo Alberto Restrepo Fernandes e Ricardo Alexandre Junqueira Calzzani**, pela amizade, pelas risadas que me ajudaram a relaxar nos momentos difíceis.

Aos amigos do **Laboratório de Ciências Morfológicas, Nilce, Fernando, Kelly Bruna Kotake, Miliane, Júnia, João Paulo, Eduardo, Felliipe** meus sinceros agradecimentos pela ajuda durante todo o mestrado.

Aos amigos do **Laboratório de Neurofisiologia da Dor e do Comportamento, Patrícia, Ana Paula, Amanda, Bruna, Glauce, Jeanne, Priscila, Richard**, por terem me ajudado tanto durante todo o mestrado, por me receberem tão bem no laboratório e fazerem dele um ambiente de grande alegria e amizade.

À **Carolina, Fabíola, Raphael, Cassio** e **a todos que participaram direta ou indiretamente** desta etapa, obrigada por me ensinarem que nada é possível sozinha.

EPÍGRAFE

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se
aprende é com a vida e com os humildes.”*
Cora Coralina

RESUMO

IYOMASA, D. M. **Avaliação morfofisiológica do músculo pterigóideo lateral e da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos com hipofunção mastigatória.** 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Evidências clínicas sugerem que o estresse emocional pode ser um fator de risco para as distúrbios temporomandibulares (DTM), bem como para outras funções desempenhadas pelo sistema estomatognático. Ainda é controversa a participação da alteração oclusal na etiopatogenia das dores miofasciais. O músculo pterigóideo lateral foi escolhido pela íntima relação com a articulação temporomandibular (ATM). Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar a hipótese de que os diferentes tipos de estresse agudo e crônico (repetido e variado) induzem alterações morfofisiológicas no músculo pterigóideo lateral ipsilateral em animais submetidos ou não à exodontia unilateral. Em uma segunda etapa, foi avaliada se o procedimento de exodontia unilateral promove alteração da sensibilidade nociceptiva orofacial. Foram utilizados 66 ratos machos *Wistar* (250 g), divididos aleatoriamente em 2 grandes protocolos: Exodontia (GE): expostos a exodontia unilateral (n = 33); e Sem Exodontia (GSE): sem exodontia unilateral (n = 33). Cada protocolo foi composto por 6 subgrupos: Ag: Estresse agudo; Rep: Estresse crônico repetido; Var: Estresse crônico variado; Form: Avaliação nociceptiva orofacial; Sal: Avaliação nociceptiva orofacial (controle formalina); e C: sem estresse (Controle estresses). O GE foi submetido à exodontia unilateral dos molares superiores esquerdo, sob anestesia com associação de xilazina 4% (10mg/kg) e cetamina 10% (80mg/kg), i.p. Em ambos os grupos: GE e GSE, os ratos dos subgrupos Rep e Var foram submetidos aos protocolos de estresse (por 10 dias) a partir do 14º dia após a exodontia; e no 23º, os animais do subgrupo Ag, foram submetidos ao estresse agudo, e dos subgrupos Form e Sal foram submetidos ao protocolo de Formalina orofacial. Com o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia para obtenção dos músculos para análise. Os estresses crônicos, isolados ou associados à exodontia, afetaram a morfologia, a capacidade oxidativa, o estresse oxidativo e a densidade capilar do músculo pterigóideo lateral esquerdo. Estes sinais demonstram a adaptação deste músculo, no período estudado, e sugerem que a persistência destes estímulos podem levar à respostas mais severas como, por exemplo, desencadear a dor miofacial ligada à DTM.

Palavras Chave: Estresse, Músculo, Exodontia, Morfofisiologia, Comportamento de dor orofacial.

ABSTRACT

IYOMASA, D. M. **Morphophysiological evaluation of lateral pterygoid muscle and orofacial nociceptive sensibility in rats with masticatory hipofunction.** 2014. 121 p. Dissertation (Master degree) – Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2014.

Clinical evidences have suggested that emotional stress could be a risk factor for temporomandibular joint disorder (TMD), as well as other functions performed by stomatognathic system. Remains controversial the participation of occlusal alteration on the miofascial pain etiopathogenesis. The lateral pterygoid muscle was chosen because of the closely relationship with temporomandibular joint (TMJ). Therefore, the aim of this project was evaluate the hypothesis that different types of acute and chronic (repeted and unpredictable) stress induce morphophysiological alteration on the left lateral pterygoid muscle, ipsilateral to the exodontia in animals submitted or not to unilateral exodontia. In a second phase, it was evaluated whether the unilateral exodontia procedure promotes orofacial nociceptive sensibility alteration. Sixty male *Wistar* rats (250 g) were randomly divided into 2 protocols: Exodontia (GE): exposed to unilateral exodontia (n = 33); and Without Exodontia (GSE): without unilateral exodontia (n = 33). Each protocol was composed by 6 subgroups: Ag: Acute Stress; Rep: Repeted Chronic Stress; Var: Unpredictable Chronic Stress; Form: Orofacial Nociception Evaluation; Sal: Orofacial Nociception Evaluation (Formalin Control); and C: No Stress (Stress Control). The GE was submitted to unilateral exodontia of superior left molar under anesthesia with the association of xylazine 4% (10 mg/kg) and ketamine 10% (80 mg/kg), i.p. In both groups: GE and GSE, the rats in subgroups Rep and Var were submitted to the stress protocols (during 10 days) from the 14th day after exodontia, and on day 23rd, the animals from subgroup Ag, were submitted to acute stress, and the subgroups Form and Sal were submitted to the Orofacial Formalin protocol. With the end of the experiments, the animals were submitted to euthanasia to obtaining muscle for analysis. The chronic stress, isolated or associated to exodontia, affected the morphology, oxidative capacity, oxidative stress and capillary density of left lateral pterygoid muscle. These signs show the adaptation of this muscle, during the studied period, suggesting that the persistence of these stimuli can lead to a more severe response, such as, myofascial pain trigger linked to the DTM.

Key words: Stress, Muscle, Exodontia, Morphophysiology, Orofacial Pain Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tempo experimental em dias e intervenções realizadas	42
Figura 2	Indução da alteração oclusal	43
Figura 3	Aparato utilizado em laboratório para realização de restrição física	43
Figura 4	Indução do estresse variado	45
Figura 5	Obtenção das amostras para corte congelado	46
Figura 6	Contagem das fibras por meio do sistema teste de 108 pontos utilizando programa ImageJ	48
Figura 7	Caixa para avaliação comportamental	51
Figura 8	Avaliação do peso corporal dos ratos submetidos aos diferentes tipos de estresses	56
Figura 9	Fotomicrografia dos cortes corados com HE no aumento de 40x	59
Figura 10	Fotomicrografia dos cortes para reação histoquímica para SDH no aumento de 20x	63
Figura 11	Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse agudo	65
Figura 12	Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico repetido ...	66
Figura 13	Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico variado	67
Figura 14	Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	68
Figura 15	Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	69
Figura 16	Fotomicrografia dos cortes para reação histoquímica para NADH no aumento de 20x	73
Figura 17	Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse agudo	75
Figura 18	Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico repetido ...	76

Figura 19	Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico variado	77
Figura 20	Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	78
Figura 21	Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	79
Figura 22	Fotomicrografia dos cortes para histoquímica das ROS no aumento de 40x	83
Figura 23	Avaliação do estresse oxidativo no músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência da exodontia em diferentes tipos de estresse	85
Figura 24	Avaliação do estresse oxidativo no músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência (A) ou presença (B) da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	86
Figura 25	Fotomicrografia dos cortes para imunoistoquímica para α CD-31 no aumento de 40x.....	87
Figura 26	Densidade capilar do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência da exodontia quando submetidos aos diferentes tipos de estresses	89
Figura 27	Densidade capilar do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência (A) ou presença (B) da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse	90
Figura 28	Fotomicrografia dos cortes para imunoistoquímica para laminina no aumento de 40x.....	91
Figura 29	Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial pelo teste da formalina 2% nos grupos Sal GSE, Sal GE, Form GSE e Form GE	94

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Estresse Agudo
ANOVA	Análise de Variância
ATM	Articulação Temporomandibular
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Fetal Bovino
C	Controle
CT	Tomografia Computadorizada
D	Dia
DHE	Dihidroetídio
DTM	Desordem Temporomandibular
EPM	Erro Padrão da Média
Form	Formalina
GE	Grupo Exodontia
GSE	Grupo Sem Exodontia
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
MRI	Ressonância Magnética
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio Molecular
•O ²⁻	Radical Ânion Superóxido
PBS	Tampão Salina Fosfato
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PVPI	Iodo Polvidini
Rep	Estresse Repetido
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
Sal	Salina

SDH	Succinato Desidrogenase
SN	Sistema Nervoso
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
USP	Universidade de São Paulo
Var	Estresse Variado

SUMÁRIO

1	Introdução.....	23
2	Revisão de Literatura.....	27
2.1	Músculo Pterigóideo Lateral	27
2.2	Exodontia.....	28
2.3	Sensibilidade Nociceptiva	29
2.4	Estresse e Dor Miofascial	31
3	Objetivos.....	37
4	Material e Método	41
4.1	Amostra	41
4.2	Indução da alteração oclusal.....	42
4.3	Protocolo de estresse agudo.....	43
4.4	Protocolo estresse crônico repetido e variado	44
4.5	Avaliação do peso corporal dos ratos	45
4.6	Obtenção das amostras para corte congelado	45
4.7	Técnicas utilizadas.....	46
4.7.1	<i>Técnica para dosagem de corticosterona.....</i>	46
4.7.2	<i>Técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE)</i>	47
4.7.3	<i>Histoquímica para demonstração de succinato desidrogenase (SDH).....</i>	47
4.7.4	<i>Histoquímica para demonstração da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH).....</i>	49
4.7.5	<i>Histoquímica para demonstração das espécies reativas de oxigênio (ROS)</i>	49
4.7.6	<i>Técnica de imunoistoquímica anticorpo anti CD-31 e Laminina</i>	50
4.8	Procedimento para avaliação da sensibilidade nociceptiva.....	51
4.9	Análise Estatística	52
5	Resultados.....	55
5.1	Avaliação do peso corporal de ratos.....	55
5.2	Dosagem da corticosterona plasmática.....	56
5.3	Coloração em Hematoxilina-Eosina (HE).....	57
5.3.1	<i>Grupo controle sem exodontia C (Figura 9A).....</i>	57
5.3.2	<i>Grupo controle com exodontia (Figura 9B).....</i>	57
5.3.3	<i>Grupo estresse associado a exodontia (Ag GE, Rep GE, Var GE) (Figuras 9D, F, H).....</i>	58
5.3.4	<i>Grupo estresse sem exodontia (Ag GSE, Rep GSE, Var GSE) (Figuras 9C, E, G).....</i>	58
5.4.1	<i>Atividade da SDH nos grupos submetidos à exodontia ou aos estresses, de maneira isolada ou associada</i>	61
5.5	Histoquímica para demonstração de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)	70
5.5.1	<i>Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse agudo.....</i>	70
5.5.2	<i>Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse crônico repetido</i>	70
5.5.3	<i>Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse crônico variado</i>	70
5.5.4	<i>Atividade da NADH entre os grupos submetidos aos estresses na ausência da exodontia</i>	71
5.5.5	<i>Atividade da NADH entre os grupos submetidos aos estresses associados à exodontia</i>	71
5.6	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) - Estresse Oxidativo	80
5.7	Imunoistoquímica para detecção de capilares	80
5.7.1	<i>Alfa CD-31</i>	80
5.7.2	<i>Laminina</i>	81
6	Discussão	97
6.1	Variação do peso corporal no período experimental	97

6.2 Níveis de corticosterona plasmática.....	98
6.3 Alteração da morfologia celular (HE).....	99
6.4 Alteração no metabolismo celular e na capacidade oxidativa (SDH e NADH)	99
6.5 Estresse oxidativo (Produção de espécies reativas de oxigênio – ROS).....	101
6.6 Densidade capilar (α CD-31 e Laminina)	102
6.7 Avaliação da sensibilidade nociceptiva ao teste de formalina orofacial.....	104
7 Conclusões	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

Introdução

1 Introdução

Apesar do estresse não ser considerado propriamente uma doença, a exposição contínua ao estímulo estressor tem sido relacionado diretamente ao início, progressão ou consequência de muitos processos patológicos. Atualmente a população mundial está exposta a diversos estímulos estressores contínuos que levam a desordens neuropsiquiátricas como a ansiedade e depressão (Rivat *et al.*, 2010). Em adição, pacientes portadores de disfunção temporomandibular (DTM) são diagnosticados com maior susceptibilidade ao estresse, depressão, ansiedade e somatização aumentados em comparação com indivíduos não portadores de DTM (Gatchel *et al.*, 1996; Jones, Rollman e Brooke, 1997).

Considerando ainda o estresse emocional e sua correlação com o sistema estomatognático, recente revisão de literatura (Ayub *et al.*, 2010), sugere que o estresse emocional é um possível fator de risco para doença periodontal, em particular quando o início e progressão da doença não podem ser explicados pelos fatores clínicos pré-determinantes. Além disso, várias evidências demonstram claramente o envolvimento do estresse no desencadeamento de patologias sistêmicas como, por exemplo, a fibromialgia. É importante ressaltar que a fibromialgia é caracterizada por pontos de sensibilidade alterada, nociceptiva ou não, e dor muscular generalizada (Van Houdenhove e Luyten, 2006).

Em adição, estressores relacionados às guerras e conflitos armados (Uhac *et al.*, 2003), e outros suaves como a realização de exercícios de aritmética mental e soluções de anagramas simples (Rao e Glaros, 1979; Tsai *et al.*, 2002), podem aumentar a atividade da musculatura mastigatória e estar associados às disfunções temporomandibulares (Glaros, Williams e Lausten, 2005). Apesar do estresse emocional induzir alterações fisiológicas e hemodinâmicas dos músculos da mastigação (Hidaka, Yanagi e Takada, 2004a; b), e em particular, do estresse psicológico e o ambiente social promovem ativação desta musculatura em pacientes com sintomatologia dolorosa (Schmidt e Carlson, 2009), as alterações morfológicas em músculos expostos à alteração oclusal associadas ao estresse emocional ainda são pouco estudado (Carvalho, Cury e Garcia, 2008).

A adaptação dos músculos da mastigação é descrita na literatura em diferentes situações de alteração oclusal induzida em modelo experimental animal, tais como: protrusão mandibular (Easton e Carlson, 1990); exodontia unilateral (Miehe *et al.*, 1999; Iyomasa *et al.*, 2009); desgaste oclusal (Bani, Bani e Bergamini, 1999; Bani e Bergamini, 2002) e aumento da mordida unilateral (Nishide *et al.*, 2001). Numerosos modelos pré-clínicos têm sido

desenvolvidos para reproduzir as várias modalidades de estresse agudo e crônico repetido ou variado por: exposição ao frio, nado forçado, restrição forçada, privação de sono, etc (Imbe, Iwai-Liao e Senba, 2006). Entretanto, ainda são escassos os modelos animais onde se avalia as alterações morfofisiológicas dos músculos da mastigação e como esta musculatura estomatognática responde aos diversos tipos de estresse, apesar da íntima relação entre o estresse emocional e dores miofasciais observados na clínica.

Para realização da avaliação morfofisiológica muscular, alguns trabalhos utilizam como metodologia a imunoistoquímica para marcador α CD-31 do endotélio (Cebasek *et al.*, 2006), visando avaliar a densidade capilar, como reflexo da capacidade oxidativa dos músculos e suas fibras constituintes. Dentro desta mesma perspectiva, técnicas histoquímicas para análise das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo diaforese (NADH) e succinato desidrogenase (SDH) demonstram a capacidade oxidativa e metabólica do músculo, conforme a intensidade de coloração das fibras musculares, claras, intermediárias e escuras. E a técnica histoquímica para as espécies reativas de oxigênio (ROS) permite avaliar a sua produção pelas fibras do músculo. O aumento na produção de ROS é considerado estresse oxidativo devido ao aumento da atividade de enzimas responsáveis pela formação e/ou diminuição de enzimas responsáveis pela inativação de ROS (Touyz e Schiffrin, 2004).

Ressalta-se que as alterações morfológicas em músculos da mastigação induzidos pela alteração oclusal e associados ao estresse emocional ainda não foram esclarecidas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a hipótese de que os diferentes tipos de estresse agudo e crônico (repetido e variado) induzem alterações morfofisiológicas no músculo pterigóideo lateral esquerdo em animais submetidos ou não à exodontia unilateral. Em uma segunda etapa, foi avaliada se o procedimento de exodontia unilateral promove alteração da sensibilidade nociceptiva orofacial.

REVISÃO DE LITERATURA

2 Revisão de Literatura

2.1 Músculo Pterigóideo Lateral

Dentre os músculos que abrangem o grupo dos músculos da mastigação, o pterigoideo lateral apresenta-se em formato de leque e menor comprimento em relação aos demais componentes desse grupo, representando cerca de 3 a 4% da musculatura responsável pelo fechamento mandibular (Cox e Jeffery, 2011).

A literatura tem se apresentado bastante controversa no que diz respeito à sua anatomofisiologia. Bertilsson e Strom (1995) revisaram a anatomia e a função do músculo pterigoideo lateral nos últimos 100 anos e observaram não haver consenso quanto à sua divisão anatômica, havendo relatos de que seja constituído por uma, duas ou três cabeças. Predominantemente na literatura, é mais aceita a divisão em duas cabeças: a superior e a inferior, devido à orientação das fibras musculares na direção horizontal e oblíqua. Sugere-se que esta variabilidade pode ser devido às diversas metodologias empregadas para acessar tal musculatura, bem como variações anatômicas encontradas nas peças analisadas (Coskun Akar, Govsa e Ozgur, 2009; Mazza *et al.*, 2009; Cox e Jeffery, 2011). Kawakami *et al.* (2012) acreditam que em muitas disfunções craniomandibulares, as condições patológicas na articulação temporomandibular (ATM) estejam relacionadas ao músculo pterigoideo lateral devido sua íntima relação ao disco, cápsula articular e processo condilar da mandíbular. Em ratos, a análise morfológica tem evidenciado semelhança tanto na forma quanto em sua origem e inserção, comparados ao humano (Cox e Jeffery, 2011).

Como principais funções do músculo pterigoideo lateral podem-se destacar a abertura, fechamento, lateralidade e protrusão mandibular (Madeira, 2012), entretanto, a falta de consenso quanto sua origem e inserção aumenta a discussão a respeito de sua função em relação ao disco articular e ATM. Apesar da divergência encontrada, a literatura relata como origem da cabeça superior do músculo pterigoideo lateral a superfície infratemporal da asa maior do osso esfenóide e a cabeça inferior, na face lateral da lâmina lateral do processo pterigoideo (Matsunaga *et al.*, 2009; Madeira, 2012). Bertilsson e Strom (1995) encontraram que 60% dos artigos por eles pesquisados afirmando que a cabeça superior se insere na fôvea pterigoidea, disco articular, bem como cápsula da articulação temporomandibular e processo condilar (Coskun Akar, Govsa e Ozgur, 2009; Matsunaga *et al.*, 2009). Deste modo, muito se

é discutido sobre o papel do músculo pterigoideo lateral no deslocamento anterior do disco articular (Coskun Akar, Govsa e Ozgur, 2009). Em pacientes que apresentaram quadro de mioespasmo foi observado disfunção mandibular, dificuldade de fechamento da boca após ampla abertura, bem como movimentos involuntários da mandíbula (Cao *et al.*, 2012).

2.2 Exodontia

O sistema estomatognático abrange um conjunto de estruturas, tais como, nervos, vasos sanguíneos, ossos, articulações, dentes e músculos, que juntos atuam harmonicamente para que este sistema execute suas funções de fonação, mastigação e deglutição de modo perfeito e preciso.

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde de 2012, a prevalência do edentulismo vem diminuindo nas últimas décadas, entretanto, atualmente, a população brasileira na idade adulta ainda possui alta taxa de prevalência indicada pelo número de adultos que necessita de algum tipo de prótese (68,8%) (Brasil, 2012). O edentulismo tem sido usado como importante marcador socioeconômico, de autoestima e qualidade de vida em adultos (Starr e Hall, 2010) e esta condição altera a biomecânica oclusal e gera desequilíbrio do sistema estomatognático.

Haskin, Milam e Cameron (1995) relacionaram a alteração biomecânica como, por exemplo, a perda dos dentes e a mordida unilateral como um possível fator etiológico para distúrbios na ATM. Entretanto, Magnusson, Nilsson e Magnusson (2010) especulam que o fator hormonal tem papel importante na relação alteração oclusal e distúrbios temporomandibulares (DTM). Após analisarem 259 crânios humanos, constataram que, em mulheres, a correlação entre degeneração da ATM e suporte oclusal era grande comparada aos crânios masculinos, e, ainda, esta correlação aumentava com a idade.

Reinhardt *et al.* (2006) avaliaram clinicamente 200 indivíduos, portadores de DTM e outros sem diagnóstico da patologia e encontraram que os que relataram predominância de mordida unilateral apresentaram maiores sinais e sintomas de DTM. Entretanto, devido à complexidade da patologia, etiologias multifatoriais que envolvam não somente a oclusão, como também fatores psicossomáticos, patofisiológicos, anatômicos e traumáticos necessitam ser incluídos (Reinhardt *et al.*, 2006).

Dando suporte aos achados de pesquisadores anteriores, Huang *et al.* (2002)

encontraram como fatores de risco: trauma facial, apertamento dental, somatização e o sexo feminino. Huang *et al.* (2002) mostraram que a exodontia do terceiro molar seria um fator de risco de DTM em pacientes com dor miofascial isolada ou associada à artralgia, e sugerem que isso pode ser devido ao trauma durante a abertura ampla da boca, pela força exercida sobre a mandíbula e ainda, pelo fato da cirurgia conduzida sob anestesia geral reduzir o mecanismo de proteção utilizado pelo indivíduo afetando, desta forma, tanto a ATM como os músculos da mastigação.

A perda dos elementos dentais impossibilita que os músculos da mastigação trabalhem adequadamente, alterando inclusive a força da mordida (Bhoyar *et al.* 2012). A análise de radiografias cefalométricas laterais de cadáveres reforça esta afirmação, uma vez que através da injeção de contraste no músculo masseter superficial de indivíduos desdentados é possível observar que a morfologia difere significativamente daqueles com dentição completa (Kasai *et al.*, 1994). Para avaliar o efeito da alteração oclusal na estrutura muscular, Bazan *et al.* (2008) se utilizaram do modelo de exodontia unilateral de molares superiores esquerdos em cobaias e constataram que após 60 dias houve adaptação morfofuncional do músculo pterigoideo medial através de análises morfológica, bioquímica e ultraestrutural.

Assim, junto à alteração oclusal é frequente a associação com a disfunção do sistema estomatognático causada por atividade muscular inadequada apresentada, clinicamente, com sinais e sintomas de espasmo muscular, miosite, fadiga e dor (Christensen e Rassouli, 1995; Demir *et al.*, 2005) e sua associação como fator de risco para DTM.

2.3 Sensibilidade Nociceptiva

Em 2008, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) revisou e incluiu terminologias empregadas no estudo da dor, que somente haviam sido estabelecidas em 1994. Sendo assim, a dor é definida como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrito em termos de tais danos” (Loeser e Treede, 2008). Trata-se de uma experiência consciente e subjetiva que é acompanhada necessariamente por um componente afetivo e seguida por componentes cognitivos, autonômico, e sensorial-discriminativo e requer a interpretação aversiva da informação nociceptiva, desta forma, desempenhando papel de um sistema de alerta ao corpo contra possível lesão (Aguggia, 2003; Barrot, 2012).

Ademais, foi estabelecida a terminologia nocicepção definida como “processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo” (Loeser e Treede, 2008). Ainda, alertam que devida atenção deve ser tomada para evitar a confusão entre as terminologias dor e nocicepção, uma vez que um pode ocorrer sem a presença do outro, quando, por exemplo, é realizada anestesia local para realização de pequena cirurgia, há nocicepção periférica sem, entretanto, haver dor.

De acordo com alguns critérios, a dor varia em intensidade, qualidade e duração (Voscopoulos e Lema, 2010). Considerando-se a duração, a condição dolorosa é classificada em dor aguda e crônica, apresentando entre si diferenças clínicas substanciais (Klaumann, Wouk e Sillas, 2008).

Também chamada de dor transitória, a dor aguda possui função protetora com propósito biológico, uma vez que é desencadeada por uma lesão ou doença específica, informando a presença de dano tecidual potencial ou real, que induz respostas protetoras de retirada ou fuga, e possui característica auto-limitante (Grichnik e Ferrante, 1991; Klaumann, Wouk e Sillas, 2008). Por outro lado, a dor crônica, que pode ser encontrada na literatura como dor persistente, normalmente ultrapassa o período normal necessário para a cicatrização e recuperação de lesões e doenças, sendo referida por mais de três a seis meses, e é bem relacionada ao estado emocional, não apresentando função protetora (Grichnik e Ferrante, 1991; Leite e De Oliveira Gomes, 2012).

Para a avaliação da “dor” em roedores, testes nociceptivos são utilizados, pois a mensuração da dor em animais ainda é um campo a ser explorado, uma vez que em humanos, é avaliada e quantificada pela expressão verbal, não sendo possível em roedores (Barrot, 2012). Para avaliar de que forma a dor é provocada diversos procedimentos experimentais são utilizados, incluindo: testes de dor aguda, tônica (i.e., testes de curta duração, que em geral duram de minutos a algumas horas) ou crônica (Mogil, 2009).

Neste contexto, diversos testes nociceptivos são utilizados baseados em estímulos elétricos, térmicos, mecânicos e químicos (Le Bars, Gozariu e Cadden, 2001). Na área odontológica, Clavelou *et al.* (1989) encontraram em experimentos comportamentais com o intuito de avaliar a nocicepção orofacial, envolvendo animais, que apenas a dor aguda era testada. Além disso, relataram que estes testes necessitariam de algum tempo de restrição, o que poderia causar algum tipo de estresse e alterar a sensibilidade à dor (Clavelou *et al.*, 1989; Ghaly e Teplitz, 2004; Marchand, 2012).

Desta forma, um teste bastante empregado para avaliar a nocicepção orofacial em roedores é o teste da formalina orofacial. Este teste, adaptado por Clavelou *et al.* (1989),

envolve uma estimulação química na região das vibrissas nasais do rato, provocando uma resposta comportamental nociceptiva que pode ser observada em duas fases: uma de curta duração (dor fásica) e uma de longa duração (dor tônica).

Assim, na presença de uma lesão, o corpo transmite estímulo aferente da dor, que pode ser tanto mecânico, quanto térmico ou químico, da periferia do corpo ao córtex cerebral (Aguggia, 2003; Guyton e Hall, 2011). Para que seja devidamente compreendida, é necessário que esta informação seja integrada em três níveis do sistema nervoso: medula espinal, tronco encefálico e telencéfalo (Aguggia, 2003; Guyton e Hall, 2011). A camada superficial da pele e alguns tecidos internos são regiões do corpo em que se encontram distribuídas terminações nervosas livres, que são receptores da dor presentes nos terminais dos neurônios de primeira ordem (Guyton e Hall, 2011). Estes são do tipo pseudounipolares e possuem seu corpo celular fora do sistema nervoso central (SNC), no gânglio da raiz dorsal e no gânglio trigeminal (Aguggia, 2003). Este neurônio contrai sinapse com os neurônios de segunda ordem, localizados no corno dorsal da medula espinal, cruzam a linha média e ascendem através do trato espinotalâmico para, a seguir, realizar sinapse com o neurônio de terceira ordem presente no núcleo ventral pósterolateral do tálamo dorsal (Machado e Campos, 1993; Aguggia, 2003). Estes por sua vez, projetam-se para o córtex somatosensorial do giro pós-central (Machado e Campos, 1993; Aguggia, 2003). Quando o estímulo nociceptivo ocorre na região da face, os neurônios de segunda ordem cruzam a linha média e ascendem através da formação lemnisco trigeminal e contraem sinapse com os neurônios de terceira ordem no núcleo ventral pósteromedial do tálamo dorsal e projetam-se para o córtex somatosensorial (Machado e Campos, 1993).

2.4 Estresse e Dor Miofascial

Para a devida manutenção do meio interno (homeostase), o organismo depende do sistema nervoso visceral (Machado e Campos, 1993). Este sistema possui uma divisão eferente conhecida como sistema nervoso autônomo (SNA), que conduz impulsos originados em centros nervosos até glândulas, músculos lisos e músculo cardíaco, e é por sua vez subdividido em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) (Machado e Campos, 1993). No SNA, a ação das fibras nervosas sobre os músculos e glândulas se dá por meio da liberação de mediadores químicos, acetilcolina e noradrenalina,

que recebem o nome de fibras colinérgicas e adrenérgicas, respectivamente (Machado e Campos, 1993; Guyton e Hall, 2011). De maneira geral, o SNS e SNP atuam de forma antagonista, porém harmônica para adequar o funcionamento do organismo às situações a que for submetido com intensidade e rapidez, mantendo a integridade fisiológica mesmo em situações que recrutem maiores demandas energéticas (Machado e Campos, 1993; Ulrich-Lai e Herman, 2009; Guyton e Hall, 2011). O SNS quando ativado, como em situações estressoras, causa uma descarga em massa, que produz uma reação de “alarme” ou “estresse”, que tem como resultado final permitir ao animal uma atividade vigorosa por meio da conversão do glicogênio em glicose, aumento da sudorese, broncodilatação, aumento na frequência cardíaca e vasoconstrição periférica, resultando em aumento da pressão arterial (Machado e Campos, 1993; Guyton e Hall, 2011).

Ulrich-Lai e Herman (2009) define estresse como uma perturbação ou ameaça real ou potencial, da homeostase ou ao bem-estar. Nesta situação, há elevação dos níveis de glicocorticoides plasmáticos por meio da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Ulrich-Lai e Herman, 2009). A reação ao estressor pode ser expressa tanto na forma aguda como crônica, a qual está relacionada ao estresse patológico (Cuesta e Singer, 2012). Este estresse excessivo, tanto psicológico quanto fisiológico, pode ter consequências deletérias que podem levar à disfunção ou falência de órgãos até doenças críticas (Cuesta e Singer, 2012).

Selye (1998) descreve em estudo, realizado em ratos, as diversas mudanças nos órgãos frente ao estresse agudo, relatando o aparecimento de uma síndrome típica, denominada por ele de “síndrome geral da adaptação”. Esta síndrome expressa o esforço do organismo para se adaptar às novas condições impostas (Selye, 1998).

Corroborando com o estudo descrito anteriormente, Bessa *et al.* (2013) encontraram que em ratos submetidos a estresse crônico variado, o núcleo accumbens, importante componente na via mesolímbica, tem sua estrutura alterada, com consequente exibição de comportamento de anhedonia, i.e., a ausência ou a incapacidade de vivenciar experiências prazerosas.

Por muito tempo, tem-se associado o estresse às doenças crônicas. Pesquisa realizada com moradores, com idade superior a 40 anos, de uma comunidade japonesa avaliou a relação entre a história de doenças físicas crônicas e o estresse psicológico (Nakaya *et al.*, 2014). Três mecanismos básicos poderiam explicar a relação doença versus estresse psicológico: 1) a ativação do eixo HPA aumenta o estresse psicológico (Nakaya *et al.*, 2014), 2) a fadiga seria um sintoma importante em pacientes com doenças físicas e também em indivíduos com

depressão (Hjollund, Andersen e Bech, 2007), 3) um declínio na qualidade de vida e na função, em doenças físicas, aumentariam o estresse psicológico (Lenze *et al.*, 2001).

Cohen, Janicki-Deverts e Miller (2007) apontam ainda as mudanças comportamentais em adaptação aos estressores, como o aumento do consumo de cigarro, a diminuição da prática de exercícios físicos, a privação do sono, como uma via importante que evidencia a influência do estresse ao aumento do risco de doenças. Além disso, diversos processos fisiológicos como as respostas antiinflamatórias e gliconeogênese são regulados pelo cortisol, hormônio secretado pelo córtex suprarrenal em humanos, ou corticosterona em animais (Cohen, Janicki-Deverts e Miller, 2007). A mudança nos níveis de cortisol encontrada na saliva humana apontou uma relação deste hormônio com o índice de estresse (Vedhara *et al.*, 2003).

Em odontologia, muitos estudos procuram estudar a relação das condições estressoras com doenças periodontais (Hugoson, Ljungquist e Breivik, 2002; Ayub *et al.*, 2010), bruxismo (Rosales *et al.*, 2002; Carvalho, Cury e Garcia, 2008), DTMs (Gatchel *et al.*, 1996; Uhac *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2013) e dores miofasciais (Van Selms *et al.*, 2008; Vedolin *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011).

De acordo com o 1º Consenso em Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial, a dor orofacial é definida como uma “dor associada a tecidos moles e mineralizados (pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, glândulas ou músculos) da cavidade oral e da face”, que tem dentre suas principais fontes: a cefaleia, patologias neurogênicas, dores musculoesqueléticas, dores psicogênicas, traumas, câncer, dentre outros como processos inflamatórios e DTM (Carrara, Conti e Barbosa, 2010; Leeuw, 2010).

Em recente estudo epidemiológico sobre a prevalência de cefaléia e dor orofacial em adultos e idosos de uma comunidade brasileira concluiu-se que 55% da amostra relatam algum tipo de dor, a qual está associada com o estado emocional, diversas doenças crônicas, medicação e distúrbios do sono (De Siqueira, Vilela e Florindo, 2013). Nesta população as queixas como, fadiga, dificuldade de abrir a boca e bruxismo podem estar associadas a condições músculo esqueléticas relacionadas à DTM (De Siqueira, Vilela e Florindo, 2013).

A DTM é definida segundo a Academia Americana de Dor Orofacial como um conjunto de distúrbios que envolvem: os músculos da mastigação, a ATM e estruturas associadas (Leeuw, 2010). Devido o envolvimento dos músculos mastigatórios com este distúrbio, diversos estudos têm procurado elucidar de que maneira estes músculos são afetados por fatores psicológicos (Bakke *et al.*, 2004; Simonic-Kocijan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

Para avaliar o impacto do estresse e da ansiedade no limiar de dor à pressão nos músculos mastigatórios em estudantes de odontologia, Vedolin *et al.* (2009) realizaram testes em quatro períodos distintos: uma semana antes da realização das provas acadêmicas, durante a semana de provas, uma semana após a realização das provas e imediatamente após as férias de verão. Nas voluntárias que relatavam dor miofascial, o limiar de dor à pressão apresentava-se menor comparado ao grupo controle, e foi observado que frente a uma situação estressora, como a realização das provas, o limiar de dor para ambos os grupos diminuiu, o que demonstra uma relação com o estresse e a ansiedade (Vedolin *et al.*, 2009).

Em ratos, a avaliação da ultraestrutura e do metabolismo energético do músculo masseter demonstrou que o estresse psicológico é capaz de induzir lesões mitocondriais e hiperemia nos capilares do músculo e que quanto mais prolongado o estresse, mais severo é o dano causado (Chen *et al.*, 2010). Em 2012, Wu *et al.* encontraram que o estresse psicológico está muito ligado à DTM após análise ultraestrutural do músculo pterigoideo lateral e disco articular.

OBJETIVOS

3 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do estresse agudo e crônico (repetido ou varidado) em ratos submetidos ou não à exodontia unilateral dos molares superiores esquerdos, por meio de:

- 1) Avaliação do peso corporal.
- 2) Análises morfofisiológicas do músculo pterigóideo lateral esquerdo, utilizando técnicas de imunoistoquímica e histoquímica. Sendo estas as seguintes:
 - ✓ Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise das características morfológicas do tecido.
 - ✓ Histoquímica:
 - Succinato desidrogenase (SDH) para demonstrar a capacidade oxidativa da fibra e sua resistência à fadiga;
 - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para avaliar a capacidade metabólica do músculo;
 - Avaliar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)
 - ✓ Imunoistoquímica:
 - Com α CD-31 e laminina para detecção de glicoproteínas de membranas.

Em uma segunda etapa, foi avaliada se o procedimento de exodontia unilateral promove alteração da sensibilidade nociceptiva orofacial, por meio de:

- 1) Avaliação da resposta nociceptiva em grupos individuais de ratos com ou sem exodontia pelo teste da formalina orofacial.

MATERIAL E MÉTODO

4 Material e Método

4.1 Amostra

Foram utilizados 66 ratos machos *Wistar* (± 250 g no início dos procedimentos), procedentes do Biotério Central da Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), mantidos em temperatura controlada entre $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com iluminação controlada para 12 horas de ciclo claro-escuro (com início às 6h), em caixas plásticas (cama de maravalha) coletivas (4 ratos/caixa), que receberam ração e água filtrada à vontade ou controlada, de acordo com o protocolo experimental realizado.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 2 grandes protocolos, conforme Tabela 1: Grupo com Exodontia (GE) induzida pela exodontia unilateral dos molares superiores esquerdos e Grupo Sem Exodontia (GSE) cujos ratos não tiveram seus molares superiores esquerdos extraídos. Os ratos de ambos os protocolos foram submetidos ao estresse agudo ou crônico (repetido ou variado). Apenas nos grupos GE e GSE foi realizada a avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial por meio dos grupos Form e Sal. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 11.1.1541.53.9

Tabela 1 – Grupos experimentais

GRUPO EXODONTIA (GE)	GRUPO SEM EXODONTIA (GSE)	Nº de ratos
Ag: ratos com exodontia submetidos ao estresse agudo, de restrição física (2 h)	Ag: ratos sem exodontia submetidos ao estresse agudo, de restrição física (2 h)	n = 5
Rep: ratos com exodontia submetidos ao estresse crônico repetido	Rep: ratos com exodontia submetidos ao estresse crônico repetido	n = 5
Var: ratos com exodontia submetidos ao estresse crônico variado	Var: ratos com exodontia submetidos ao estresse crônico variado	n = 5
Form: ratos com exodontia e sem estresse submetidos à avaliação nociceptiva orofacial com Formalina 2%, aos 23 dias	Form: ratos com exodontia e sem estresse submetidos à avaliação nociceptiva orofacial com Formalina 2%, aos 23 dias	n = 8
Sal: ratos com exodontia e sem estresse, submetidos à avaliação nociceptiva orofacial com solução salina 0,9% (controle formalina)	Sal: ratos com exodontia e sem estresse, submetidos à avaliação nociceptiva orofacial com solução salina 0,9% (controle formalina)	n = 8
C: ratos com exodontia e sem estresse (controle estresse)	C: ratos com exodontia e sem estresse (controle estresse)	n = 5

4.2 Indução da alteração oclusal

Inicialmente (Figura 1: Dia 0) os ratos do grupo experimental com exodontia (GE), $n = 30$, foram submetidos à anestesia com associação de xilazina 4% (10 mg/kg) e cetamina 10% (80 mg/kg), intraperitonealmente. Após assepsia e anti-sepsia do local cirúrgico com PVPI – Iodo Polvidini, os ratos foram submetidos à exodontia de todos os molares superiores esquerdos com o auxílio de uma pinça anatômica infantil e de um Hollembach 3S, previamente esterilizados e banhados com Polivinilpirrolidona iodo (PVPI) (Figura 2A). Como medida profilática os ratos receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico veterinário pequeno porte - "Fort Dodge") na dosagem 25000 UI das penicilinas por Kg de peso corporal, e uma dose de 1mL/kg de Banamine a 1 % de flunixinina (Schering-Plough SA, RJ), um antiinflamatório, antipirético e analgésico, de longa duração, via subcutânea, para contribuir com a recuperação pós-cirúrgica.

Posteriormente, estes ratos do protocolo GE, subgrupos Ag, Rep e Var foram submetidos respectivamente aos protocolos de estresses: agudo, crônico repetido ou crônico variado. Os animais sem exodontia (GSE), dos subgrupos Ag, Rep e Var foram submetidos ao mesmo tipo de estresse operatório para exodontia, ou seja: anestesia, uma dose única de antibiótico (Pentabiótico veterinário pequeno porte - "Fort Dodge") na dosagem 25000 UI das penicilinas por Kg de peso corporal, e uma dose de antiinflamatório, analgésico e antipirético (Banamine a 1 % de flunixinina), e foram colocados em posição cirúrgica (decúbito dorsal com boca aberta e mandíbula tracionada súpero-inferiormente), porém, sem a realização da exodontia propriamente dita (Figura 2B).

Figura 1 – Tempo experimental em dias e intervenções realizadas.

Figura 2 – Indução da alteração oclusal. **A:** Molares superiores esquerdos extraídos. **B:** Posição cirúrgica para realização dos protocolos para indução ou exodontia propriamente dita.

4.3 Protocolo de estresse agudo

Para realização do estresse agudo foi realizada metodologia de restrição física durante 2 horas. A restrição física foi realizada com auxílio de aparato metálico, ajustado ao corpo do rato, com ventilação adequada (Figura 3). Para a indução do estresse agudo, os ratos foram submetidos a 2 horas de restrição física individualmente, restringindo os movimentos, sem, entretanto, promover completa imobilização (Gamaro *et al.*, 1998).

O protocolo foi realizado das 9 h as 11 h, em sala isolada e com temperatura controlada.

Figura 3 - Aparato utilizado em laboratório para realização de restrição física

4.4 Protocolo estresse crônico repetido e variado

Para os protocolos em que os ratos foram submetidos ao estresse crônico, foram utilizadas duas metodologias distintas: o estresse crônico repetido e o estresse crônico variado. Ambos iniciados 14 dias (Figura 1: D14) após o tempo zero, com ou sem exodontia (Figura 1: D0).

Para o estresse crônico repetido os ratos ($n = 10$) permaneceram, individualmente, em restrição física 2 horas por dia, durante 10 dias adaptado de Ferretti *et al.* (1995), em aparato semelhante ao utilizado para o estresse agudo (Figura 3).

Para o estresse crônico variado ($n = 10$) foram realizadas cinco distintas formas de estresse, reproduzidas durante tempo total de 10 dias. As situações estressoras foram adaptadas de estudo de Willner (1997) sendo as seguintes:

Dia 01 e dia 06: Agitação: os ratos foram colocados individualmente em uma caixa plástica sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos, com velocidade média de 50 rpm (Figura 4A).

Dia 02 e dia 07: Nado Forçado: foi realizado em um tanque metálico circular com profundidade de 54 cm e 47 de diâmetro, preenchido com água até a altura de 40 cm, evitando contato do rato com o chão ou com a borda superior quando este permanece em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, trocada para cada animal. O tempo deste procedimento foi de 15 minutos.

Dia 03 e dia 08: Restrição Forçada: foi realizada em aparato metálico como descrito anteriormente, pelo período de 2 horas (Figura 3).

Dia 04 e dia 09: Exposição ao frio: os ratos foram expostos à temperatura de 4°C , estando em caixas plásticas individuais pelo período de 30 minutos (Figura 4B).

Dia 05 e dia 10: Privação de Água: foi removido o bebedouro por 24 horas.

Os protocolos foram realizados das 9 h as 11 h, em sala isolada e com temperatura controlada.

Figura 4 – Indução do estresse variado. **A:** Estresse por agitação. **B:** Estresse por exposição ao frio.

4.5 Avaliação do peso corporal dos ratos

Para avaliar se o procedimento experimental de exodontia unilateral esquerda promoveu alteração da ingestão alimentar, foi realizado acompanhamento do peso corporal dos animais durante todo o período experimental. Para isto, os ratos foram pesados em balança (Marca Toledo do Brasil, modelo 9094C/4, série 10286058) nos dias D0, D5, D10, D15, D20, D23 do experimento, antes de cada procedimento experimental. Os ratos foram levados à balança individualmente em caixas de polietileno e os dados foram registrados em protocolo.

4.6 Obtenção das amostras para corte congelado

Ao fim dos protocolos experimentais, os ratos foram pesados e submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica com a associação de xilazina 4% (30 mg/kg) e cetamina 10% (225 mg/kg), por via intraperitoneal e decapitados para possibilitar a remoção do músculo pterigoideo lateral esquerdo. Para tanto, foi realizado corte sagital da cabeça do animal para facilitar o acesso ao músculo.

Assim que foi removido, o músculo foi posicionado sobre um suporte contendo *tissue teck* (Figura 5A), recoberto por talco inerte (Figura 5B) e congelado por imersão em nitrogênio líquido (-150°C) (Figura 5C). Depois de nomeada, a amostra foi acondicionada em

freezer à -80°C e posteriormente transferida para a câmara de um micrótomo criostato à -20°C para a realização de cortes transversais de 10 µm de espessura para a realização da análise de microscopia de luz por meio da técnica de hematoxilina-eosina, histoquímica para análise da atividade metabólica (SDH) e atividade oxidativa (NADH). Cortes de 5 µm de espessura foram utilizados para a análise da espécie reativa de oxigênio (ROS) e imunoistoquímica para detecção de capilares (α CD-31 e laminina).

Figura 5 – Obtenção das amostras para corte congelado. **A:** Posicionamento do músculo sobre suporte contendo *tissue teck*. **B:** Músculo recoberto por talco inerte. **C:** Congelamento por imersão em nitrogênio líquido.

4.7 Técnicas utilizadas

4.7.1 Técnica para dosagem de corticosterona

Para a análise da dosagem da corticosterona plasmática nas condições experimentais, dois ratos de cada subgrupo foram selecionados aleatoriamente e o sangue coletado por meio de decapitação sem anestesia prévia para que não houvesse interferência na dosagem. Após sua obtenção, o sangue foi centrifugado utilizando a centrífuga EPPENDORF 5810R por 20 minutos à 4°C com velocidade de 3500 rpm, e 2000 µL do componente plasmático (sobrenadante) coletado. Deste plasma coletado, 50 µL foram processados pelo método Luminex, que consiste na identificação de microesferas coradas por fluoróforos. Por meio do imunoensaio, anticorpos de captura localizados na superfície da microesfera são detectados por um marcador fluorescente, a ficoeritrina (PE) e feixes de dois lasers diferentes detectam a microesfera e quantificam o sinal de reporte em cada uma (Veinalde *et al.*, 2013).

4.7.2 Técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Os cortes transversais semi-seriados de 10 µm de espessura, do músculo pterigoideo lateral esquerdo, obtidos em micrótomo criostato foram colocados sobre as lâminas e fixados em formol cálcio baker. Após a lavagem foram coradas com hematoxilina, lavadas novamente e coradas com eosina. Depois, passadas rapidamente no álcool 95°, em seguida no álcool absoluto (I, II, III) e por último no xilol (I, II, III). Finalmente, as lâminas foram montadas com Entellan.

Fotomicrografias foram capturadas com o auxílio de uma câmera OLYMPYS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61 e imagens da totalidade do corte capturadas com a objetiva de 40x. A morfologia das fibras musculares e características do tecido conjuntivo de sustentação foram analisadas, nas diferentes condições experimentais.

4.7.3 Histoquímica para demonstração de succinato desidrogenase (SDH)

Lâminas contendo cortes de 10 µm de espessura do músculo foram incubadas em solução de succinato de sódio e nitroblue tetrazolium (NBT) por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas com água destilada, fixadas em formol cálcio baker por 5 minutos,

novamente lavadas com água destilada, e por fim montadas com xarope de apaty. Esta reação permite a identificação de fibras de coloração azulada, nas intensidades clara, intermediária e escura, e demonstram a intensidade da atividade da succinato desidrogenase. O NBT funciona como um aceptor de elétrons em determinado ponto ao longo da cadeia respiratória na mitocôndria e quando incubado forma um precipitado de coloração azulada, a formazana (Bancroft e Cook, 1994)

Para a avaliação da capacidade metabólica das fibras musculares nas diversas condições experimentais, de cada secção transversal do músculo foram capturadas sistematicamente cinco imagens com a objetiva de 20x, com o auxílio de uma câmera OLYMPUS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61. O tamanho da amostra foi determinado tendo como base o cálculo estereológico descrito por Mandarim-De-Lacerda, (1995) para ser significativa a quantificação de fibras claras, intermediárias e escuras. Para tanto, sobre cada imagem foi sobreposto um sistema teste de 108 pontos que permitiu a contagem dos pontos que sobrecaiam sobre cada tipo de fibra, usando o programa ImageJ (Figura 6). A determinação da atividade metabólica dos diferentes tipos de fibras seguiu os critérios estabelecidos por Peter *et al.* (1972).

Figura 6 - Contagem das fibras por meio do sistema teste de 108 pontos utilizando programa ImageJ.

4.7.4 Histoquímica para demonstração da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)

Lâminas contendo cortes de 10 µm de espessura do músculo foram incubadas em solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e NBT por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas com água destilada, fixadas em formol tamponado 5% pH 7,0 por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada, e por fim montadas com xarope de apaty. Esta reação permite a identificação de fibras de coloração arroxeada, nas intensidades clara (glicolítica), intermediária (glicolítica oxidativa) e escura (oxidativa) (Peter *et al.*, 1972).

Para a avaliação da capacidade oxidativa das fibras musculares nas diversas condições experimentais, de cada secção transversal do músculo foram capturadas sistematicamente cinco imagens com a objetiva de 20x, com o auxílio de uma câmera OLYMPUS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61. O tamanho da amostra foi determinado tendo como base o cálculo estereológico descrito por Mandarim-De-Lacerda (1995) para ser significativa a quantificação de fibras claras, intermediárias e escuras. Para tanto, sobre cada imagem foi sobreposto um sistema teste de 108 pontos que permitiu a contagem dos pontos que sobrecaiam sobre cada tipo de fibra usando o programa ImageJ. A determinação da atividade oxidativa dos diferentes tipos de fibras seguiu os critérios estabelecidos por Peter *et al.* (1972).

4.7.5 Histoquímica para demonstração das espécies reativas de oxigênio (ROS)

As concentrações de ROS foram analisadas *in situ*, em lâminas contendo cortes transversais de 5 µm de espessura incubadas em solução contendo dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10^{-5} µg/mL (Hao *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008) durante 15 minutos em câmara úmida e escura. A reação entre o DHE e o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) presente nos tecidos resultou na formação dos produtos 2-hidroxi-etídeo e etídeo, que emitem fluorescência vermelha no local. Após a incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em paraformaldeído (PFA) 4%. De cada animal, 10 imagens foram sistematicamente capturadas com objetiva de 40x, com o auxílio do microscópio de fluorescência OLYMPUS BX 61 acoplado à câmera fotográfica, com a velocidade da luz

padronizada em 10 milissegundos. Usando o programa ImageJ, foi sobreposto um quadrado de 3 mm sobre os 30 núcleos maior intensidade de fluorescência vermelha de cada fotografia. A quantidade de ROS foi determinada calculando-se a maior intensidade luminosa emitida, por unidade de área em cada fotografia.

4.7.6 Técnica de imunoistoquímica anticorpo anti CD-31 e Laminina

O anticorpo anti CD-31, também conhecido como PECAM-1 é muito utilizado em reações de imunoistoquímica para demonstração da presença de células endoteliais nos tecidos, por se tratar de uma glicoproteína de membrana presente no endotélio capilar. Assim como o CD-31, a laminina é também uma glicoproteína de membrana basal que desempenha muitas funções fisiológicas, incluindo funções em diferentes tecidos, incluindo o vascular (Durbeej, 2010). Para estas reações, cortes transversais de 5 µm de espessura obtidos em micrótomo criostato foram acomodados em lâminas silanizadas e fixados em acetona P.A. (Merck, Alemanha) por 5 minutos. Após 3 lavagens com PBS as lâminas foram imersas em solução contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 volumes, por 6 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS e imersas em solução de soro fetal bovino (BSA) 3% (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 minutos para bloqueio das proteínas inespecíficas e diminuição das marcações de fundo. A seguir foram realizadas 3 lavagens com PBS e os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-CD-31 (1:100, Abcam ab28364, UK) e anti-laminina (1:100, Abcam ab11575, UK) *overnight* a 4°C. Após a incubação em anticorpo primário, os cortes foram submetidos a 3 lavagens de PBS e expostos ao anticorpo secundário biotilado (kit LSAB – HRP, K0690, Dako, Dinamarca), para amplificação do sinal, por 2 horas a 37°C. Nova lavagem com PBS foi realizada e em seguida os cortes foram revelados com DAB (3,3 diaminobenzina, Biogen, Brasil) por 3 minutos para as reações anti-CD-31 e por 30 segundos para as reações anti-laminina. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina por 1 minuto e meio, lavados em água corrente por 3 minutos e desidratados em soluções crescentes de álcoolis 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e diafanizados com xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (HX378130, Merck KgaA, Alemanha).

Cinco imagens de cada animal foram sistematicamente capturadas em objetiva de 40x, com auxílio da câmera OLYMPUS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61. A

avaliação da marcação do anticorpo anti-CD-31 foi realizada pelo programa ImageJ contando por censo os capilares corados. Para a avaliação da laminina foi realizada uma análise qualitativa das fotomicrografias obtidas.

4.8 Procedimento para avaliação da sensibilidade nociceptiva

No D23 do experimento, previamente ao experimento, cada rato foi individualmente colocado na caixa de avaliação comportamental (30 cm de lado) por um período de 30 minutos para habituação (Figura 7). Após este período, os ratos dos grupos Sal e Form dos protocolos GSE e GE foram acondicionados, por aproximadamente 1 minuto em recipiente de vidro tampado contendo algodão embebido com halotano para anestesia por inalação. Em seguida, foi aplicada 50 μ L de solução salina (controle) (0,9%) ou formalina a 2% na região das vibrissas em lábio superior previamente tracionado. Após efeito da anestesia, cada rato foi colocado individualmente em caixa para avaliação comportamental.

O índice nociceptivo avaliado foi o tempo gasto pelo rato (em segundos) com o comportamento de coceira na região orofacial por um período de 45 minutos (15 blocos de 3 minutos cada).

Figura 7 – Caixa para avaliação comportamental.

4.9 Análise Estatística

Os dados de quantificação dos testes histoquímicos e imunoistoquímicos foram informados como média e erro padrão da média. Observada a normalidade dos dados, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) fatorial, com fatores de variação fixos seguida pelo teste pós-teste de Tukey-Kramer, considerada significativa $P < 0,05$.

Para a análise do peso dos animais foi realizado o teste ANOVA de três fatores para variáveis dependentes, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Diferença considerada significativa $P < 0,05$.

Na avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial foi considerada a média do tempo, em segundos, da emissão do comportamento de coçar a região orofacial ipsilateral à injeção de formalina 2% salina $0,9\% \pm$ erro padrão da média, em intervalos de 3 minutos. Para análise estatística será utilizada a ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls, considerando para significância $P < 0,05$.

No caso do teste de corticosterona não foi realizada a análise estatística porque o objetivo da técnica foi somente comprovar o estresse nos grupos experimentais.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Avaliação do peso corporal de ratos

A aplicação do teste estatístico ANOVA identificou diferença significativa quando considerado o fator estresse ($F_{3,199} = 53,94$, $P < 0,001$), tempo ($F_{4,199} = 219,46$, $P < 0,001$), bem como na interação entre estresse e tempo ($F_{12,199} = 3,12$, $P < 0,001$). Para determinar o peso corporal dos ratos nas diferentes situações experimentais calculou-se a diferença do peso dos animais entre o D0 e cada um dos tempos pré-determinados: D5, D10, D15, D20 e D23. O estresse crônico repetido interferiu de forma significativa no ganho de peso dos animais quando comparado aos demais protocolos de estresse realizados (controle, estresse agudo e crônico variado) ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa no peso dos ratos que receberam estresse agudo e estresse crônico variado em relação ao grupo controle ($P < 0,01$). A exodontia, bem como sua interação com os tempos avaliados não interferiram no ganho de peso quando associadas aos diferentes tipos de estresse, ($P > 0,05$). Considerando-se a interação entre os diferentes tipos de estresse e os tempos em que foram realizadas as pesagens dos animais, o teste de Newman-Keuls aponta diferença significativa do estresse crônico repetido em relação a todos os outros estresses avaliados, nos tempos D15, D20, D23 ($P < 0,001$) (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação do peso corporal, em gramas, dos ratos submetidos aos protocolos de estresse: controle, agudo, crônico repetido e crônico variado. Representação das médias $\pm$ EPM do ganho de peso obtido ao longo dos tempos experimentais determinados (D5, D10, D15, D20 e D23). † Diferença significativa entre o grupo estresse crônico variado comparado aos estresses agudo e crônico repetido, $P < 0,05$ no pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa entre o grupo estresse crônico variado comparado aos demais grupos de estresse, $P < 0,001$, no pós-teste de Newman-Keuls.

5.2 Dosagem da corticosterona plasmática

A dosagem da corticosterona plasmática revelou maiores níveis nos grupos Ag, Rep e Var quando comparada a do grupo C, como pode ser observado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Níveis de Corticosterona Plasmática (ng/mL) nos grupos controle e estressados na ausência da exodontia.

Ausência de Exodontia			
C	Ag	Rep	Var
38,78026	113,440308	83,8604375	154,389853

Tabela 3 - Níveis de Corticosterona Plasmática (ng/mL), nos grupos controle e estressados na presença da exodontia.

Presença de Exodontia			
C	Ag	Rep	Var
112,756238	149,359605	87,323335	46,5251525

5.3 Coloração em Hematoxilina-Eosina (HE)

A análise qualitativa das fotomicrografias (Figura 9) avaliou os efeitos dos estressores e da exodontia nas fibras musculares e no tecido conjuntivo do músculo pterigoideo lateral. Foram observadas possíveis alterações nas características das fibras musculares e a presença de células inflamatórias.

5.3.1 Grupo controle sem exodontia C (Figura 9A)

O músculo pterigoideo lateral do grupo C GSE revelou fascículos com fibras de grande diâmetro intercadalas com fibras de pequeno diâmetro, e outros fascículos com predomínio de fibras de pequeno diâmetro. Ambas as fibras apresentam contorno arredondado e núcleos periféricos, no endomísio e perimísio, as células inflamatórias estão ausente, cujas características correspondem ao aspecto normal do tecido.

5.3.2 Grupo controle com exodontia (Figura 9B)

No C GE o contorno das fibras tornou-se mais angulado, destacando que esse contorno foi mais irregular nas fibras de pequeno diâmetro. Nenhuma alteração foi observada no endomísio e perimísio.

5.3.3 Grupo estresse associado a exodontia (Ag GE, Rep GE, Var GE) (Figuras 9D, F, H)

Devido a similaridade dos efeitos causados pela associação dos fatores de variação estes grupos foram analisados simultaneamente.

Os três grupos revelaram fascículos com aspecto normal e outros com fibras de pequeno diâmetro entre as fibras de diâmetro maior caracterizadas por contorno angulado, assim como, algumas com núcleo central. A característica normal do endomísio e perimísio foi evidenciada em todos os grupos de estresse associado à exodontia. Destaca-se que no grupo Var GE, isoladas fibras assumiram diâmetro desproporcionalmente maiores que as demais, além de núcleo central, em determinados fascículos.

5.3.4 Grupo estresse sem exodontia (Ag GSE, Rep GSE, Var GSE) (Figuras 9C, E, G)

Para facilitar a compreensão dos achados morfológicos, estes grupos foram comparados ao C GSE. Nos grupos Ag GSE e Rep GSE, as características das fibras foram normais, mas com incidência de isoladas fibras de núcleo central.

No grupo Var GSE as fibras de diâmetros variados e contorno angulado são semelhantes aos submetidos à exodontia (C GE e Ag GE), e fibras de núcleo central mais frequentes. O endomísio e o perimísio não apresentaram células inflamatórias.

Figura 9 – Fotomicrografia dos cortes corados com HE no aumento de 40x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

5.4. Histoquímica para demonstração da succinato desidrogenase (SDH)

A reação de SDH permitiu avaliar a atividade metabólica do músculo pterigoideo lateral esquerdo por meio da diferenciação da coloração azul apresentada pelas fibras musculares, fibras de coloração azul clara, intermediária e escura. As fibras escuras foram consideradas as de maior atividade metabólica devido à alta quantidade de mitocôndrias coradas. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 10.

5.4.1 Atividade da SDH nos grupos submetidos à exodontia ou aos estresses, de maneira isolada ou associada

Esses grupos foram descritos simultaneamente pela semelhança dos resultados observados nos dois fatores de variação isolados ou associados (Figuras 11 a 15)

A quantidade relativa de fibras claras, intermediárias e escuras não apresentaram diferenças significantes ($P > 0,05$) entre os grupos submetidos aos estresse e à exodontia de maneira isolada.

Quando a exodontia foi associada aos estresses houve uma tendência ao aumento na quantidade relativa de fibras intermediárias.

Figura 10 - Fotomicrografia dos cortes para reação histoquímica para SDH no aumento de 20x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

Figura 11 – Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse agudo. Representação das médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C).

Figura 12 – Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico repetido. Representação das médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C).

Figura 13 – Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico variado. Representação das médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C).

Figura 14 – Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C).

Figura 15 – Avaliação da atividade metabólica das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C).

5.5 Histoquímica para demonstração de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)

A reação de NADH permitiu avaliar a capacidade oxidativa do músculo pterigoideo lateral esquerdo por meio da identificação de fibras de coloração arroxeada nas intensidades glicolíticas, oxidativa glicolítica e oxidativa. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 16.

5.5.1 Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse agudo

Houve diminuição significativa das fibras glicolíticas ($P < 0,01$) do grupo Ag GE ($14,440 \pm 2,25$) comparadas aos grupos C GSE ($29,120 \pm 2,35$) e C GE ($28,640 \pm 0,96$) (Figura 17A). Houve aumento significativo das fibras oxidativas glicolíticas ($P < 0,01$) em Ag GE ($60,680 \pm 3,22$) comparado ao grupo C GSE ($40,640 \pm 4,45$) (Figura 17B). As fibras oxidativas não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos analisados.

5.5.2 Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse crônico repetido

Nas fibras oxidativas glicolíticas do grupo Rep GSE ($54,200 \pm 1,25$) houve um aumento significativo ($P < 0,05$) comparado ao C GSE ($40,640 \pm 4,45$) (Figura 18B). Com relação às fibras glicolíticas, houve uma tendência à diminuição em relação ao grupo Rep GSE ($23,800 \pm 1,61$) em relação ao grupo C GSE ($29,120 \pm 2,35$). As fibras oxidativas não apresentaram diferenças significantes entre os grupos.

5.5.3 Atividade da NADH nos grupos submetidos ao estresse crônico variado

Houve diminuição significativa ($P < 0,05$) das fibras glicolíticas do grupo Var GSE ($20,64 \pm 1,59$) comparada ao grupo C GSE ($29,120 \pm 2,35$) e do grupo Var GE ($17,720 \pm$

2,63) comparada aos grupos C GSE ($29,120 \pm 2,35$) e C GE ($28,640 \pm 0,96$), com $P < 0,01$ (Figura 19A). Na figura 19B pode ser observado aumento significativo das fibras intermediárias ($P < 0,05$) do grupo Var GE ($54,720 \pm 2,91$) comparado ao grupo C GSE ($40,640 \pm 4,45$). Essas fibras apresentaram uma tendência ao aumento nos grupos com a exodontia e estresse variado, isolados. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na quantidade relativa de fibras oxidativas quando comparada entre os grupos.

5.5.4 Atividade da NADH entre os grupos submetidos aos estresses na ausência da exodontia

A figura 20B mostra o aumento significativo ($P < 0,05$) das fibras oxidativas glicolíticas do grupo Rep GSE ($54,200 \pm 1,25$) comparado ao grupo C GSE ($40,640 \pm 4,45$). A quantidade relativa dessas fibras revelou uma tendência ao aumento na condição de estresse agudo (Ag GSE) e crônico variado (Var GSE). Houve uma tendência à diminuição na quantidade relativa de fibras glicolíticas em todos os grupos estressados. A quantidade relativa de fibras oxidativas não foi diferente entre os grupos ($P > 0,05$)

5.5.5 Atividade da NADH entre os grupos submetidos aos estresses associados à exodontia

A figura 21A mostra uma diminuição significativa das fibras glicolíticas ($P < 0,05$) dos grupos Ag GE ($14,440 \pm 2,25$) e Var GE ($17,720 \pm 2,63$) comparados aos grupos C GSE ($29,120 \pm 2,35$) e C GE ($28,640 \pm 0,96$), já o grupo Rep GE ($29,360 \pm 3,51$) mostrou aumento dessas fibras comparado aos grupos Ag GE ($14,440 \pm 2,25$) e Var GE ($17,720 \pm 2,63$). A figura 21B mostra o aumento significativo das fibras oxidativas glicolíticas ($P < 0,05$) no grupo Ag GE ($60,680 \pm 3,22$) comparado ao C GSE ($40,640 \pm 4,45$) e Rep GE ($45,840 \pm 3,30$), e aumento significativo ($P < 0,05$) no grupo Var GE ($54,720 \pm 2,91$) comparado ao C GSE ($40,640 \pm 4,45$). A quantidade relativa de fibras oxidativas não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Figura 16 - Fotomicrografia dos cortes para reação histoquímica para NADH no aumento de 20x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

Figura 17 – Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse agudo. Representação das médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C). **A:** * Diferença significativa entre o grupo Ag GE quando comparado aos grupos C GSE e C GE, com $P < 0,01$. **B:** † Diferença significativa entre o grupo Ag GE comparado ao C GSE, com $P < 0,01$.

Figura 18 – Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico repetido. Representação das médias $\pm$ EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C). **B:** * Diferença significativa entre os grupos Rep GSE comparado ao C GSE, com $P < 0,05$.

Figura 19 – Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência de estresse crônico variado. Representação das médias ± EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C). **A:** * Diferença significativa entre os grupos Var GSE comparado ao grupo C GSE, com $P < 0,05$. † Diferença significativa entre Var GE comparado aos C GSE e C GE, com $P < 0,01$. **B:** # Diferença significativa entre o grupo Var GE comparado ao C GSE, com $P < 0,05$.

Figura 20 – Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C). **B:** * Diferença significativa entre o grupo Rep GSE comparado ao C GSE, com $P < 0,05$.

Figura 21 – Avaliação da capacidade oxidativa das fibras do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias ± EPM das fibras claras (A), intermediárias (B), escuras (C). **A:** * Diferença significativa entre Ag GE e Var GE comparados aos C GSE e C GE, com $P < 0,05$. † Diferença significativa entre Rep GE comparado aos Ag GE e Var GE, com $P < 0,05$. **B:** # Diferença significativa entre Ag GE comparado aos grupos C GSE e Rep GE, com $P < 0,05$. ‡ Diferença significativa entre Var GE comparado ao C GSE, com $P < 0,05$.

5.6 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) - Estresse Oxidativo

A fluorescência emitida pelas espécies reativas de oxigênio manifesta-se pela intensidade de luz vermelha marcada nos núcleos celulares. Este método possibilitou quantificá-las no músculo pterigoideo lateral de ratos submetidos à exodontia e estresses, isolados ou associados. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na figura 22.

A exodontia isolada (C GE) mostrou uma tendência ao aumento do estresse oxidativo sob o estresse agudo, isolado ou associado à exodontia, entretanto, as ROS não alteraram em relação ao C GSE. Nos estresses: Rep GSE ($223,18 \pm 12,87$) e Var GSE ($246,42 \pm 3,57$), isolados; e Rep GE ($229,42 \pm 5,96$) e Var GE ($232,53 \pm 8,68$), associados à exodontia, as ROS foram maiores ($P < 0,05$) em relação ao C GSE ($145,86 \pm 27,16$).

5.7 Imunoistoquímica para detecção de capilares

5.7.1 Alfa CD-31

Os capilares detectados por esta técnica apareceram nas fotomicrografias com coloração marrom e foram usados os campos de alta qualidade para a contagem por senso. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 25.

Aumento significativo do número de capilares foi observado nos grupos Ag GSE ($65,320 \pm 9,76$), Rep GSE ($61,640 \pm 7,76$), Var GSE ($65,840 \pm 5,51$) e Var GE ($65,200 \pm 10,80$) quando comparados ao C GSE ($27,560 \pm 4,10$) e C GE ($28,320 \pm 2,42$). (Figura 26A e 26B).

Todos os tipos de estresses isolados Ag GSE ($65,320 \pm 9,76$), Rep GSE ($61,640 \pm 7,76$) e Var GSE ($65,840 \pm 5,51$) aumentaram o número de capilares em relação ao grupo C GSE ($27,560 \pm 4,10$) (Figura 27A).

Quando os estresses foram associados à exodontia o aumento ($P < 0,05$) foi evidente nos grupos Rep GE ($55,880 \pm 1,49$) e Var GE ($65,200 \pm 10,80$) e uma tendência ao aumento

foi observada no grupo Ag GE ($48,320 \pm 4,71$) em relação aos grupos C GSE ($27,560 \pm 4,10$) e C GE ($28,320 \pm 2,42$) (Figura 27B).

5.7.2 Laminina

A imunomarcção da laminina também revelou a presença de capilares por coloração marrom. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na figura 28.

A análise qualitativa das fotomicrografias mostrou que a exodontia isolada (C GE) não alterou o contorno regular dos capilares em relação ao grupo C GSE. Por outro lado, os estresses isolados Ag GSE, Rep GSE, assim como associados à exodontia Ag GE e Rep GE revelaram numerosos capilares com a luz dilatada entre outros de aspecto normal.

De modo interessante, nos grupos submetidos ao estresse crônico variado isolado ou associado à exodontia, além do aspecto anteriormente descrito, foram observadas áreas de capilares com lúmen diminuído.

Figura 22 - Fotomicrografia dos cortes para histoquímica das ROS no aumento de 40x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

Figura 23 – Avaliação do estresse oxidativo no músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência da exodontia em diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM quando submetido a estresse agudo (A), estresse crônico repetido (B) e estresse crônico variado (C). **B:** * Diferença significativa entre os grupos Rep GSE e Rep GE quando comparado ao grupo C GSE, com $P < 0,05$. **C:** † Diferença significativa entre os grupos Var GSE e Var GE quando comparado ao grupo C GSE, com $P < 0,01$.

Figura 24 – Avaliação do estresse oxidativo no músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência (A) ou presença (B) da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM. **A:** * Diferença significativa entre os grupos Rep GSE e Var GSE comparados aos grupos C GSE e Ag GSE, com $P < 0,05$. **B:** † Diferença significativa entre os grupos Rep GE e Var GE comparados ao grupo C GSE, com $P < 0,01$.

Figura 25 - Fotomicrografia dos cortes para imunquímica para α CD-31 no aumento de 40x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

Figura 26 – Densidade capilar do músculo pterigoideo lateral esquerdo na presença ou ausência da exodontia quando submetidos a estresse agudo (A) e estresses crônicos: repetido (B) e variado (C). Representação das médias $\pm$ EPM. **A:** * Diferença significativa entre Ag GSE comparado aos C GSE e C GE, com $P < 0,01$. **B:** † Diferença significativa entre Rep GSE e Rep GE comparados aos C GSE e C GE, com $P < 0,01$. **C:** # Diferença significativa entre Var GSE e Var GE comparados aos C GSE e C GE, com $P < 0,01$.

Figura 27 – Densidade capilar do músculo pterigoideo lateral esquerdo na ausência (A) ou presença (B) da exodontia quando submetido a diferentes tipos de estresse. Representação das médias $\pm$ EPM. **A:** * Diferença significativa entre os grupos Ag GSE, Rep GSE e Var GSE comparados ao grupo C GSE, com $P < 0,05$. **B:** † Diferença significativa entre os grupos Rep GE e Var GE comparados aos grupos C GSE e C GE, com $P < 0,05$.

Figura 28- Fotomicrografia dos cortes para imunoquímica para laminina no aumento de 40x. **A:** Grupo C GSE. **B:** Grupo C GE. **C:** Grupo Ag GSE. **D:** Grupo Ag GE. **E:** Grupo Rep GSE. **F:** Grupo Rep GE. **G:** Grupo Var GSE. **H:** Grupo Var GE.

5.8 Avaliação da sensibilidade nociceptiva ao teste de formalina orofacial

A aplicação da ANOVA com os resultados obtidos no teste de formalina apontou que há diferença significativa considerando o fator tratamento ($F_{3,420} = 64,151$, $p < 0,001$), tempo ($F_{14, 420} = 7,201$, $p < 0,001$), bem como há interação entre tempo e tratamento ($F_{42, 420} = 2,473$, $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que há diferença do tempo de coceira orofacial ($p < 0,05$) quando comparado os grupos formalina com os grupos que receberam salina, nos dois protocolos utilizados (com ou sem exodontia, Figura 29). Entretanto, o grupo Form GE não difere do grupo Form GSE ($p > 0,05$, Newman-Keuls). Ainda, não há diferença significativa ($p > 0,05$, Newman Keuls) na sensibilidade nociceptiva nos grupos controles (Sal GSE e Sal GE). Considerando a sensibilidade nociceptiva ao longo do tempo, a aplicação do teste de Newman-Keuls aponta diferença significativa na segunda fase do teste de formalina orofacial, em alguns intervalos tempo, (15-18 min e 24-27 min) no grupo que recebeu formalina e foi submetido ao modelo da exodontia quando comparado com o grupo formalina, mas que não foi submetido à exodontia (Figura 29). Por fim, há diferença significativa, na segunda fase do teste de formalina orofacial nos grupos que receberam Formalina (Form GSE e Form GE) quando comparados com os grupos que receberam solução salina orofacial.

Figura 29 – Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial pelo teste da formalina 2% nos grupos Sal GSE, Sal GE, Form GSE e Form GE. Representação das médias $\pm$ EPM do tempo gasto com o comportamento de coçar a região orofacial nos diferentes intervalos de tempo experimental (0 a 45 minutos), em blocos de 3 minutos cada. Φ Diferença significativa entre Form GSE comparado a Sal GSE. Δ Diferença significativa entre Form GE comparado aos grupos Sal GSE, Sal GE e Form GSE. *Diferença significativa entre Form GSE comparado aos grupos Sal GSE e Sal GE. †Diferença significativa entre o grupo Form GE comparado aos grupos Sal GSE e Sal GE. # Diferença significativa entre o grupo Form GSE comparado aos grupos Sal GSE, Sal GE e Form GE. Nível de significância considerado: $P < 0,05$ no teste de Newman-Keuls.

DISCUSSÃO

6 Discussão

6.1 Variação do peso corporal no período experimental

A análise do peso corporal dos ratos quando avaliado os fatores exodontia e estresse, isolados ou associados, ao longo do tempo, evidenciou que a exodontia em si não é capaz de alterar o peso corporal dos animais no tempo estudado, o que justifica a união dos grupos GSE e GE como um só na análise estatística. Este resultado corrobora com o achado de Bani, Bani e Bergamini (1999) que realizaram procedimento e tempo experimental semelhantes de extração dentária em ratos e observaram que com exceção dos dois primeiros dias após a exodontia, o consumo alimentar não reduziu comparando-se os grupos experimentais com os controles.

Recente estudo, realizado pelo Ministério da Saúde, avaliando 27 cidades, aponta que em 2012 51% da população adulta está com excesso de peso e 17,4%, obesos (Brasil, 2013). Ainda, a avaliação de mulheres submetidas a um tipo de estresse crônico evidenciou um aumento no índice de massa corporal mediada pelo aumento da secreção de cortisol, redução da restrição alimentar e aumento da ingestão calórica de alimentos ricos em carboidrato e gordura saturada (Roberts, Campbell e Troop, 2014). A estimulação do eixo HPA durante o estresse aumenta a secreção de cortisol permitindo ao indivíduo maior resistência e sobrevivência baseado na disponibilidade de substratos do metabolismo energético, como açúcar e gordura (Roberts, Campbell e Troop, 2014). Dallman *et al.* (2003) explicam, neurofisiologicamente, que os glicocorticoides em situações estressoras persistentes atuam no cérebro modificando a característica do nutriente ingerido, aumentando o consumo de açúcares e gorduras, denominadas de “alimento de conforto”. Uma possibilidade proposta é a de que estes alimentos reduziram a atividade do impulso central que liga a resposta ao estresse crônico e a ansiedade, o fator liberador de corticotropina (Dallman *et al.*, 2003).

Entretanto, diferentemente dos achados dos trabalhos apresentados, no presente estudo, apenas nos ratos submetidos ao estresse crônico repetido houve redução significativa do peso corporal, em todos os tempos analisados, comparado aos grupos controle e estresses, agudo e crônico variado. Uma possível explicação para a perda de peso encontrada neste trabalho pode ser a formação de úlceras gástricas nos ratos frente ao estresse sofrido, como demonstrado por Izgut-Uysal *et al.* (2007) que observaram a presença de lesão gástrica

induzida pelo estresse em ratos submetidos a estresse crônico repetido por contenção, durante 21 dias. Bagchi *et al.* (1999) acreditam que o estresse pode levar à ocorrência de úlcera gástrica pelo aumento da produção de radicais livres, pelo aumento da peroxidação lipídica, fragmentação de DNA, que são índices de lesão oxidativa tecidual, e pela baixa capacidade antioxidante (Izgut-Uysal *et al.*, 2007). Em camundongos, o estresse crônico repetido por restrição induz a uma rápida perda de peso que não foi recuperada ao longo do experimento (Jeong, Lee e Kang, 2013). Devido à importância na regulação central do peso corporal e da ingestão alimentar, foi avaliado o hipotálamo e observado que muitos genes ligados ao controle do peso corporal apresentaram mudanças na sua expressão devido ao estresse (Jeong, Lee e Kang, 2013). Tais pesquisadores sugerem a possibilidade da regulação da resposta frente ao estresse ser devido a expressão de outros genes ligados ao controle do peso corporal bem como o aumento da corticosterona plasmática.

Além disso, a diferença de resultado apresentada no presente estudo pode ser em razão das diferenças metodológicas empregadas que impedem a devida comparação, como, por exemplo, o consumo não controlado da ingestão de ração, bem como não foi ofertado nenhum alimento de conforto a nenhum dos grupos avaliados.

6.2 Níveis de corticosterona plasmática

Os resultados do nível de corticosterona plasmática, nos grupos estudados, permitiu comprovar que em todos os protocolos realizados houve a presença de estresse, confirmando que o estresse ativou o SNS aumentando a atividade do eixo HPA corroborando com os achados de Kalil *et al.* (2013) e Liu *et al.* (2014). Entretanto o número de ratos utilizados para tal avaliação não foi suficiente para uma determinação da significância estatística do nível de corticosterona plasmática. Faz-se necessário num próximo estudo que esta determinação seja estabelecida, bem como avaliar se a exodontia em si é capaz de alterar os níveis de corticosterona plasmática e, desta forma, alterar a percepção do estresse a que for submetido.

6.3 Alteração da morfologia celular (HE)

O presente estudo revelou por meio da análise morfológica do músculo pterigoideo lateral de ratos submetidos aos fatores exodontia ou estresse, isoladamente, uma evidente alteração no contorno das fibras do músculo. Quando a exodontia foi associada aos diferentes tipos de estresse, as alterações morfológicas mais severas foram observadas no grupo Var GE, com o aparecimento, em alguns fascículos, de fibras isoladas de grande diâmetro, além de aumentar a frequência de fibras com núcleos de localização central.

Apesar da escassez de estudos em músculo pterigoideo lateral, estudos anteriores têm descrito fibras de núcleo central em masseter de ratos submetidos ao aumento da oclusão dental unilateral, as quais foram consideradas fibras regeneradas em desenvolvimento após a degeneração (Nishide *et al.*, 2001). Em outro estudo histológico as fibras de núcleo central foram observadas no músculo pterigoideo medial de gerbis após a exodontia unilateral (Iyomasa *et al.*, 2009). Na literatura, há relatos de redução na espessura do músculo masseter de indivíduos com edentulismo total, revelados por meio de ultrassonografia (Bhoyar *et al.*, 2012); assim como a evidência em indivíduo com hábito de mastigação unilateral uma atrofia severa dos músculos da mastigação controlateral reveladas pela tomografia computadorizada (CT) e ressonância magnética (MRI) (Imauchi, Sakamoto e Abe, 2002). Apesar desses relatos, no músculo pterigoideo lateral ipsilateral à exodontia não houve alterações significantes.

Diante do exposto, as alterações no contorno das fibras e as fibras com núcleo de localização central indicam, respectivamente, atrofia e fibras em regeneração como efeito da exodontia e estresses, isolados ou associados. Esses fatos podem ser responsáveis pela demanda funcional alterada, uma vez que este músculo está diretamente ligado à ATM.

6.4 Alteração no metabolismo celular e na capacidade oxidativa (SDH e NADH)

Assim como no trabalho descrito por Peter *et al.* (1972) avaliando coelhos e cobaias, neste estudo, os três tipos de fibras: claras - glicolíticas, intermediárias - oxidativas glicolíticas e escuras – oxidativas mostraram-se presentes no músculo pterigoideo lateral de ratos *Wistar*.

Entretanto, a quantidade relativa de fibras oxidativas glicolíticas foi ligeiramente mais reveladas tanto pelas reações de SDH quanto de NADH.

A variabilidade na distribuição e no diâmetro dos três tipos de fibras mostra-se bastante grande no músculo pterigoideo lateral do rato, cujas características estão de acordo com aquelas encontradas por Eriksson *et al.* (1981). Segundo Kitagawa *et al.* (2004) os aspectos bioquímicos dos músculos da mastigação estão intimamente relacionados às suas características e funções específicas. É geralmente aceito que esses tipos de fibras refletem a diferenciação na transdução de energia oxidativa e glicolítica e diferenciação funcional e resistência à fadiga (Sato *et al.*, 1998).

Os resultados da atividade do SDH e NADH foram obtidos por contagem dos três tipos de fibras após as reações. NADH é uma coenzima que age como um carreador de hidrogênio e o transfere de uma molécula à outra na cadeia respiratória, no interior das mitocôndrias, sendo um componente fundamental na produção de ATP via fosforilação oxidativa (White e Schenk, 2012). Por sua vez o SDH faz parte do complexo II da cadeia respiratória na membrana interna mitocondrial atuando no transporte de elétrons durante a terceira oxidação no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), e também comanda a síntese de ATP (Rutter, Winge e Schiffman, 2010). Neste modelo, estas reações permitiram diferenciar se o metabolismo das fibras do músculo pterigoideo lateral foi oxidativo ou glicolítico dependendo da quantidade de mitocôndrias coradas.

O estresse crônico repetido na ausência da exodontia e, os estresses, agudo e crônico variado, associados à exodontia aumentaram significativamente as fibras de reatividade intermediária reveladas pela reação de NADH e tendência a esse aumento pela reação de SDH. Há relatos de que no músculo masseter a dieta com alimentos de consistência mais macia leva à adaptação das fibras tornando-as com capacidade oxidativa mais baixa e menos resistente à fadiga (Kitagawa *et al.*, 2004); e a exodontia bilateral também alteraram as fibras para o tipo IIb (glicolíticas) indicando que uma maior força mastigatória foi necessária (Miehe *et al.*, 1999).

No entanto, no músculo pterigoideo lateral, em todas as situações de estresses apresentados, associados ou não à exodontia, houve aumento das fibras oxidativas glicolíticas, que já eram predominantes, em razão da diminuição das fibras glicolíticas. Desta forma, a capacidade de sustentação do músculo pterigoideo lateral, atribuída por Easton e Carlson (1990), foi aumentada. Essa adaptação pode ser atribuída à morfologia e orientação ântero posterior desse músculo, indicando que a exodontia unilateral não diminuiu a capacidade

oxidativa, possibilitando assim a adaptação para um mecanismo protetor encontrado pelo organismo para a estabilização da ATM.

6.5 Estresse oxidativo (Produção de espécies reativas de oxigênio – ROS)

A exodontia isolada (C GE) revelou uma tendência ao aumento de ROS enquanto, no estresse agudo, isolado ou associado à exodontia, a produção de ROS não foi alterada em relação ao controle (C GSE). Segundo Gandra, De Macedo e Alves (2006), radicais livres são moléculas ou íons que contém elétrons (radical) desemparelhados com atividade oxidante. O oxigênio molecular (O_2) pode ser considerado um radical livre, o qual é usado nas mitocôndrias comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Esse O_2 pode tornar-se radical ânion superóxido (O_2^-), chamado também de ROS. A sua produção pode ocorrer em vários locais dentro da fibra muscular, como a mitocôndria, retículo sarcoplasmático, túbulo T, sarcolema e citosol (Powers *et al.*, 2010). Em circunstâncias normais, existe um delicado equilíbrio entre a produção de ROS e os agentes redutores e antioxidantes, como a glutatona, presente no citoplasma de fibras musculares esqueléticas intactas (Ji, Fu e Mitchell, 1992). Há relatos de que o aumento modesto e transitório de ROS desempenha papel importante na sinalização celular normal, enquanto o grande e prolongado aumento leva a condições patológicas (Lamb e Westerblad, 2011). Diante do exposto, é possível que as ROS produzidas pela exodontia sejam condição importante requerida para promover a adaptação do músculo pterigoideo lateral em resposta a esse fator. Além disso, o estresse agudo pode ter desencadeado resposta simpática de vasoconstrição, entretanto, a ativação do SNP, pode ter levado a vasodilatação reflexa, sobrepondo-se e mascarando o efeito do SNS (Izumi, Nakamura e Ishii, 2004), o que pode justificar os achados da produção de ROS para a o estresse agudo isolado e associado à exodontia.

De modo interessante, os estresses crônico repetido e variado, isolados ou associados à exodontia, aumentaram significativamente a produção de ROS quando comparados com o controle. Há relatos de que o estresse psicológico aumenta o estresse oxidativo no músculo masseter (Li *et al.*, 2011) e diminui a capacidade antioxidante causando danos oxidativos e alteração na função dos tecidos (Lucca *et al.*, 2009). ROS são geradas também em músculo esquelético mantido em desuso por um longo período (Kondo, Miura e Itokawa, 1991). Recentes evidências revelam que ROS contribuem para a adaptação das fibras musculares em

resposta ao aumento da atividade contrátil e ao período longo de desuso muscular (Ji, Gomez-Cabrera e Vina, 2006). Embora as informações sobre como o estado redox das fibras musculares regulem a via sinalizadora, e a expressão gênica seja uma questão incompleta, está claro que esta sinalização influencia a via ativando fatores de transcrição que alteram sua expressão e mudanças no fenótipo da fibra muscular (Torres e Forman, 2003). Além disso, ROS desempenham papel importante tanto na autofagia, em que a inanição atua como estímulo que desencadeia o aumento da produção de ROS (Scherz-Shouval *et al.*, 2007), quanto na apoptose em que atua na oxidação de proteínas e lipídeos, danos nos ácidos nucleicos e alteração funcional das organelas (Primeau, Adhihetty e Hood, 2002). ROS geradas por citocinas inflamatórias ativam a transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que diferencia, adapta e promove a morte celular (Powers, Nelson e Hudson, 2011). Assim, é possível sugerir que os estresses crônicos, repetido e variado, isolados ou associados à exodontia, produziram ROS que contribuíram para a adaptação das fibras musculares frente aos fatores de variação a que foram expostas. Vale considerar que produção prolongada e aumentada de ROS pode levar à condições patológicas, entretanto, segundo Wu *et al.* (2012) medidas que neutralizam o estresse podem evitar o desencadeamento de efeitos danosos. Nos modelos de estresse a que estes ratos foram submetidos, outros tempos e outras metodologias serão necessários para compreender se a intensidade desse estresse foi grande e prolongada o suficiente para desencadear alteração também no disco ou ATM.

6.6 Densidade capilar (α CD-31 e Laminina)

Neste modelo, os estresses isolados ou associados à exodontia, aumentaram significativamente os capilares musculares. Foi observado aumento no diâmetro dos capilares nos grupos de estresses agudo e crônico repetido, isolados ou associados à exodontia, numerosos capilares dilatados entre outros de aspecto normal em concordância com os achados de Chen *et al.* (2010). Nesses grupos, o aumento dos capilares poderia significar uma resposta compensatória à hipoxemia produzida pela contração muscular e contração adrenérgica das arteríolas musculares durante o estresse prolongado.

Há relatos de que a compressão de vasos sanguíneos causados pela contração muscular pode liberar fator miogênico local e fator vasodilatador metabólico, garantindo assim um

adequado fluxo sanguíneo no trabalho do músculo. O desequilíbrio entre essas ações, e insuficiente vasodilatação induzida pelo SNS, pode levar à isquemia (Chen *et al.*, 2010).

Em 2005, Bagi *et al.* descreveram uma molécula de adesão plaquetária de células endoteliais (PECAM-1) ou α CD-31, a qual detecta gradiente de tensão da parede vascular, cuja molécula liga-se com o óxido nítrico (NO) mediador da vasodilatação. A estimulação aumentada do SNS causada pelo estresse aumenta a tonicidade muscular por ativação da placa motora, afetando assim, a contração muscular (Grassi *et al.*, 1996). Desta forma, é possível que a contração isométrica, induzida pelos estresses, isolados ou associados à exodontia, modifique a força hemodinâmica que aumenta a tensão da parede dos vasos levando à vasodilatação de capilares no interior do músculo pterigoideo lateral.

A exodontia isolada (C GE) não alterou a quantidade de capilares em relação ao C GSE. O resultado previsto seria seu aumento, considerando a tendência ao aumento de atividade oxidativa glicolítica, no entanto, esse achado pode sugerir uma capacidade adaptativa da função deste músculo pela sua função específica.

Nos grupos Var GSE e GE o aumento de capilares também foi significativo, no entanto, capilares com lúmen reduzido constituíram uma observação qualitativa importante, além dos capilares dilatados e de aspecto normal. É conhecido que o estresse é acompanhado pela estimulação do SNS (Callister, Suwarno e Seals, 1992), cuja ação altera a contração muscular e também o fluxo sanguíneo (Janig, 1985). Hidaka, Yanagi e Takada (2004a) relataram que o estresse mental afeta a eletromiografia e a hemodinâmica do músculo masseter. Hidaka, Yanagi e Takada (2004b) descreveram que o estressor leve, mas por um longo período, aumenta a atividade do SNS que pode levar à vasodilatação dos capilares em determinados locais, devido ao aumento da tensão da parede dos vasos.

Roatta, Mohammed e Passatore (2009) mostraram que o SNS é um poderoso vasoconstritor na área facial quando coelhos foram expostos à vários estressores agudos. Devido o forte impacto do estresse mental sobre a taxa de variabilidade cardíaca quando estudada a hemodinâmica no músculo masseter, Tanosoto *et al.* (2012) sugeriram que o estresse pode alterar o equilíbrio entre a atividade simpática e parassimpática. Hidaka, Yanagi e Takada (2004a) apontam para as diferenças regionais da atividade vasoconstritora simpática, uma vez que a ativação dos receptores α_1 - e α_2 -adrenérgico causam vasoconstrição (Leech e Faber, 1996) e o receptor β_2 -adrenérgico pode causar vasodilatação (Hillman e Lundvall, 1981). Vale lembrar que se a vasoconstrição é antagonizada, por exemplo, pela PECAM-1, cuja molécula liga-se ao NO- mediador da vasodilatação em situação de gradiente de tensão aumentado da parede vascular (Bagi *et al.*, 2005) está garantido um fluxo sanguíneo

adequado ao músculo. Há relatos de que o aumento dos capilares sob as condições de estresses podem atuar mais para remover metabólitos que para distribuir suplementos (Egginton e Hudlicka, 2000). Portanto, mesmo com o aumento significativo do número de capilares, a observação qualitativa importante de capilares com lúmen reduzido somadas a de lúmen dilatado, em situação de estresses isolados ou associados à exodontia sugerem que pode haver um desequilíbrio hemodinâmico do músculo pterigoideo lateral.

Outros estudos com metodologias que permitam esclarecer com maior detalhe as condições hemodinâmicas do músculo pterigoideo lateral submetido à exodontia e estresses serão necessárias para entender melhor a relação deste músculo com a DTM.

6.7 Avaliação da sensibilidade nociceptiva ao teste de formalina orofacial

Para entender melhor a relação alteração oclusal versus dor envolvendo os músculos da mastigação, Cao *et al.* (2009) criaram um modelo experimental animal de maloclusão por meio de diferentes aumentos na dimensão vertical e avaliaram a resposta comportamental nociceptiva por meio do teste de Von Frey, que evidenciou uma relação entre a resposta ao estímulo nociceptivo e o modelo proposto. Notaram que, mesmo após a remoção da interferência oclusal, houve permanência da hiperalgesia mecânica nestes músculos, sugerindo que a alteração oclusal é diretamente relacionada à dor em musculatura mastigatória e que mecanismos de sensibilização central estão envolvidos na manutenção da hiperalgesia induzida pela maloclusão (Cao *et al.*, 2009). Um teste amplamente utilizado na literatura para avaliar a nocicepção é o teste da formalina. Este teste avalia a resposta nociceptiva em um estado de dor tônica induzida por um estímulo químico (formalina) (Barrot, 2012). Clavelou *et al.* (1989) adaptaram o modelo do teste de formalina aplicado em região plantar para um modelo que avaliasse a nocicepção orofacial em ratos e comprovou que esta é uma técnica válida para estudá-la. Gameiro *et al.* (2006) investigaram o efeito do estresse crônico na resposta nociceptiva induzida pela formalina quando aplicada diretamente na ATM de ratos e ficou evidenciado que, sob esta condição, os animais estavam hiperálgicos e que esta resposta pode ser devida a um baixo efluxo de serotonina para a amígdala e septo lateral ativadas pelo estresse (Kirby, Allen e Lucki, 1995). Como o fator psicológico tem sido associado às DTMs, Staman, Townsend e Hagan (2013) encontraram que 19% dos pacientes submetidos a extração dental reportaram dor após o procedimento.

O presente estudo mostrou que tanto o grupo Form GE quanto o Form GSE apresentaram hiperalgesia na segunda fase do teste da formalina quando comparados aos grupos Sal GE e Sal GSE. Os achados deste trabalho também evidenciaram que o grupo Form GSE apresentou nos tempos de 24-27 e 36-39 minutos um período de latência maior, sugerindo uma hiperalgesia prolongada nestes períodos. Entretanto, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avaliasse o efeito da exodontia na percepção da dor a longo prazo que permitisse comparação do seu efeito. Deste modo, sugere-se que a sensibilidade nociceptiva possa ser avaliada em um período mais precoce da extração dentária.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

1. O peso corporal total diminui nas condições de estresse crônico repetido, mas não é alterado pelos estresses agudo e crônico variado, nem pela ausência unilateral de dentes posteriores.

2. A alteração morfológica das fibras musculares está presente na situação de estresse e exodontia isolados, mas quando associados é mais severa.

3. Nos estresses agudo e crônico variado associados à exodontia, e no estresse crônico repetido sem exodontia, a capacidade oxidativa teve aumento significativo, demonstrado pelo aumento nas fibras oxidativas glicolíticas.

4. Os estresses crônicos repetido e variado, isolados ou associados à exodontia, aumentaram o estresse oxidativo no músculo pterigoideo lateral.

5a. Os estresses agudo e crônicos, repetido e variado, isolados, aumentaram a densidade capilar no músculo. Associados à exodontia, apenas os estresses crônicos repetido e variado tiveram aumento significativo.

5b. Nos estresses agudo e crônico repetido, isolados ou associados à exodontia, revelaram regiões com capilares de lúmen aumentado e outras de aspecto normal. No estresse crônico variado, isolados ou associados à exodontia, foram observadas áreas de capilares com lúmen diminuído, além de regiões semelhantes às descritas aos outros estresses.

6. Nos grupos submetidos ao teste da formalina, Form GE e Form GSE, apresentaram maior hiperalgesia comparados aos controles salina na segunda fase do teste. Em determinados momentos o grupo Form GSE apresentou-se maior hiperalgesia comparado ao grupo Form GE.

Os estresses crônicos isolados ou associados à exodontia afetam a morfologia, a capacidade oxidativa, o estresse oxidativo e a densidade capilar do músculo pterigoideo lateral esquerdo. Estes sinais demonstram a adaptação deste músculo, no período estudado, e sugerem que a persistência destes estímulos podem levar à respostas mais severas como, por exemplo, desencadear a dor miofacial associada à DTM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. **Neurol Sci**, v. 24 Suppl 2, p. S57-60, May 2003. ISSN 1590-1874 (Print) 1590-1874.

AYUB, L. G. et al. Estresse como possível fator de risco para a doença periodontal–revisão da literatura. **Revista Periodontia, Belo Horizonte**, v. 20, n. 3, p. 28-36, 2010.

BAGCHI, D. et al. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **Mol Cell Biochem**, v. 196, n. 1-2, p. 109-16, Jun 1999. ISSN 0300-8177 (Print) 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAGI, Z. et al. PECAM-1 Mediates NO-Dependent Dilation of Arterioles to High Temporal Gradients of Shear Stress. 2005-08-01 2005. Disponível em: < <http://atvb.ahajournals.org/content/25/8/1590.long> >.

BAKKE, M. et al. Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. **Gerontology**, v. 50, n. 6, p. 383-92, Nov-Dec 2004. ISSN 0304-324X (Print) 0304-324x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000080176> >.

BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of histological techniques and their diagnostic application**. Churchill Livingstone, 1994. ISBN 9780443045349. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=R0prAAAAMAAJ> >.

BANI, D.; BANI, T.; BERGAMINI, M. Morphologic and biochemical changes of the masseter muscles induced by occlusal wear: studies in a rat model. **J Dent Res**, v. 78, n. 11, p. 1735-44, Nov 1999. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345 (Linking).

BANI, D.; BERGAMINI, M. Ultrastructural abnormalities of muscle spindles in the rat masseter muscle with malocclusion-induced damage. **Histol Histopathol**, v. 17, n. 1, p. 45-54, Jan 2002. ISSN 0213-3911 (Print) 0213-3911 (Linking).

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, Jun 1 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking).

BAZAN, E. et al. Ultrastructural and biochemical changes of the medial pterygoid muscle induced by unilateral exodontia. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 536-43, Jul 2008. ISSN 0968-4328 (Print) 0968-4328.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BERTILSSON, O.; STROM, D. A literature survey of a hundred years of anatomic and functional lateral pterygoid muscle research. **J Orofac Pain**, v. 9, n. 1, p. 17-23, Winter 1995. ISSN 1064-6655 (Print) 1064-6655 (Linking).

BESSA, J. M. et al. Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e266, 2013. ISSN 2158-3188.

BHOYAR, P. S. et al. Effect of complete edentulism on masseter muscle thickness and changes after complete denture rehabilitation: an ultrasonographic study. **J Investig Clin Dent**, v. 3, n. 1, p. 45-50, Feb 2012. ISSN 2041-1618.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Brasília, DF, 2012. 116 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. **Vigitel Brasil 2012 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2012**. Brasília, DF, 2013, 136 p.

CALLISTER, R.; SUWARNO, N. O.; SEALS, D. R. Sympathetic activity is influenced by task difficulty and stress perception during mental challenge in humans. **J Physiol**, v. 454, p. 373-87, Aug 1992. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CAO, Y. et al. Experimental occlusal interference induces long-term masticatory muscle hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 144, n. 3, p. 287-93, Aug 2009. ISSN 1872-6623 (Electronic) 0304-3959 (Linking).

_____. Clinical characteristics of lateral pterygoid myospasm: a retrospective study of 18 patients. In: (Ed.). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. United States: 2012 Elsevier Inc, v.113, 2012. p.762-5. ISBN 2212-4411 (Electronic).

CARRARA, S. V.; CONTI, P. C. R.; BARBOSA, J. S. Termo do 1º Consenso em disfunção temporomandibular e dor orofacial. **Dental Press J Orthod**, v. 15, n. 3, p. 114-20, 2010.

CARVALHO, A. L.; CURY, A. A.; GARCIA, R. C. Prevalence of bruxism and emotional stress and the association between them in Brazilian police officers. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 1, p. 31-5, Jan-Mar 2008. ISSN 1807-3107 (Electronic) 1806-8324 (Linking).

CEBASEK, V. et al. Nerve injury affects the capillary supply in rat slow and fast muscles differently. **Cell Tissue Res**, v. 323, n. 2, p. 305-12, Feb 2006. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160855> >.

CHEN, Y. J. et al. Psychological stress alters ultrastructure and energy metabolism of masticatory muscle in rats. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 302693, 2010. ISSN 1110-7243. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2010/302693> >.

CHRISTENSEN, L. V.; RASSOULI, N. M. Experimental occlusal interferences. Part I. A review. **J Oral Rehabil**, v. 22, n. 7, p. 515-20, Jul 1995. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, v. 103, n. 3, p. 349-53, Sep 11 1989. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking).

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. Psychological stress and disease. **Jama**, v. 298, n. 14, p. 1685-7, Oct 10 2007. ISSN 0098-7484.

COSKUN AKAR, G.; GOVSA, F.; OZGUR, Z. Examination of the heads of the lateral pterygoid muscle on the temporomandibular joint. In: (Ed.). **J Craniofac Surg**. United States, v.20, 2009. p.219-23. ISBN 1536-3732 (Electronic) 1049-2275 (Linking).

COX, P. G.; JEFFERY, N. Reviewing the morphology of the jaw-closing musculature in squirrels, rats, and guinea pigs with contrast-enhanced microCT. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, n. 6, p. 915-28, Jun 2011. ISSN 1932-8494 (Electronic) 1932-8486 (Linking).

CUESTA, J. M.; SINGER, M. The stress response and critical illness: a review. **Crit Care Med**, v. 40, n. 12, p. 3283-9, Dec 2012. ISSN 0090-3493.

DALLMAN, M. F. et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11696-701, Sep 30 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1934666100> >.

DE SIQUEIRA, S. R.; VILELA, T. T.; FLORINDO, A. A. Prevalence of headache and orofacial pain in adults and elders in a Brazilian community: an epidemiological study. **Gerodontology**, Jun 23 2013. ISSN 0734-0664. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/ger.12063> >.

DEMIR, A. et al. The association of occlusal factors with masticatory muscle tenderness in 10- to 19-year old Turkish subjects. **Angle Orthod**, v. 75, n. 1, p. 40-6, Jan 2005. ISSN 0003-3219 (Print) 0003-3219.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 259-68, Jan 2010. ISSN 0302-766x.

EASTON, J. W.; CARLSON, D. S. Adaptation of the lateral pterygoid and superficial masseter muscles to mandibular protrusion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 97, n. 2, p. 149-58, Feb 1990. ISSN 0889-5406 (Print) 0889-5406 (Linking).

EGGINTON, S.; HUDLICKA, O. Selective long-term electrical stimulation of fast glycolytic fibres increases capillary supply but not oxidative enzyme activity in rat skeletal muscles. **Exp Physiol**, v. 85, n. 5, p. 567-73, Sep 2000. ISSN 0958-0670 (Print)0958-0670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ERIKSSON, P. O. et al. Special histochemical muscle-fibre characteristics of the human lateral pterygoid muscle. **Arch Oral Biol**, v. 26, n. 6, p. 495-507, 1981. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERRETTI, C. et al. Biochemical and behaviour changes induced by acute stress in a chronic variate stress model of depression: the effect of amitriptyline. **Eur J Pharmacol**, v. 280, n. 1, p. 19-26, Jun 23 1995. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking).

GAMARO, G. D. et al. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. **Physiol Behav**, v. 63, n. 4, p. 693-7, Feb 15 1998. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).

GAMEIRO, G. H. et al. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiol Behav**, v. 87, n. 4, p. 643-9, Apr 15 2006. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).

GANDRA, P. G.; DE MACEDO, D. V.; ALVES, A. A. Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício. **Revista de Ensino de Bioquímica**, v. 4, n. 2, p. 23-33, 2006. ISSN 2318-8790.

GATCHEL, R. J. et al. Major psychological disorders in acute and chronic TMD: an initial examination. **J Am Dent Assoc**, v. 127, n. 9, p. 1365-70, 1372, 1374, Sep 1996. ISSN 0002-8177 (Print) 0002-8177 (Linking).

GHALY, M.; TEPLITZ, D. The biologic effects of grounding the human body during sleep as measured by cortisol levels and subjective reporting of sleep, pain, and stress. **J Altern Complement Med**, v. 10, n. 5, p. 767-76, Oct 2004. ISSN 1075-5535 (Print) 1075-5535.

GLAROS, A. G.; WILLIAMS, K.; LAUSTEN, L. The role of parafunctions, emotions and stress in predicting facial pain. **J Am Dent Assoc**, v. 136, n. 4, p. 451-8, Apr 2005. ISSN 0002-8177 (Print) 0002-8177 (Linking).

GRASSI, C. et al. Sympathetic control of skeletal muscle function: possible co-operation between noradrenaline and neuropeptide Y in rabbit jaw muscles. **Neurosci Lett**, v. 212, n. 3, p. 204-8, Jul 19 1996. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GRICHNIK, K. P.; FERRANTE, F. M. The difference between acute and chronic pain. **Mt Sinai J Med**, v. 58, n. 3, p. 217-20, May 1991. ISSN 0027-2507 (Print) 0027-2507.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton E Hall: Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier Brasil, 2011. 1216 ISBN 8535254781, 9788535254785.

HAO, L. et al. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 4, p. 819-25, Apr 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424353> >.

HASKIN, C. L.; MILAM, S. B.; CAMERON, I. L. Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 248-77, 1995. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411.

HIDAKA, O.; YANAGI, M.; TAKADA, K. Changes in masseteric hemodynamics time-related to mental stress. **J Dent Res**, v. 83, n. 2, p. 185-90, Feb 2004a. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Mental stress-induced physiological changes in the human masseter muscle. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 227-31, Mar 2004b. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345 (Linking).

HILLMAN, J.; LUNDVALL, J. Classification of beta-adrenoceptors in the microcirculation of skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v. 113, n. 1, p. 67-71, Sep 1981. ISSN 0001-6772 (Print)0001-6772. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1981.tb06863.x> >.

HJOLLUND, N. H.; ANDERSEN, J. H.; BECH, P. Assessment of fatigue in chronic disease: a bibliographic study of fatigue measurement scales. **Health Qual Life Outcomes**, v. 5, p. 12, 2007. ISSN 1477-7525.

HUANG, F. et al. Psychological stress induces temporary masticatory muscle mechanical sensitivity in rats. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 720603, 2011. ISSN 1110-7243.

HUANG, G. J. et al. Risk factors for diagnostic subgroups of painful temporomandibular disorders (TMD). **J Dent Res**, v. 81, n. 4, p. 284-8, Apr 2002. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

HUGOSON, A.; LJUNGQUIST, B.; BREIVIK, T. The relationship of some negative events and psychological factors to periodontal disease in an adult Swedish population 50 to 80 years of age. **J Clin Periodontol**, v. 29, n. 3, p. 247-53, Mar 2002. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

IMAUCHI, Y.; SAKAMOTO, T.; ABE, K. A case of atrophy of the masticatory muscles due to a masticatory habit. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 259, n. 10, p. 551-3, Nov 2002. ISSN 0937-4477 (Print)0937-4477. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-002-0499-1> >.

IMBE, H.; IWAI-LIAO, Y.; SENBA, E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. **Front Biosci**, v. 11, p. 2179-92, 2006. ISSN 1093-4715 (Electronic) 1093-4715 (Linking).

IYOMASA, M. M. et al. Ultrastructural characteristics of the gerbil pterygoid medial muscle after experimental occlusal alteration. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 206-11, Feb 2009. ISSN 0968-4328 (Print) 0968-4328 (Linking).

IZGUT-UYSAL, V. N. et al. Effect of chronic stress and L-carnitine on rat stomach. **J Physiol Sci**, v. 57, n. 3, p. 187-92, Jun 2007. ISSN 1880-6546 (Print) 1880-6546.

IZUMI, H.; NAKAMURA, I.; ISHII, H. Suppression of inferior alveolar nerve-induced vasoconstrictor response by ongoing cervical sympathetic nerve activity in cat. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 12, p. 1035-41, Dec 2004. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.07.008> >.

JANIG, W. Organization of the lumbar sympathetic outflow to skeletal muscle and skin of the cat hindlimb and tail. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 102, p. 119-213, 1985. ISSN 0303-4240 (Print) 0303-4240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JEONG, J. Y.; LEE, D. H.; KANG, S. S. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v. 28, n. 4, p. 288-96, Dec 2013. ISSN 2093-596X (Print) 2093-596x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2013.28.4.288> >.

JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **J Appl Physiol (1985)**, v. 73, n. 5, p. 1854-9, Nov 1992. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JI, L. L.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; VINA, J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1067, p. 425-35, May 2006. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1354.061> >.

JONES, D. A.; ROLLMAN, G. B.; BROOKE, R. I. The cortisol response to psychological stress in temporomandibular dysfunction. **Pain**, v. 72, n. 1-2, p. 171-82, Aug 1997. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking).

KALIL, B. et al. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. **Stress**, v. 16, n. 4, p. 452-60, Jul 2013. ISSN 1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2013.777832> >.

KASAI, K. et al. Relationship between attachment of the superficial masseter muscle and craniofacial morphology in dentate and edentulous humans. **J Dent Res**, v. 73, n. 6, p. 1142-9, Jun 1994. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

KAWAKAMI, S. et al. Mechanomyographic activity in the human lateral pterygoid muscle during mandibular movement. **J Neurosci Methods**, v. 203, n. 1, p. 157-62, Jan 15 2012. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.09.026> >.

KIRBY, L. G.; ALLEN, A. R.; LUCKI, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. **Brain Res**, v. 682, n. 1-2, p. 189-96, Jun 5 1995. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking).

KITAGAWA, Y. et al. Alterations in enzyme histochemical characteristics of the masseter muscle caused by long-term soft diet in growing rabbits. **Oral Dis**, v. 10, n. 5, p. 271-6, Sep 2004. ISSN 1354-523X (Print) 1354-523x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01020.x> >.

KLAUMANN, P.; WOUK, A.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR (Pathophysiology of pain). **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KONDO, H.; MIURA, M.; ITOKAWA, Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **Acta Physiol Scand**, v. 142, n. 4, p. 527-8, Aug 1991. ISSN 0001-6772 (Print) 0001-6772. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1991.tb09191.x> >.

LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 9, p. 2119-27, May 1 2011. ISSN 1469-7793 (Electronic) 0022-3751 (Linking).

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 597-652, Dec 2001. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking).

LEECH, C. J.; FABER, J. E. Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. **Am J Physiol**, v. 270, n. 2 Pt 2, p. H710-22, Feb 1996. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEEuw, R. **Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento**. 4ª ed. São Paulo: Quintessence, 2010.

LEITE, F.; DE OLIVEIRA GOMES, J. Dor crônica em um ambulatório universitário de fisioterapia. **Revista de Ciências Médicas**, v. 15, n. 3, 2012. ISSN 2318-0897.

LENZE, E. J. et al. The association of late-life depression and anxiety with physical disability: a review of the literature and prospectus for future research. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 9, n. 2, p. 113-35, Spring 2001. ISSN 1064-7481 (Print) 1064-7481.

LI, Q. et al. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. **Physiol Behav**, v. 104, n. 3, p. 365-72, Sep 1 2011. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.012> >.

LIU, D. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264c, p. 9-16, Feb 4 2014. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.039> >.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008. ISSN 0304-3959.

LUCCA, G. et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 54, n. 5-6, p. 358-62, May-Jun 2009. ISSN 0197-0186. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.001>>.

MACHADO, A. B. M.; CAMPOS, G. B. **Neuroanatomia funcional**. Atheneu São Paulo, 1993.

MADEIRA, M. C. **Anatomia da face: Bases anatomofuncionais para a prática odontológica**. 8. Brasil: Sarvier, 2012. 244 ISBN 9788573782349.

MAGNUSSON, C.; NILSSON, M.; MAGNUSSON, T. Degenerative changes in human temporomandibular joints in relation to occlusal support. **Acta Odontol Scand**, v. 68, n. 5, p. 305-11, Sep 2010. ISSN 0001-6357.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: Ed UERJ, 1995. 131.

MARCHAND, W. R. Mindfulness-based stress reduction, mindfulness-based cognitive therapy, and Zen meditation for depression, anxiety, pain, and psychological distress. **J Psychiatr Pract**, v. 18, n. 4, p. 233-52, Jul 2012. ISSN 1527-4160.

MATSUNAGA, K. et al. An anatomical study of the muscles that attach to the articular disc of the temporomandibular joint. **Clin Anat**, v. 22, n. 8, p. 932-40, Nov 2009. ISSN 0897-3806.

MAZZA, D. et al. Anatomic examination of the upper head of the lateral pterygoid muscle using magnetic resonance imaging and clinical data. In: (Ed.). **J Craniofac Surg**. United States, v.20, 2009. p.1508-11. ISBN 1536-3732 (Electronic) 1049-2275 (Linking).

MIEHE, B. et al. Masticatory musculature under altered occlusal relationships--a model study with experimental animals. **Ann Anat**, v. 181, n. 1, p. 37-40, Jan 1999. ISSN 0940-9602 (Print) 0940-9602 (Linking).

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 4, p. 283-94, Apr 2009. ISSN 1471-003x.

NAKAYA, N. et al. The association between self-reported history of physical diseases and psychological distress in a community-dwelling Japanese population: the Ohsaki Cohort 2006 Study. **Eur J Public Health**, v. 24, n. 1, p. 45-9, Feb 2014. ISSN 1101-1262.

NISHIDE, N. et al. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. **J Oral Rehabil**, v. 28, n. 3, p. 294-8, Mar 2001. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

PETER, J. B. et al. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and. **Biochemistry**, v. 11, n. 14, p. 2627-33, Jul 4 1972. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

POWERS, S. K. et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol**, v. 95, n. 1, p. 1-9, Jan 2010. ISSN 1469-445X (Electronic) 0958-0670 (Linking).

POWERS, S. K.; NELSON, W. B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 942-50, Sep 1 2011. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009> >.

PRIMEAU, A. J.; ADHIHETTY, P. J.; HOOD, D. A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. **Can J Appl Physiol**, v. 27, n. 4, p. 349-95, Aug 2002. ISSN 1066-7814 (Print) 1066-7814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAO, S. M.; GLAROS, A. G. Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals. **J Dent Res**, v. 58, n. 9, p. 1872-8, Sep 1979. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345 (Linking).

REINHARDT, R. et al. The unilateral chewing phenomenon, occlusion, and TMD. **Cranio**, v. 24, n. 3, p. 166-70, Jul 2006. ISSN 0886-9634 (Print) 0886-9634 (Linking).

RIVAT, C. et al. Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. **Pain**, v. 150, n. 2, p. 358-68, Aug 2010. ISSN 1872-6623 (Electronic) 0304-3959 (Linking).

ROATTA, S.; MOHAMMED, M.; PASSATORE, M. Acute stress reduces blood flow in the orofacial area, in conscious rabbits. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 4, p. 380-8, Apr 2009. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.01.003> >.

ROBERTS, C. J.; CAMPBELL, I. C.; TROOP, N. Increases in weight during chronic stress are partially associated with a switch in food choice towards increased carbohydrate and saturated fat intake. **Eur Eat Disord Rev**, v. 22, n. 1, p. 77-82, Jan 2014. ISSN 1072-4133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/erv.2264> >.

ROSALES, V. P. et al. Emotional stress and brux-like activity of the masseter muscle in rats. **Eur J Orthod**, v. 24, n. 1, p. 107-17, Feb 2002. ISSN 0141-5387 (Print) 0141-5387.

RUTTER, J.; WINGE, D. R.; SCHIFFMAN, J. D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 393-401, Jun 2010. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001> >.

SATO, I. et al. Developmental changes in enzyme activities and in structural features of rat masticatory muscle mitochondria. **J Dent Res**, v. 77, n. 11, p. 1926-30, Nov 1998. ISSN 0022-0345 (Print)

0022-0345 (Linking).

SCHERZ-SHOUVAL, R. et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **Embo j**, v. 26, n. 7, p. 1749-60, Apr 4 2007. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623> >.

SCHMIDT, J. E.; CARLSON, C. R. A controlled comparison of emotional reactivity and physiological response in masticatory muscle pain patients. **J Orofac Pain**, v. 23, n. 3, p. 230-42, Summer 2009. ISSN 1064-6655 (Print)1064-6655. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 10, n. 2, p. 230-1, Spring 1998. ISSN 0895-0172 (Print) 0895-0172.

SIMONIC-KOCIJAN, S. et al. Influence of chronic stress and oclusal interference on masseter muscle pain in rat. **Coll Antropol**, v. 33, n. 3, p. 863-6, Sep 2009. ISSN 0350-6134 (Print) 0350-6134 (Linking).

STAMAN, N. M.; TOWNSEND, J. A.; HAGAN, J. L. Observational study: discomfort following dental procedures for children. **Pediatr Dent**, v. 35, n. 1, p. 52-4, Jan-Feb 2013. ISSN 0164-1263. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STARR, J. M.; HALL, R. Predictors and correlates of edentulism in healthy older people. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 19-23, Jan 2010. ISSN 1363-1950.

TANOSOTO, T. et al. A Paced Auditory Serial Addition Task evokes stress and differential effects on masseter-muscle activity and haemodynamics. **Eur J Oral Sci**, v. 120, n. 4, p. 363-7, Aug 2012. ISSN 0909-8836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00973.x> >.

TORRES, M.; FORMAN, H. J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors**, v. 17, n. 1-4, p. 287-96, 2003. ISSN 0951-6433 (Print)0951-6433. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 339-52, Oct 2004. ISSN 0948-6143 (Print)0948-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7> >.

TSAI, C. M. et al. Human masticatory muscle activity and jaw position under experimental stress. **J Oral Rehabil**, v. 29, n. 1, p. 44-51, Jan 2002. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

UHAC, I. et al. The influence of war stress on the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders. **J Oral Rehabil**, v. 30, n. 2, p. 211-7, Feb 2003. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-003x.

VAN HOUDENHOVE, B.; LUYTEN, P. Stress, depression and fibromyalgia. **Acta Neurol Belg**, v. 106, n. 4, p. 149-56, Dec 2006. ISSN 0300-9009 (Print)0300-9009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN SELMS, M. K. et al. Myofascial temporomandibular disorder pain, parafunctions and psychological stress. **J Oral Rehabil**, v. 35, n. 1, p. 45-52, Jan 2008. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

VEDHARA, K. et al. An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. **Biol Psychol**, v. 62, n. 2, p. 89-96, Feb 2003. ISSN 0301-0511 (Print) 0301-0511.

VEDOLIN, G. M. et al. The impact of stress and anxiety on the pressure pain threshold of myofascial pain patients. **J Oral Rehabil**, v. 36, n. 5, p. 313-21, May 2009. ISSN 1365-2842 (Electronic) 0305-182X (Linking).

VEINALDE, R. et al. Ex vivo cytokine production in peripheral blood mononuclear cells after their stimulation with dsRNA of natural origin. **Biotechnol Appl Biochem**, Aug 13 2013. ISSN 0885-4513.

VIEL, E. C. et al. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 1, p. H281-8, 2008. ISSN 0363-6135.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **Br J Anaesth**, v. 105 Suppl 1, p. i69-85, Dec 2010. ISSN 0007-0912.

WHITE, A. T.; SCHENK, S. NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 3, p. E308-21, Aug 1 2012. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00054.2012> >.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, Dec 1997. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking).

WU, G. et al. Psychological stress may contribute to temporomandibular joint disorder in rats. **J Surg Res**, v. 183, n. 1, p. 223-9, Jul 2013. ISSN 0022-4804.

_____. The influence of psychological stress on the rat temporomandibular joint with the application of countermeasures. **J Surg Res**, v. 178, n. 2, p. 728-36, Dec 2012. ISSN 1095-8673 (Electronic) 0022-4804 (Linking).