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

RODRIGO ALBERTO RESTREPO FERNÁNDEZ

**Efeitos do estresse sistêmico no músculo pterigóideo medial de ratos com e
sem alteração oclusal**

**Ribeirão Preto
2013**

RODRIGO ALBERTO RESTREPO FERNÁNDEZ

Efeitos do estresse sistêmico no músculo pterigóideo medial de ratos com e sem alteração oclusal

Dissertação apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral. Versão corrigida; a versão original encontra-se disponível na FORP-USP.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa.

**Ribeirão Preto
2013**

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.

Fernández, Rodrigo Alberto Restrepo

Efeitos do estresse sistêmico no músculo pterigoideo medial de ratos com e sem alteração oclusal. Ribeirão Preto, 2013.

97 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral. Versão corrigida; a versão original encontra-se disponível na FORP-USP.

Orientador: Iyomasa, Mamie Mizusaki.

1. Estresse. 2. Músculo. 3. Maloclusão. 4. Metabolismo. 5. DTM

Nome: FERNÁNDEZ, Rodrigo Alberto Restrepo

Título: Efeitos do estresse sistêmico no músculo pterigóideo medial de ratos com e sem alteração oclusal.

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: _____

Aos meus pais, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, a saúde e a fortaleza.

À minha orientadora, Profa Dra Mamie Mizusaki Iyomasa, por todo o amor, dedicação, conhecimento, paciência e apoio.

À minha família que sempre é um estímulo, um apoio e uma fonte de inspiração na minha formação.

À Gloria Estela Pelaez Sierra, porque tem sido parte fundamental no meu processo de crescimento pessoal e profissional.

À Melina Amaya Paniagua e Oscar Daniel Silva Restrepo, que ainda na distancia me deram muitas alegrias no tempo do mestrado.

À Profa Dra Marcela Echeverry e o Prof Dr João Paulo Mardegan Issa por ter sido a ponte pela qual cheguei à USP.

À Faculdade de Odontologia de Riberão Preto, seu corpo docente, seu pessoal administrativo e não docente, por ter me acolhido e ajudado.

À Yamba Carla Lara Pereira, pelo apoio dentro e fora da universidade; também por seu conhecimento, paciência e carinho.

À Ricardo Alexandre Junqueira Calzzani e Daniela Mizusaki Iyomasa por serem amigos e irmãos do mestrado que com conhecimento e bons momentos acompanharam todo o processo.

À Bruna Kotake, Eduardo Borie, Bruno Mello, Miliane Gonçalves, Fernando José Dias, Bruna Moreira, Nilce Volga e outros tantos amigos que compartilharam comigo no tempo do mestrado.

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

FERNÁNDEZ, R. A. R. **Efeito do estresse sistêmico no músculo pterigóideo medial de ratos com e sem alteração oclusal.** 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O estresse emocional é um fenômeno de alta incidência na sociedade globalizada que tem sido relacionado como possível fator etiológico de muitas doenças. O efeito da atividade adrenérgica no aumento do tônus dos músculos esqueléticos durante os episódios de estresse crônico sugere a ocorrência de outras alterações estruturais e funcionais do sistema estomatognático, mas o mecanismo pelo qual os fatores emocionais podem causar disfunção muscular não está bem esclarecido. A maloclusão por perda dental também promove alterações musculares que associadas aos efeitos do estresse podem ter grande impacto na etiologia e desenvolvimento da dor e disfunção orofacial. Estresse e hipofunção mastigatória são fatores relacionados com a aparição dos distúrbios temporomandibulares (DTM) e não têm sido avaliados no músculo pterigóideo medial. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do estresse agudo e crônico no músculo pterigóideo medial, de animais submetidos ou não à exodontia unilateral, por meio de análises morfológicas e fisiológicas. Quarenta ratos machos *Wistar* (♂-200g), adultos jovens, foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Maloclusão (M=20): induzida pela exodontia unilateral dos molares superiores esquerdos e Grupo Sem Maloclusão (S=20): ratos sem exodontia. Cada grupo (n=20) foi subdividido em quatro subgrupos (n=5): controle (GC); estresse agudo (GA); estresse crônico repetido (GR) e estresse crônico variado (GV). Os protocolos de estresse foram realizados a partir do 14º dia após a exodontia. Estresse por restrição física foi usado no GA (2 horas, 23º dia) e no GR (14º a 23º dia); cinco metodologias diferentes foram submetidas ao GV (14º a 23º dia). Eutanásia e coleta de amostras foram realizadas no 23º dia. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Corticosterona plasmática, peso, morfologia celular por meio de Hematoxilina eosina (HE), atividade metabólica e capacidade oxidativa do músculo por histoquímica para succinato desidrogenase (SDH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e densidade capilar por imunoistoquímica para as proteínas alfa CD-31 e laminina. Observada a normalidade dos dados, foi realizado o teste ANOVA fatorial, com fatores de variação fixos seguida pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). O estresse e a maloclusão isolados ou associados produziram alterações morfológicas e fisiológicas no músculo pterigóideo medial ipsilateral à exodontia; distúrbio das fibras musculares e núcleos de localização central foram induzidos por ambos os fatores; aumento do metabolismo oxidativo foi observado com o estresse e o efeito antagônico com a maloclusão; o estresse aumentou a densidade capilar do músculo e uma tendência ao maior estresse oxidativo foi observada. A associação de estresse crônico e maloclusão aumentaram o metabolismo glicolítico. Conclui-se que o estresse sistêmico crônico tem efeitos morfológicos e fisiológicos no músculo pterigóideo medial e quando associado à hipofunção mastigatória pode ser fator na etiopatogenia das DTM.

Palavras Chave: Estresse, Músculo, Maloclusão, Metabolismo, DTM.

ABSTRACT

FERNÁNDEZ, R. A. R. **Effect of the systemic stress in medial pterygoid muscle of rats with or without occlusal alteration.** 2013. 97 p. Dissertation (Master degree) – Faculty of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2013.

Emotional stress is a phenomenon of high incidence at globalized society that has been linked as a possible etiologic factor for many diseases. The effect of adrenergic activity in increased tone of skeletal muscles during episodes of chronic stress suggests the occurrence of others structurals and functionals alterations in the stomatognathic system, but the mechanism by which emotional factors can cause muscle dysfunction is not well understood. The malocclusion by tooth loss also promotes muscle changes that associated with the effects of stress can have a big impact on the etiology and development of orofacial pain and dysfunction. Stress and masticatory hypofunction are factors related to the appearance of temporomandibular disorders (TMD) and have not been evaluated in the medial pterygoid muscle. The aim of this work was to investigate the effects of acute and chronic stress on the medial pterygoid muscle of animals subjected or not to unilateral extraction, through morphological and physiological analyse. Forty male Wistar rats (♂-200g), young adults were randomly divided into two groups: Malocclusion group (M = 20) induced by unilateral upper left molar extraction and Not Malocclusion Group No (S = 20): rats without extractions. Each group (n = 20) was subdivided into four subgroups (n = 5): control group (CG), acute stress (GA), repeated chronic stress (GR) and varied chronic stress (GV). Stress protocols were performed from 14th day after the extraction. Stress by physical restriction was used in GA (two hours, day 23th) and GR (day 14th to 23th); GV was subjected to five different methodologies (day 14th to 23th). Euthanasia and collection of samples were performed on day 23th. It was evaluated: cell morphology by hematoxylin eosin (HE), metabolic activity and muscle oxidative capacity by staining for succinate dehydrogenase (SDH) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), production of reactive oxygen species (ROS) and capillary density of muscle by immunohistochemistry for proteins alpha CD-31 and Laminin. Normal distribution of data was observed. A factorial ANOVA test with fixed factors of variation was performed and then Tukey-Kramer test (p <0.05). Stress and malocclusion, isolated or associated, induced morphological and physiological changes in the left medial pterygoid muscle; dimorphism of muscle fibers and nuclei of central localization were induced by both factors; increased oxidative metabolism was observed with stress and antagonistic effect with malocclusion; stress increased muscle capillary density and a tendency to oxidative stress increased was observed. The association of chronic stress and malocclusion had increased the glycolytic metabolism. It was concluded that systemic chronic stress has physiological and morphological effects in the medial pterygoid muscle and associated with masticatory hypofunction, could be a possible cause for the development of TMD.

Key words: Stress, Muscle, Malocclusion, Metabolism, TMD.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Músculo Pterigóideo Medial	16
2.2 Fisiologia do Estresse e sua relação com as Desordens Temporomandibulares (DTM)	17
2.3 Exodontia e alteração dos músculos mastigatórios	23
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODO	28
4.1 Animais	29
4.2 Indução da alteração oclusal	30
4.3 Realização dos protocolos de estresse	30
4.3.1 Protocolo de Estresse Crônico Repetido (GCR)	30
4.3.2 Protocolo de Estresse Crônico Variado (GCV)	31
4.3.3 Protocolo de Estresse Agudo (GA)	31
4.4 Controle do peso	31
4.4 Obtenção das amostras para cortes congelados	32
4.6 Processamento das amostras	32
4.6.1 Técnica para dosagem de Corticosterona	32
4.6.2 Técnica de coloração com hematoxilina e eosina – Microscopia de luz	33
4.6.3 Técnica histoquímica para demonstração da enzima succinato desidrogenase (SDH)	33
4.6.4 Técnica histoquímica para demonstração da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH)	34
4.6.5 Técnica histoquímica para espécies reativas de oxigênio (ROS)	34
4.6.6 Técnica imunoistoquímica para detecção de capilares	34
4.7 Análise Estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Teste de Corticosterona	37
5.2 Peso dos animais	37
5.3 Hematoxilina eosina – Análise morfológica	39
5.3.1 Grupo controle sem maloclusão (GCS)	39
5.3.2 Grupo controle com maloclusão (GCM)	39
5.3.3 Grupos com associação entre estresse e exodontia (GAM, GRM, GVM)	39
5.3.4 Grupos estressados sem exodontia (GAS, GRS, GVS)	40
5.4.1 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse agudo	42
5.4.2 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse crônico repetido	42
5.4.3 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse crônico variado	46
5.4.4 Efeitos do estresse na atividade da succinato desidrogenase em sujeitos com dentição completa	46
5.4.5 Efeitos da associação entre o estresse e a exodontia na atividade da succinato desidrogenase	46
5.5 Histoquímica para nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) – Demonstração das enzimas oxidativas	50
5.5.1 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse agudo	50
5.5.2 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse crônico repetido	50

5.5.3 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse crônico variado	54
5.5.4 Efeitos do estresse na atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em sujeitos com dentição completa	54
5.5.5 Efeitos da associação entre o estresse e a exodontia na atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo	54
5.6 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) - Estresse Oxidativo	58
5.7 Imunoistoquímica para detecção de capilares	58
5.7.1 Alfa CD-31	58
5.7.2 Laminina	58
6 DISCUSSÃO	64
6.1 Níveis de corticosterona plasmática.....	65
6.2 Variação do peso no período experimental	66
6.3 Alterações da morfologia celular (HE).....	66
6.4 Metabolismo celular-Capacidade oxidativa (SDH-NADH).....	67
6.5 Estresse Oxidativo (Produção de espécies reativas de oxigênio-ROS).....	72
6.6 Densidade Capilar (Alfa CD-31 e Laminina).....	72
7 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

O estresse crônico e a perda dental são condições de alta incidência na população geral. Em condições normais o estresse constitui uma complexa resposta orgânica de alarme que prepara o corpo para a fuga diante de situações ameaçadoras, mas os eventos fisiológicos relacionados com o estresse crônico são nocivos. Na atualidade o estresse é considerado um fator na etiologia de doenças neurológicas (PACÁK; PALKOVITS, 2001), cardiovasculares e metabólicas (BOVE et al, 2010); durante a exposição prolongada ao estresse a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) altera a função endócrina e por ação principalmente da adrenalina altera a função de múltiplos sistemas e órgãos (GOMEZ et al, 1996; JOSKO, 1996).

Estudos têm revelado que o estado emocional pode afetar a função oral em animais (ANTONOVA, 2008) bem como em seres humanos (CARVALHO et al, 2008). No sistema estomatognático o estresse crônico está relacionado com a etiologia e patogênese da dor orofacial e especificamente das desordens temporomandibulares (DTM) (DELCANHO, 1995; WODA; PIONCHON, 2000), mas os mecanismos fisiopatológicos ainda não são bem entendidos. Fatores emocionais também têm sido ligados com a origem das cefaleias tensionais (DELEEuw et al, 2005; DRUMMOND, 2006) e com paralisia facial (MURAKAWA et al, 1995). Estressores severos relacionados às guerras e conflitos armados (UHAC et al, 2003) ou leves como a realização de exercícios mentais simples (RAO; GLAROS, 1979; TSAI et al, 2002), podem aumentar a atividade da musculatura mastigatória (GLAROS et al, 2005), produzir fadiga e espasmo muscular e desencadear DTM (LASKIN, 1969).

O aumento da mioeletricidade durante o estresse provoca hiperatividade muscular (FLOR et al, 1991; SITTHISOMWONG et al, 2000) e incrementa significativamente a atividade eletromiográfica (EMG) dos músculos mastigatórios (ROSALES et al, 2002; RUF et al., 1997; TSAI et al, 2002). A redução desta hiperatividade com medicamentos ansiolíticos indica que o estresse afeta o sistema dopaminérgico (ROSALES et al, 2002) e tem um papel especial no desenvolvimento de hábitos orais como o bruxismo em humanos (PIERCE et al, 1995; VANDERAS et al, 1999) e animais (BYRD, 1997).

Pacientes com DTM têm perfis psicológicos semelhantes (SUVINEN et al, 2005) e relatam dores músculo esqueléticas crônicas que mudam dependendo do tipo de estresse (VAN SELMS et al, 2008). O estresse e o ambiente social promovem ativação dos músculos mandibulares em pacientes com sintomatologia dolorosa (SCHMIDT; CARLSON, 2009). Segundo Schweinhardt et al (2008) o estresse afeta os circuitos cerebrais moduladores da dor; as desordens funcionais dos músculos mastigatórios estão caracterizadas pela sensibilidade

dolorosa à palpação muscular e desconforto da musculatura ao despertar (CARVALHO et al, 2008). A etiologia da dor crônica está relacionada com a hipoperfusão (ROATTA et al, 2009) e a hipersensibilidade mecânica induzida pelo estresse (HUANG et al, 2011). A dor induzida ou espontânea é uma experiência frequente na população que tem profundos efeitos sociais e um impacto adverso na qualidade de vida (DE ROSSI, 2013). O atual tratamento multidisciplinar destes pacientes, muitas vezes não tem sucesso.

Alterações no estado oclusal também têm sido relacionadas com o desenvolvimento das DTM (KIRVESKARI; JÄMSÄ, 2009), mas a relação de causalidade não tem sido comprovada. Os músculos da mastigação têm sido analisados em relação ao aumento (KAWASAKI et al, 1997) ou diminuição da dimensão vertical (MIEHE et al, 1999), após a exodontia unilateral (MAEDA et al, 1990), (BAZAN et al, 2008), (IYOMASA et al, 2008b; IYOMASA et al, 2009b), após o desgaste oclusal unilateral (BANI et al, 1999; BANI; BERGAMINI, 2002) e posterior ao tratamento com a placa oclusal unilateral (MULLER et al, 2000). Dos músculos mandibulares os mais afetados pelo estresse são os elevadores (BAKKE et al, 2004). A maior parte das pesquisas foi realizada no músculo masseter, com o intuito de correlacionar os fatores etiológicos das DTM e compreender os mecanismos pelos quais os músculos se adaptam às novas condições.

Estresse e alteração oclusal são fatores que isoladamente perturbam o sistema neuromuscular. Resultados afirmam que o estresse nos músculos mastigatórios é acompanhado de modificações regionais da morfologia (CVETKO; ERZEN, 2001), alterações fisiológicas e hemodinâmicas (HIDAKA et al, 2004b), aumento do metabolismo anaeróbico e dano oxidativo por hipóxia ou isquemia dos músculos (CHEN et al, 2010). A alteração oclusal com hipofunção mastigatória também tem efeitos morfológicos e fisiológicos nos músculos mastigatórios que podem ser compatíveis com DTM. Análises ultraestruturais revelam que a maloclusão induzida por desgaste unilateral das cúspides de molares alteram a morfologia das mitocôndrias do músculo pterigóideo medial (BANI et al, 1999; BANI; BERGAMINI, 2002), assim como a exodontia unilateral (IYOMASA et al, 2009b), e que a área de secção transversal da mitocôndria aumenta quando muda o hábito alimentar de amamentação para mastigação (SATO et al, 1998), indicando aumento da atividade enzimática mitocondrial.

Estudos sobre músculos mastigatórios de indivíduos com alteração oclusal associada ao estresse emocional ainda são poucos na literatura (CARVALHO et al, 2008). O músculo pterigóideo medial é um elevador mandibular de grande importância na função mastigatória (HANNAM; WOOD, 1981) e nunca foi estudado em condições de estresse e exodontia. A

hipótese deste estudo é que a presença do estresse crônico em indivíduos com e sem exodontia unilateral tem efeitos na morfologia e fisiologia do músculo pterigóideo medial ipsilateral à hipofunção mastigatória, sendo os efeitos mais pronunciados na associação dos dois fatores, e em sujeitos com tolerância fisiológica diminuída podem aumentar o risco de desenvolvimento de DTM.

O conhecimento novo derivado deste trabalho sobre os fatores envolvidos na etiologia e patogenia das DTM constitui uma ferramenta para o diagnóstico e tratamento dos pacientes com síndromes de dor muscular crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo Pterigóideo Medial

O músculo pterigóideo medial faz parte do grupo dos músculos da mastigação, ao qual também pertencem os músculos masseter, temporal e pterigóideo lateral. Este grupo muscular compartilha características comuns: sua origem embriológica deriva do primeiro arco faríngeo, recebem inervação do ramo motor mandibular do nervo trigêmeo e sua função principal consiste em movimentar a mandíbula nos três planos do espaço.

Embora o músculo pterigóideo medial tenha quase a mesma função do masseter, possui qualidades morfológicas próprias que fazem dele um músculo bastante complexo (HSU et al, 2001; MATSUMOTO, 1987). Tem forma quadrilateral e está localizado na superfície medial do ramo da mandíbula. Está composto por dois feixes, superficial e profundo; o feixe superficial (lateral) tem sua origem na apófise piramidal do osso palatino e na tuberosidade da maxila; o feixe profundo (medial) se origina no lado medial da lâmina pterigóidea lateral; ambos os feixes têm sua inserção na tuberosidade pterigóidea, no lado medial do ângulo mandibular (BAVERSTOCK et al, 2013; COX; JEFFERY, 2011; PARKER, 1983). Seu mecanismo de ação é uma combinação de elevação, protração, translação medial e rotação mandibular (CHEN; HERRING, 1986; HERRING, 2007). A contração muscular bilateral protrui a mandíbula e abaixa o mento, enquanto a contração unilateral contribui ao movimento de lateralidade. Este músculo é um potente elevador mandibular durante a mastigação, providencia grande parte da força da mordida (HANNAM; WOOD, 1981) e segundo Parker (1983) tem vários componentes vetoriais.

Na atualidade é escassa a literatura sobre as características morfológicas ultraestruturais do músculo pterigóideo medial em condições de normalidade ou de patologia. Vignon et al (1980) encontraram no músculo pterigóideo medial humano fibras com diâmetro variável entre 10 a 70 μm , sendo 56% de tipo II, 37% do tipo I e 7% de fibras intermediárias.

Apesar de sua importância nas funções do sistema estomatognático o músculo pterigóideo medial tem sido pouco estudado em humanos. A sua localização em relação com a superfície interna da mandíbula e em direção da base do crânio dificulta a realização de procedimentos diagnósticos, terapêuticos ou com objetivos de pesquisa. Sua complexa atividade eletromiográfica não pode ser registrada clinicamente devido a sua profundidade e o acesso limitado no interior da cavidade bucal faz dele um músculo dificilmente palpável durante o exame clínico odontológico.

Considerando estas situações foi desenvolvido o método conhecido como manipulação funcional, o qual permite estabelecer alterações patológicas como as DTM (CARLSON et al, 1998; OKESON, 2011). Além de ser alvo de desordens funcionais, este músculo é frequentemente susceptível ao trauma iatrogênico durante o bloqueio anestésico do nervo alveolar inferior (WRIGHT, 2011). Outros processos patológicos associados ao trauma também têm sido reportados no músculo pterigóideo medial (NARANG; DIXON, 1974; THANGAVELU et al, 2011), mas a pouca atenção que os cirurgiões dentistas prestam ao diagnóstico por manipulação funcional, contribuem ao desenvolvimento e perpetuação de síndromes dolorosas nos pacientes.

Além da sua função nos processos de mastigação, deglutição e fonoarticulação, o músculo pterigóideo medial desempenha um papel fundamental no crescimento mandibular (CRUZ et al, 2009; DICKER et al, 2012; HANNAM, 1989; KUSUMAH et al, 2009; OTA, 2006) e na estabilidade mandibular após procedimentos cirúrgicos (BEUKES et al, 2013).

Poucas pesquisas relacionadas com o músculo pterigóideo medial foram realizadas em animais para avaliar a arquitetura interna (KATSURA et al, 1981; MATSUMOTO, 1987) e a ultraestrutura da sua união miotendínea (CIENA et al, 2010). Outros estudos deverão ser realizados considerando que fatores individuais como a idade (NEWTON et al, 1987), ou ambientais como o estresse emocional (CHEN et al, 2010) podem alterar as características morfológicas e a função do músculo pterigóideo medial.

2.2 Fisiologia do Estresse e sua relação com as Desordens Temporomandibulares (DTM)

As funções corporais vegetativas estão reguladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e especificamente pela atividade alternada do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP). A ativação de ambos os sistemas oscila durante o dia e sua função principal é manter a homeostase do organismo; quando ativados eles provocam alterações rápidas nos estados fisiológicos de órgãos alvo.

O SNS é um sistema geral de alarme que funciona em situações críticas onde o corpo precisa se adaptar às novas condições ou desafiar forças internas ou externas que alteram seu equilíbrio. Assim, enquanto o SNS aumenta o gasto energético, o SNP é ativado na condição de repouso e poupa energia (JOËLS, 2009).

O estresse e condições emocionais como a ansiedade estão ligados à ativação do SNS (CALLISTER; SEALS, 1992). O estresse é um estado antecipado ou real de ameaça ao equilíbrio do organismo, onde o SNS coordena um complexo conjunto de respostas fisiológicas que têm o propósito de minimizar danos para o organismo e restabelecer o equilíbrio corporal ou “homeostase” (ULRICH-LAI, 2009). O tipo de resposta ao estresse desenvolve-se numa escala temporal, que vai de milissegundos a dias e é classificada em aguda ou crônica; no estado agudo é uma resposta adaptativa que prepara o organismo para enfrentar o desafio ou emprender a fuga, induzindo uma rápida mobilização de energia nos locais apropriados (CUESTA, 2012).

Para facilitar esta resposta o estresse agudo está caracterizado por: aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e da frequência respiratória; mobilização de glicose dos depósitos; inibição da digestão, do crescimento e da reprodução; analgesia e melhora na memória e as percepções (SÄVENDAHL, 2012). Estes efeitos iniciais são resultado da liberação de monoaminas pelo SNA e pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), começando alguns segundos após o estressor (GLAROS, 1977). Posteriormente ocorrem efeitos moleculares, principalmente pela secreção de glicocorticóides que ativam os fatores de transcrição, produzindo efeitos genômicos e estruturais. A intensidade da resposta aguda deve persistir por um tempo limitado, sem comprometer o organismo por seus efeitos inibitórios sobre a digestão, o crescimento, a reprodução e a resposta imune.

O estresse crônico repetido controlado ou não produz alterações corporais fisiológicas e comportamentais, que modificam a atividade de algumas glândulas endócrinas como a glândula suprarrenal (MARTRETTE et al, 2004). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) produz como efeito final a liberação do hormônio cortisol pelo cortex suprarrenal, evento considerado como o maior componente fisiológico da resposta ao estresse em humanos (BLACK, 2002). Em animais, o hormônio plasmático equivalente é conhecido como corticosterona. A ligação do cortisol com seu receptor intracelular facilita a transcrição gênica e influencia a taxa de secreção de proteínas específicas, que diferem dependendo do tipo de célula.

Além do cortisol, os neurotransmissores responsáveis pela resposta ao estresse são: a noradrenalina secretada pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos e a adrenalina produzida pela medula adrenal após o estímulo do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O cálculo da concentração plasmática ou salivar do cortisol nos humanos e da corticosterona em animais determina a ativação do eixo HHP, e é considerado um indicador do estresse (VEDHARA et al, 2003).

O estresse crônico pode comprometer o organismo gerando doenças. Entre as principais doenças humanas, 75 % até 90 % estão associadas ao mecanismo do estresse (LEVY et al, 1998). Estudos neuroquímicos sugerem que a ativação do eixo HHA e do sistema simpático-adrenomedular tem consequências sobre os sistemas cardiovascular, gastrointestinal, imunológico, reprodutivo, nervoso, esquelético e muscular (SATO et al, 2010). Durante o estresse crônico, novas situações de ameaça aumentam muito as respostas de ACTH e cortisol, induzindo também sensibilização do lócus cerúleo e maior liberação de noradrenalina (SÄVENDAHL, 2012).

Complexas respostas no sistema nervoso central também têm sido descritas no estresse crônico. Efeitos da ativação do sistema serotoninérgico como o aumento da temperatura e da nocicepção química foram efeitos observados após estresse por nado forçado (QUINTERO et al, 2000). A ativação do sistema dopaminérgico também foi descoberta durante o estresse crônico (BLISS, 1971).

Evidência tem relacionado o estresse com depressão em humanos e comportamentos semelhantes à depressão em animais (ANISMAN, 1982)

O aumento da atividade simpática durante o estresse também afeta a contração muscular induzindo aumento do tono em todos os músculos esqueléticos (GRASSI et al, 1996). No estresse agudo, a estimulação β adrenérgica produz vasodilatação direcionando o fluxo para os músculos. A liberação de glicocorticóides também altera o metabolismo de carboidratos porque tem efeito oposto ao da insulina. A estimulação do SNS durante o estresse agudo produz lipólise com transformação dos triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. No estresse crônico a vasoconstrição continuada pela influência adrenérgica no músculo induz hipóxia e tem sido relacionada com aumento da sensibilidade, dor muscular e alteração funcional (HUANG et al, 2011; OKESON, 2011).

No sistema estomatognático o estresse crônico pode causar doença periodontal, diminuição da resposta imune, alteração do crescimento e desenvolvimento crânio facial e disfunção muscular; a severidade destas repostas nos humanos depende do tipo e da intensidade do estressor, assim como da tolerância individual (ANTONOVA, 2008; FLOR et al, 1991).

Estressores de vários tipos aumentam a atividade eletromiográfica (EMG) dos músculos mastigatórios alterando a sua função (HIDAKA et al, 2004b; RUF et al, 1997). Este aumento da mioeletricidade e a consequente hiperatividade muscular sem objetivos funcionais (NICHOLSON; GREMLING, 2000) focaram o interesse dos pesquisadores na relação de causalidade entre estresse e desordens temporomandibulares (DTM).

As DTM são consideradas as principais alterações funcionais da região orofacial estando associadas à dor e sons articulares (VEDOLIN et al., 2009); os pacientes com DTM relatam também desconforto na mastigação (MOTTAGHI et al, 2011). A desordem pode ser articular, muscular ou mista. Conforme o local afetado esses pacientes apresentarão dor na articulação temporomandibular, sensibilidade nos músculos mastigatórios, dores de cabeça e limitação dos movimentos mandibulares (CLARK, 1984; WU et al, 2012); a persistência dos fatores etiológicos induz um avanço dos sinais e sintomas desenvolvendo um transtorno cada vez mais difícil de tratar. Na fase inicial, as desordens articulares não produzem dor, enquanto as alterações musculares estão caracterizadas por hiperalgesia e limitação da abertura bucal. A cronicidade das DTM, principalmente as de tipo muscular, pode alterar o sono e a qualidade de vida dos pacientes.

A dor presente nas desordens musculares é motivo frequente de consulta médica e odontológica, no entanto muitos pacientes com desordens articulares não são diagnosticados; segundo Nicholson e Gremling (2000) a prevalência das DTM na população geral oscila entre 20% e 40%.

A etiologia das DTM é atualmente considerada multifatorial. Fatores biomecânicos, neuromusculares, biopsicosociais e neurológicos podem contribuir com o seu desenvolvimento (SUVINEN et al, 2005). Vários aspectos da dor presente nas DTM sugerem uma origem no sistema nervoso central porque muitos pacientes sintomáticos não apresentam sinais evidentes de lesão ou inflamação (SCHMITTER et al, 2010); frequentemente a dor é descrita como flutuante e progressiva (RAMMELSBERG et al, 2003). Em adolescentes foi achada uma correlação importante entre estresse e palpação positiva muscular e articular (SIEBER et al, 2003), assim fatores psicológicos podem estar implicados na geração, no desenvolvimento e sintomatologia das DTM.

A teoria atual do estresse como fator etiológico de doenças indica que este é uma resposta indireta aos fatores externos (ORAL et al, 2009). Segundo Sieber et al (2003) o estresse precipita o início das desordens craniomandibulares, mas tem uma correlação mais forte com alterações musculares quando comparado com as alterações articulares. Rosales et al (2002) sugeriram que alterações condilares são causadas pelo aumento da pressão passiva da articulação temporomandibular, durante a ativação muscular nos episódios de estresse ou ansiedade. Em um estudo conduzido por Flor et al (1991), pacientes com DTM submetidos ao estresse visual aumentaram a atividade EMG do músculo masseter.

Desde a segunda metade do século XX estudos etiológicos têm analisado a relação entre o estresse e as DTM; na atualidade o estresse crônico é considerado um importante fator

de risco na prevalência destas desordens e das síndromes de dor idiopáticas (BENOLIEL et al, 2011; WANMAN; AGERBERG, 1991). Altos níveis de estresse são uma característica comum de pacientes com DTM, quando comparados com pacientes saudáveis (MANFREDINO; CANTINI, 2009). Dentre os pacientes estressados, os diagnosticados com alterações musculares apresentam piores condições de saúde que aqueles portadores de desordens articulares e estresse moderado ou baixo (SIEBER et al, 2003). O efeito do estresse no desenvolvimento das desordens musculares foi testado durante estudos clínicos que usaram eletromiografia convencional; neles foi registrado o aumento da atividade contrátil de todos os músculos implicados direta ou indiretamente na mastigação além do músculo masseter (RUF et al, 1997; TSAI et al, 2002). A tensão psicológica também está associada com as desordens musculares por provocar fadiga muscular e espasmo (LASKIN, 1969).

As desordens funcionais dos músculos mastigatórios associadas ao estresse são progressivas, começando como uma contração protetora dos músculos antagonistas por um estímulo nocivo; no caso de persistir a causa o transtorno se converte em dor muscular local, a qual pode evoluir à síndrome conhecida como dor miofascial ou dor por pontos gatilho (OKESON, 2011). Desordens crônicas como mialgia mediada pelo sistema nervoso central e fibromialgia são de aparição posterior.

Os mecanismos patogênicos pelos quais o estresse induz as alterações musculares não estão esclarecidos. Na atualidade o objetivo de pesquisas em animais e humanos é determinar a ação dos neurotransmissores liberados durante a ativação do sistema nervoso autônomo, que agem sobre os centros nervosos do controle motor e sobre os músculos esqueléticos. Estudos indicam que as DTM resultam da alteração hemodinâmica muscular local e os efeitos dos neurotransmissores liberados na ativação do SNS durante o estresse (HUBBARD, 1993; RASMUSSEN et al, 1977). O controle neurovascular orofacial é complexo e está regulado pela ação adrenérgica, colinérgica e pelos nervos trigeminais; além de alterar o batimento cardíaco e a pressão arterial, o estresse agudo produz um poderoso controle vasoconstritor nesta região por estimulação exclusiva de fibras simpáticas (IZUMI, 1999); a contração adrenérgica das artériolas musculares e a hipoperfusão posterior diminui o aporte de oxigênio e o músculo sofre dano estrutural (ROATTA et al, 2009). A teoria da hiperatividade muscular também é considerada na patogenia das DTM em relação com o estresse, porque o aumento da tensão muscular e a contração prolongada colapsam os vasos sanguíneos e diminuem a perfusão (INTRIERI et al, 1994; KIM et al, 1999; SIEBER et al, 2003). Outros fatores miogênicos e metabólicos também estão implicados na hipoperfusão muscular, mas não há relação direta com o estresse. No músculo masseter a susceptibilidade da hemodinâmica

muscular sob as condições de estresse provocou diminuição na saturação de oxigênio muscular e alteração da função dos fusos musculares (HIDAKA et al, 2004a; HIDAKA et al, 2004b; ZEREDO et al, 2009).

Outra consequência da hipoperfusão na patogenia das DTM é a dor. Um sintoma comum associado às DTM é a dor facial (LUND et al, 1991) e pode afetar além dos músculos, a articulação temporomandibular, a cabeça, o ouvido e os dentes. A hipoperfusão pode explicar a origem da dor, porque a hipóxia no tecido induz a produção de substâncias proinflamatórias. O desenvolvimento e a persistência da hiperalgesia muscular é principalmente causado por excitação prolongada de nociceptores periféricos pela interleucina seis (IL-6); pacientes com DTM expressam altos níveis de estresse crônico, depressão e outras alterações psicológicas associadas com a produção de IL-6 (KANEHIRA et al, 2008), substância P e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (HUBBARD, 1993). A hiperalgesia é um sintoma comum dos pacientes com DTM. O estresse crônico altera o sistema opioide no SNC e induz o aumento da sensibilidade; a intensidade da dor orofacial frequentemente associada às desordens musculares depende da cronicidade do transtorno (Botelho et al., 2010). A atividade adrenérgica nos terminais simpáticos durante o estresse crônico aumenta a acetilcolina na placa motora, desenvolvendo uma cascata de eventos que terminam com uma redução do limiar dos nociceptores e dor muscular (GAMEIRO et al, 2006; VEDOLIN et al., 2009)

O estresse crônico tem sido também relacionado como cofator no desenvolvimento e a exacerbação do Bruxismo (GLAROS, 1977; VAN SELMS et al, 2004), embora os mecanismos patogênicos sejam atualmente desconhecidos. Na atualidade não existe evidência suficiente para estabelecer uma relação de causalidade entre o bruxismo e as DTM. Para Sato et al (2010) as respostas fisiológicas em ratos submetidos ao estresse sugerem hiperatividade semelhante ao bruxismo.

Diminuir a dor articular ou muscular nos pacientes com DTM é o principal objetivo da terapêutica. A origem da dor não é bem entendida até agora, mas o impacto do estresse na aparição de qualquer sintoma depende da resposta individual diante de situações estressoras, indicando que cada indivíduo apresenta uma organização hierárquica de respostas ao estresse com máxima resposta em alguns sistemas e mínima resposta em outros (LASKIN, 1969; RUGH, 1976). Pacientes que desenvolvem DTM, possivelmente respondem com máxima tensão muscular em cabeça e pescoço sem necessariamente apresentar alterações da frequência cardíaca ou de outros sistemas (KAPEL; McGLYNN, 1989).

Desordens de etiologia multifatorial como as DTM precisam de um tratamento

multidisciplinar. Na atualidade a terapia comportamental e o tratamento farmacológico são ferramentas indispensáveis que têm sucesso no tratamento da dor relacionada com as DTM (LIST; AXELSSON, 2010). Pacientes com dor e disfunção temporomandibular obtêm benefícios reais da terapia comportamental cognitiva, o biofeedback e o controle do estresse (OKESON, 1995). Porém é preciso ter certeza dos mecanismos pelos quais o estresse induz alteração funcional e dor nos componentes do sistema estomatognático, para que a intervenção seja rápida e efetiva na melhora da qualidade de vida destes pacientes.

2.3 Exodontia e alteração dos músculos mastigatórios

Os dentes, o sistema neuro muscular e a articulação temporomandibular são alguns dos componentes funcionais do sistema estomatognático que participam na mastigação, deglutição, respiração e fono articulação. Embora os dentes sejam um componente passivo cuja função depende dos movimentos mandibulares, as alterações estruturais ou funcionais na oclusão estática (nos arcos dentários isolados) ou dinâmica (quando os dentes estão em oclusão) provocam um desequilíbrio geral no sistema que pode ter um potencial patógeno (TANAKA et al, 2008); especificamente fatores biomecânicos como disfunção oclusal e mastigatória, perda de dentes posteriores, padrões de mastigação unilateral e bruxismo têm sido considerados como fatores na iniciação e progressão das DTM por poduzir sobrecarga absoluta ou relativa de estruturas comuns (HASKIN et al, 1995).

O ciclo mastigatório é resultado de um conjunto de complexas contrações musculares que produzem movimentos mandibulares nos três planos do espaço; contrações isotônicas durante a abertura e o fechamento da boca estão separados pela fase oclusal, na qual os músculos realizam contração isométrica, cuja força é trasmitida aos maxilares e às articulações temporomandibulares (ATM) (WODA et al, 2006). O número e a posição dos dentes são fatores que determinam a magnitude da contração isométrica e o aumento da tensão muscular durante a oclusão dental. Em pacientes com interferências oclusais entre a relação cêntrica e a máxima intercuspidação ou com mastigação unilateral, o desequilíbrio na função muscular está ligado ao desenvolvimento das desordens dolorosas dos músculos da mastigação (POVEDA RODA et al, 2007). Fatores psicológicos como o estresse associados à alteração oclusal parecem desencadear DTM, embora o mecanismo patogênico não esteja bem entendido e a oclusão não seja um elemento dominante (BADEL et al, 2012;

RICHARDIN et al, 1995). Não somente a elevação da oclusão se não também a perda dental parcial ou total estão relacionadas com alterações craniofaciais e sistêmicas.

A prevalência do edentulismo tem diminuído ao longo das últimas décadas e varia muito entre países diferentes, mas uma proporção considerável de indivíduos desdentados vai continuar apresentando efeitos psicológicos e fisiológicos causados pelo edentulismo, particularmente na sua saúde bucal e a qualidade de vida (POLZER et al, 2010); a diminuição da perda dental na infância e na idade adulta jovem está determinada por fatores socioeconômicos, estilos de vida e comportamentos de saúde que fazem do edentulismo um marcador socioeconômico, de autoestima e qualidade de vida em adultos mais velhos (STARR; HALL, 2010).

O edentulismo total parece aumentar o risco para várias doenças sistêmicas (FELTON, 2009) e a perda dental parcial tem demonstrado efeitos locais nas estruturas craniofaciais. Huang et al (2002) descreveram espessamento da cartilagem condilar, alterações na morfologia dos núcleos de condrócitos condilares e do disco, e aumentos dos níveis de íons carregados negativamente na camada de cartilagem hipertrófica condilar após a remoção unilateral de molares. Os efeitos da exodontia unilateral na estrutura e função da musculatura mastigatória parecem afetar a harmonia do sistema estomatognático.

A contração isométrica durante a fase oclusal não ocorre depois da perda dental, diminuindo a função muscular. Bhoyar et al (2012) encontraram uma diminuição na espessura do músculo masseter em indivíduos desdentados; sendo a espessura muscular o principal fator contribuinte da força de mordida em adultos (RAADSHEER et al, 1999) o número de dentes naturais é um fator importante na manutenção dos níveis desta força. A redução da função mastigatória em pacientes com perda dental induz modificações estruturais nas fibras musculares e em indivíduos em crescimento pode provocar redução da espessura do osso cortical, diminuição da densidade óssea e atraso no crescimento articular (BRESIN; KILIARIDIS, 2002; BRESIN et al, 1999; KWON et al, 2007; TSAI et al, 2010; VECCHIONE et al, 2007).

A diminuição da força muscular após a exodontia ou qualquer outra condição que suprime o contato dos dentes posteriores induz um mecanismo de adaptação morfofuncional, em primeiro lugar nos músculos elevadores mandibulares (masseter, pterigóideo medial e temporal). Depois da extração de molares ocorre no músculo masseter um mecanismo patogênico com redução da atividade neuromuscular, atrofia, transformação adaptativa de fibras IIa por fibras IIb e alteração da capacidade oxidativa do tecido (MAEDA et al, 1990); efeitos similares neste músculo foram observados durante a diminuição da função muscular

induzida pela atrição dos molares (BANI et al, 1999; MIEHE et al, 1999), alimentação com dieta mole (KILIARIDIS et al, 1988; KITAGAWA et al, 2004) ou paralisia flácida induzida pela toxina botulínica (TSAI et al, 2012). A perda unilateral de molares também provocou alteração morfológica ultraestrutural nas fibras do músculo pterigóideo medial (BAZAN et al, 2008; IYOMASA et al, 2009b) e no ligamento periodontal (IYOMASA et al, 2008a). Os músculos considerados acessórios da mastigação também são susceptíveis aos efeitos adversos da hipofunção; atrofia e dano na ultraestrutura das mitocôndrias subsarcolemas já foi descrita nos músculos supra-hioideos ipsilaterais à exodontia (IYOMASA et al, 2008b), além do aumento das fibras glicolíticas 60 dias após oclusão unilateral, sem comprometimento da propriedade contrátil das fibras (IYOMASA et al, 2009a).

Na atualidade persiste a controvérsia sobre os mecanismos envolvidos na origem das síndromes de dor muscular humana. Os efeitos morfológicos e fisiológicos derivados da hipofunção mastigatória provocada pela exodontia, isoladamente ou em associação com outros fatores ainda estão pobremente descritos na literatura; assim o esclarecimento da relação entre o edentulismo e os sinais e sintomas das desordens musculares pode ser uma ferramenta para o diagnóstico e o tratamento na prática odontológica.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do estresse agudo e crônico (repetido e variado) em músculo pterigóideo medial de ratos submetidos ou não à exodontia unilateral, por meio de:

- a) Análise da variação do peso durante o tempo do experimento.
- b) Análise histológica da morfologia por microscopia de luz, coloração de hematoxilina e eosina (HE).
- c) Análise metabólica por histoquímica para a atividade das enzimas oxidativas succinato desidrogenase (SDH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH).
- d) Análise do estresse oxidativo por histoquímica para espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species-ROS).
- e) Análise da densidade capilar como parâmetro hemodinâmico por imunoistoquímica para as proteínas α -CD31 do endotélio e laminina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram usados 40 ratos machos *Wistar*, adultos jovens, pesando aproximadamente 200 g no início dos procedimentos, providenciados pelo biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Campus Ribeirão Preto. A amostra foi dividida aleatoriamente em dois grupos: Grupo Maloclusão (M: n=20), cujos animais foram submetidos à exodontia unilateral dos molares superiores esquerdos e Grupo Sem Maloclusão (S: n=20), caracterizado porque os animais conservaram todos os dentes. Cada grupo (n=20) foi subdividido em 4 subgrupos (n=5): Grupo controle (GC); Grupo Estresse Agudo (GA); Grupo Estresse Crônico Repetido (GR) e Grupo Estresse Crônico Variado (GV) (Ver tabela 01). Os ratos de ambos os grupos foram submetidos aos protocolos de estresse agudo e crônico (repetido e variado) quando o período de cicatrização alveolar estava avançado e a hipofunção mastigatória estabelecida (BANI et al, 1999). Todos os procedimentos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob o número 12.1.418.53.0.

Tabela 1 - Grupos experimentais

Grupo Maloclusão (M-Com exodontia) n=20	Grupo Sem Maloclusão (S-Sem exodontia) n=20
GCM: Grupo Controle	GCS: Grupo Controle
GAM: Grupo Estresse Agudo	GAS: Grupo Estresse Agudo
GRM: Grupo Estresse Crônico Repetido	GRS: Grupo Estresse Crônico Repetido
GVM: Grupo Estresse Crônico Variado	GVS: Grupo Estresse Crônico Variado

Desde o dia zero do experimento os animais permaneceram em temperatura ambiente controlada entre 22 a 24°C e com timer programado para 12 horas de iluminação diárias (ciclo claro inicia às 6:00h). Os animais receberam ração e água filtrada à vontade ou controlada, de acordo com o protocolo experimental realizado.

4.2 Indução da alteração oclusal

No dia zero, foi estabelecido o grupo maloclusão (GM). Os animais (n=20) aleatoriamente escolhidos foram submetidos à exodontia do primeiro, segundo e terceiro molar do lado esquerdo. Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com associação de Xilazina 4% (10mg/kg) e Cetamina 10% (80mg/kg). Posteriormente foi realizada a sindesmotomia, luxação e avulsão dos molares com auxílio de uma Pinça Anatômica Infantil e de um Hollembach 3S, previamente esterilizados e banhados com Polivinilpirrolidona iodo (PVPI). Como medida profilática os animais receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico veterinário pequeno porte - "*Fort Dodge*") na dosagem 24000 UI das penicilinas por Kg de peso corporal, e uma dose de antiinflamatório-analgésico (Banamine a 1 % de flunixinina). Considerando o estresse operatório induzido pela exodontia, foi necessário equilibrar as condições experimentais submetendo os 20 animais do GS ao processo de simulação; assim, os ratos foram anestesiados e mantidos em posição cirúrgica com a boca aberta, porém, sem a exodontia propriamente dita; também receberam igual dose de antibiótico e de antiinflamatório-analgésico.

4.3 Realização dos protocolos de estresse

No dia 14 após os procedimentos de exodontia e simulação em ambos os grupos, foram estabelecidos os subgrupos alvo dos protocolos de estresse. Foram aplicadas duas metodologias: Estresse Crônico (repetido e variado) e estresse agudo (Fisiológico).

4.3.1 Protocolo de Estresse Crônico Repetido (GCR):

Neste modelo, 10 animais (GRM: 5 e GRS: 5) permaneceram individualmente, em restrição física 2 horas por dia, durante 10 dias (dia 14 ao dia 23) em aparato metálico ajustado ao corpo (FERRETTI et al, 1995). O protocolo foi realizado das 9:00 h as 11:00 h, em sala isolada e com temperatura controlada.

4.3.2 Protocolo de Estresse Crônico Variado (GCV):

Neste protocolo, 10 animais (GVM: 5 e GVS: 5) ficaram durante 10 dias (dia 14 ao dia 23) em cinco situações estressoras diferentes, adaptadas de (WILLNER, 1997) abaixo relacionadas:

- **Dia 01 e Dia 06:** Agitação. Os ratos foram colocados individualmente em uma caixa plástica sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos. A velocidade média foi de 50 rotações por minuto.
- **Dia 02 e Dia 07:** Nado forçado. Os ratos nadaram individualmente durante 15 minutos em tanque plástico circular com profundidade de 54 cm e 47 cm 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 estava em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A água foi trocada para cada procedimento.
- **Dia 03 e Dia 08:** Restrição física. Foi realizada em aparato metálico como descrito anteriormente para o estresse crônico repetido, pelo período de 2 horas.
- **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.
- **Dia 05 e dia 10:** Privação de água. Foi removido o bebedouro por 24 horas.

4.3.3 Protocolo de Estresse Agudo (GA):

Este consistiu em um único episódio de estresse realizado no dia 23°. 10 animais (GAM: 5 e GAS: 5) permaneceram individualmente, em restrição física 2 horas, em aparato metálico ajustado ao corpo, como descrito anteriormente para o estresse crônico repetido .

4.4 Controle do peso

Com o objetivo de avaliar o impacto dos dois fatores de variação (estresse e maloclusão) no desenvolvimento físico dos animais durante o experimento, foi registrado o peso dos animais no dia 0, 5, 10, 15, 20 e 23.

4.4 Obtenção das amostras para cortes congelados

No 23º dia foi realizado o sacrifício dos animais, os quais receberam previamente anestesia com associação de Xilazina 4% (10mg/kg) e Cetamina 10% (80mg/kg). Depois da eutanásia (decapitação com guilhotina), a cabeça foi dividida sagitalmente e o músculo pterigóideo medial esquerdo sistematicamente dissecado.

O músculo previamente coberto com amido de milho foi congelado por imersão em nitrogênio líquido (-150°C) sobre uma rolha contendo um pouco de *tissue-teck*. O material foi acondicionado em freezer à -80°C e depois transferido para a câmara de um micrótomo criostato à -20°C, para a realização de cortes transversais.

4.6 Processamento das amostras

4.6.1 Técnica para dosagem de Corticosterona:

Para analisar a concentração plasmática do hormônio cortisol nas condições do experimento foram selecionados aleatoriamente dois animais de cada subgrupo, dos quais foi coletado o sangue sem anestesia. Este foi centrifugado para separar o componente plasmático. Posteriormente o plasma foi processado usando a metodologia Luminex, que envolve um processo de imunoensaio exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Usando proporções precisas de dois fluoróforos, foram criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que foram identificadas pelo instrumento Luminex. Por meio do kit Milliplex, anticorpos de captura específicos para cada antígeno imobilizaram as microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o antígeno se ligou aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final foi feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final foi um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimentou estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detectou a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantificou o sinal de reporte em cada microesfera.

4.6.2 Técnica de coloração com hematoxilina e eosina – Microscopia de luz:

Cortes transversais seriados de 10 µm de espessura, colocados em lâminas e processados de acordo com a técnica histológica para tecido congelado foram corados por hematoxilina e eosina. Após o processamento rotineiro os cortes da lâmina foram protegidos com lamínula colada com Entellan. De cada animal foi escolhido o corte transversal com a mais alta qualidade. Com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio OLYMPUS BX 61 (Alemanha), foram sistematicamente capturadas imagens da totalidade do corte com a objetiva de 40x. Cada fotografia foi exaustivamente observada para determinar a presença de células inflamatórias e alterações morfológicas das fibras musculares. Para essa análise qualitativa considerou-se como padrão comparativo o subgrupo GCS.

4.6.3 Técnica histoquímica para demonstração da enzima succinato desidrogenase (SDH):

As lâminas contendo cortes de 10 µm de espessura foram incubadas em solução contendo succinato de sódio a 0,2M (substrato) e nitro blue tetrazolium (NBT) por 30 minutos a 37°C. Elas foram lavadas com água destilada, fixadas em formol Cálcio Baker, novamente lavadas em água destilada e montadas com Xarope de Apaty. O NBT é um grande aceptor de hidrogênio e, sua redução em uma reação para a succinato desidrogenase resulta em pigmentos granulares azuis de diformazan depositados nas mitocôndrias (Nachlas et al., 1956). A intensidade de coloração azul das fibras musculares (claras, intermediárias e escuras) é capaz de demonstrar se a atividade da succinato desidrogenase é fraca ou forte no tecido. De cada animal, o corte transversal com alta qualidade foi usado para a captura de quatro imagens com a objetiva de 20x, no microscópio OLYMPUS BX 61 (Alemanha). O tamanho da amostra (5 animais, 19 imagens cada um) foi determinado para ser estatisticamente significativo (MANDARIN de LACERDA, 1995) na quantificação do número de fibras claras, intermediárias e escuras. Sobre cada imagem foi sobreposto um sistema teste de 80 pontos, para a contagem dos pontos que caíram sobre cada tipo de fibra, usando o programa Image J. A contagem das fibras permitiu determinar a atividade metabólica das fibras sob as diferentes condições experimentais, conforme os critérios estabelecidos por (PETER et al, 1972).

4.6.4 Técnica histoquímica para demonstração da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH):

Lâminas contendo cortes de 10 µm de espessura foram incubadas em solução contendo NADH e NBT por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas com água destilada, fixadas em formol tamponado 5%, novamente lavadas com água destilada, e finalmente montadas com Xarope de Apaty. De cada animal, o corte transversal com alta qualidade foi usado para a captura de cinco imagens com a objetiva de 20x no microscópio OLYMPUS BX 61 (Alemanha), para quantificar o número de fibras oxidativas (FO), oxidativas-glicolíticas (FOG) e glicolíticas (FG), uma vez que foi predeterminado o tamanho da amostra estatisticamente significativa (MANDARIN de LACERDA, 1995) como descrito para SDH. Foi determinada a capacidade oxidativa do músculo pela quantidade de fibras oxidativas, oxidativas-glicolíticas e glicolíticas, conforme os critérios estabelecidos por (PETER et al, 1972).

4.6.5 Técnica histoquímica para espécies reativas de oxigênio (ROS):

Lâminas contendo cortes de 5 µm de espessura foram 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_2^- presente nos tecidos resultou na formação de 2-hidroxi-etídeo e etídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha no local (ANTONIO et al, 2013). Após a incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em paraformaldeído (PFA) 4%. De cada animal, o corte transversal com alta qualidade foi usado para a captura sistemática de 10 imagens com a objetiva de 40x, com auxílio de um microscópio de fluorescência OLYMPUS BX 61 (Alemanha) acoplado à câmera fotográfica, com a velocidade da luz padronizada em 10 milissegundos. Usando o programa Image J, foi sobreposto um quadrado de 3.0 mm sobre os 30 núcleos mais brilhantes de cada fotografia. A quantidade de ROS foi determinada calculando-se a maior intensidade luminosa emitida, por unidade de área em cada fotografia.

4.6.6 Técnica imunoistoquímica para detecção de capilares:

A literatura revela que a imunoistoquímica como marcador da laminina presente na lâmina basal dos capilares (STÅL et al, 1996) e α CD31, uma glicoproteína de membrana presente no endotélio (CEBASEK et al, 2006), favorecem avaliar a densidade capilar, como reflexo da capacidade oxidativa dos músculos e suas fibras constituintes. A reação imunoistoquímica para as proteínas laminina e α CD-31 foi realizada pelo método indireto com sistema de amplificação (biotina - streptavidina - peroxidase). As lâminas silanizadas contendo os cortes de cinco μ m de espessura foram imersas em acetona e posteriormente incubadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 25 volumes (Dinâmica, Brasil) para bloquear as enzimas peroxidases endógenas, em câmara úmida. Após a lavagem em tampão PBS, seguida da solução de BSA 3% (Pentex, USA) em tampão PBS, as lâminas foram incubadas “over night” com os correspondentes anticorpos primários: laminina e α CD-31. Decorrido esse tempo, os cortes foram lavados em PBS e submetidos ao “Kit” LSAB – HRP (DAKO Cytomation, Dinamarca) de amplificação (anticorpo secundário biotilado e streptavidina conjugada à peroxidase). As reações foram reveladas em DAB (3,3 diaminobenzina, Sigma Aldrich, USA), lavados em água destilada, contra-corados com hematoxilina de Harris (Dinâmica, Brasil), e as lâminas montadas com Permount (Fisher Chemicals, USA). De cada animal, o corte transversal com a mais alta qualidade foi usado para a captura sistemática de 5 imagens com a objetiva de 40x, com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio (ZEISS.Imager.Z2. Alemanha). A avaliação de α CD-31 foi realizada no programa Image J contando por senso os capilares corados. A avaliação da laminina foi qualitativa.

4.7 Análise Estatística

Os dados de quantificação dos testes histoquímicos e imunoistoquímicos foram informados como média e desvio padrão. Observada a normalidade dos dados, foi realizado o teste ANOVA fatorial, com fatores de variação fixos seguida pelo teste de Tukey-Kramer.

Para a análise do peso dos animais foi realizado o ANOVA de três fatores para variáveis dependentes. Diferença considerada estatisticamente significativa $P < 0.05$.

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.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Corticosterona

Em relação ao grupo GCS, os demais grupos revelaram níveis maiores de corticosterona plasmática confirmando o aumento da atividade do eixo Hipotálamo- hipófise-adrenal induzido pelo SNS durante o estresse.

Tabela 2 - Níveis de Corticosterona Plasmática (pg/ml), grupo controle e grupos estressados Sem Maloclusão.

Grupos S			
GCS	GAS	GRS	GVS
38780,26	113440,308	83860,4375	154389,853

Tabela 3 - Níveis de Corticosterona Plasmática (pg/ml), grupo controle e grupos estressados Maloclusão.

Grupos M			
GCM	GAM	GRM	GVM
112756,238	149359,605	87323,335	46525,1525

5.2 Peso dos animais:

Considerando que o protocolo de estresse agudo foi realizado duas horas antes da eutanásia, os animais dos grupos GAS e GAM foram considerados também como controle por não apresentar variações do peso durante o tempo experimental. A diferença de peso entre o dia zero e cada um dos registros seguintes foi calculada para cada grupo. Dos fatores de variação avaliados, a maloclusão não influenciou o peso. Em relação ao estresse crônico, só os animais submetidos ao estresse crônico repetido (GRS e GRM) apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados com os animais controle e os submetidos ao estresse crônico variado. (Figura 1 e Tabela 4).

Figura 1. Peso em gramas durante o período experimental.

Tabela 4 - ANOVA para três fatores referentes à mudança de peso.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	P
<i>Inter-indivíduos</i>					
Grupo	77145,660	2	38572,830	26,296	<0,001*
Maloclusão	631,688	1	631,688	,431	,516
Grupo x Maloclusão	24,860	2	12,430	,008	,992
Erro	49873,040	34	1466,854		
<i>Intra-indivíduos</i>					
Período	347725,9	4	86931,5	385,4	<0,001*
Período x Grupos	17495,6	8	2186,9	9,695	<0,001*
Período x Maloclusão	850,0	4	212,5	,942	,442
Período x Grupos x Maloclusão	424,1	8	53,0	,235	,984
Erro	30679,2	136	225,6		

5.3 Hematoxilina eosina – Análise morfológica

Foi realizada análise qualitativa das fotografias avaliando os efeitos do estresse e a exodontia nas fibras musculares e no componente extracelular. Exaustivamente foram observadas possíveis alterações no tamanho e na forma das fibras musculares e a presença de células inflamatórias. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 2.

5.3.1 Grupo controle sem maloclusão (GCS)

O músculo pterigoideo medial do grupo controle sem maloclusão revelou fibras musculares de contorno suavemente arredondado, com tamanhos discretamente diferentes, núcleos dispostos na periferia da fibra, distribuídas uniformemente nos fascículos. O tecido conjuntivo entre os fascículos mostrou presença de vasos sanguíneos, feixes de fibras nervosas, fusos neuromusculares isolados ou concentrados e células normais do endomísio. As características morfológicas do músculo correspondem com o aspecto normal do tecido.

5.3.2 Grupo controle com maloclusão (GCM)

O músculo pterigoideo medial dos ratos expostos à exodontia exibiu fibras musculares poligonais, de contorno irregular e sinais de atrofia; as fibras pequenas foram as mais afetadas. O perimísio mostrou-se amplo, preenchido por tecido conjuntivo com características histológicas semelhantes ao do controle e ausência de células inflamatórias.

5.3.3 Grupos com associação entre estresse e exodontia (GAM, GRM, GVM)

Estes grupos foram analisados simultaneamente pela semelhança dos efeitos produzidos pela associação dos dois fatores de variação. Nos três grupos foram observadas discrepâncias importantes no tamanho das fibras musculares, destacando que as fibras de tamanho menor apresentaram contorno irregular e intensidade de coloração diferente (acidófilas); a localização irregular dos núcleos em fibras isoladas foi também uma característica comum. Os sinais de atrofia muscular foram bastante notórios. Em GAM foi destaque a presença de fibras grandes isoladas. Em GRM e GVM as alterações mencionadas

foram mais severas quando comparadas com GAM. O componente extracelular do tecido apresentou características histológicas compatíveis com normalidade.

5.3.4 Grupos estressados sem exodontia (GAS, GRS, GVS)

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos achados morfológicos, foram também comparados os grupos sem hipofunção mastigatória, os quais revelaram algumas alterações semelhantes. Os três grupos apresentaram discrepâncias em relação ao tamanho das fibras musculares. No grupo GAS observou-se um padrão morfológico semelhante ao grupo GCS, mas com incidência de núcleos de localização central. Em GRS e GVS foi evidente maior número de fibras poligonais de tamanho grande, além de fibras com núcleos irregularmente localizados e sinais de atrofia em fibras pequenas. Em GVS foram destaque as fibras grandes com forma irregular e contorno mais arredondado. O tecido conjuntivo apresentou características histológicas normais em todas as variedades de estresse.

Figura 2 - Coloração por hematoxilina-eosina

5.4. Histoquímica para Succinato Desidrogenase (SDH) – Demonstração das enzimas oxidativas

Esta reação permitiu avaliar a atividade metabólica muscular diferenciando três intensidades de azul (fibras escuras, intermediárias e claras). As fibras escuras foram consideradas as de maior atividade metabólica pela alta quantidade de mitocôndrias coradas. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 3. Nas figuras com barras as letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

5.4.1 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse agudo

As fibras escuras aumentaram ($P<0.001$) em GAS (23.10 ± 5.473) quando comparado com GCM (9.300 ± 1.52) e GAM (12.20 ± 3.15); estas fibras também diminuíram ($P<0.01$) em GCM (9.30 ± 1.52) quando comparado com GCS (17.90 ± 1.71). O número de fibras claras foi significativamente maior em GCM ($P<0.01$) (48.35 ± 4.29) e GAM ($P<0.01$) (46.80 ± 5.93) quando comparados com GAS (34.00 ± 7.74). O estresse provocou aumento da atividade metabólica, no entanto a hipofunção mastigatória isolada ou associada ao estresse agudo diminuiu a atividade metabólica muscular (Figura 4).

5.4.2 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse crônico repetido

Em GRS aumentaram significativamente as fibras escuras (24.58 ± 2.16) quando comparado com os outros grupos (GCS: 17.90 ± 1.71 , GCM: 9.30 ± 1.52 , GRM: 15.60 ± 5.39) indicando que o estresse aumentou a atividade metabólica na ausência da exodontia. GCM apresentou diminuição significativa destas fibras quando comparado com GCS indicando que a exodontia diminuiu a atividade metabólica. As fibras intermediárias aumentaram significativamente em GRS (28.58 ± 2.47) quando comparado com GCS (21.80 ± 3.25) e GCM (20.80 ± 2.84). As fibras claras diminuíram ($P<0.01$) em GRS (23.52 ± 4.47) quando comparado com os demais grupos (GCS: 40.00 ± 4.48 , GCM: 48.35 ± 4.29 , GRM: 37.75 ± 9.36). (Figura 5).

Figura 3 - Histoquímica para SDH. Fibras claras, intermediárias e escuras.

Figura 4 - Succinato deshidrogenase (SDH). Grupos Controle Vs Grupos Estresse Agudo.

Figura 5 - Succinato desidrogenase (SDH). Grupos Controle Vs Grupos Estresse Crônico Repetido.

5.4.3 Atividade da succinato desidrogenase em grupos submetidos ao estresse crônico variado

As fibras escuras aumentaram ($P<0.01$) em GVS (24.70 ± 4.58) quando comparado aos outros grupos (GCS: 17.90 ± 1.71 , GCM: 9.30 ± 1.52 , GVM: 5.25 ± 0.93); GVM apresentou diminuição significativa destas fibras. GCM e GVM tiveram diminuição destas fibras quando comparados como GCS e GVS. As fibras claras diminuíram significativamente em GVS (28.60 ± 7.67) quando comparado aos demais grupos (GCS: 40.00 ± 4.48 , GCM: 48.35 ± 4.29 , GVM: 53.60 ± 4.83); estas fibras aumentaram ($P<0.05$) em GVM quando comparado com GCS e GVS. (Figura 6).

5.4.4 Diferenças dos efeitos dos estresses na atividade da succinato desidrogenase em sujeitos com dentição completa

As fibras intermediárias aumentaram significativamente em GRS (28.58 ± 2.47) quando comparado com GCS (21.80 ± 3.25) e GAS (20.95 ± 2.01); GRS também apresentou diminuição significativa ($P<0.01$) das fibras claras (23.52 ± 4.47) quando comparado com GCS (40.00 ± 4.48). (Figura 7).

5.4.5 Diferenças dos efeitos da associação entre os estresses e a exodontia na atividade da succinato desidrogenase

As fibras escuras diminuíram ($P<0.05$) em GCM (9.30 ± 1.52), GAM (12.20 ± 3.15) e GVM (5.25 ± 0.93) quando comparados com GCS (17.90 ± 1.71). As fibras claras aumentaram ($P<0.05$) em GVM (53.6 ± 4.83) quando comparado com GCS (40.00 ± 4.48). (Figura 8).

Figura 6 - Succinato desidrogenase (SDH). Grupos Controle Vs Grupos Estresse Crônico Variado.

Figura 7 - Succinato desidrogenase (SDH). Grupo Controle S Vs Grupos Estresse S.

Figura 8 – Succinato deshidrogenase (SDH). Grupos Controle Vs Grupos Estresse M.

5.5 Histoquímica para nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) – Demonstração das enzimas oxidativas

Esta reação permitiu avaliar a capacidade oxidativa do músculo pterigóideo medial diferenciando três intensidades de azul (fibras escuras-oxidativas, intermediárias oxidativas-glicolíticas e claras-glicolíticas). Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 9.

5.5.1 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse agudo

As fibras oxidativas-glicolíticas aumentaram ($P<0.001$) em GAS (30.40 ± 3.37) e GAM (29.36 ± 6.61) quando comparado com GCS (14.56 ± 1.71) e GCM (10.36 ± 2.28). Houve uma diminuição das fibras claras ($P<0.001$) em GAS (27.96 ± 5.18) e GAM (28.52 ± 7.27) quando comparado com GCS (44.32 ± 5.43) e GCM (52.84 ± 2.98). (Figura 10).

5.5.2 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse crônico repetido

Em GRS aumentaram ($P<0.001$) as fibras oxidativas-glicolíticas (31.68 ± 2.55) quando comparado aos outros grupos (GCS: 14.56 ± 1.71 , GCM: 10.36 ± 2.28 , GRM: 12.72 ± 2.50); estas fibras diminuíram significativamente em GCM quando comparado com GCS. As fibras oxidativas também apresentaram aumento ($P<0.001$) em GRS (38.92 ± 2.11) quando comparado aos outros grupos (GCS: 20.56 ± 4.97 , GCM: 15.48 ± 1.77 , GRM: 15.32 ± 2.49). As fibras glicolíticas diminuíram ($P<0.001$) em GRS (8.56 ± 0.79) quando comparado aos outros grupos (GCS: 44.32 ± 5.43 , GCM: 52.84 ± 2.98 , GRM: 51.32 ± 2.21); o número destas fibras aumentou ($P<0.05$) em GRM e GCM quando comparados com GCS e GRS. (Figura 11).

Figura 9 - Histoquímica para NADH. Fibras oxidativas, oxidativas-glicolíticas e glicolíticas.

Figura 10 - NADH desidrogenase. Grupos Controle Vs Grupos Estresse Agudo.

Figura 11 - NADH desidrogenase. Grupos Controle Vs Grupos Estresse Crônico Repetido.

5.5.3 Atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em grupos submetidos ao estresse crônico variado

Em GVS aumentaram ($P<0.001$) as fibras oxidativas-glicolíticas (24.96 ± 3.41) quando comparado aos outros grupos (GCS: 14.56 ± 1.71 , GCM: 10.36 ± 2.28 , GVM: 13.52 ± 3.23); As fibras oxidativas tiveram diminuição significativa em GVM (12.68 ± 4.01) quando comparado com GCS (20.56 ± 4.97). As fibras glicolíticas aumentaram ($P<0.001$) em GVM (53.32 ± 3.59) e GCM (52.84 ± 2.98) quando comparado com GVS (40.20 ± 3.37) e GCS (44.32 ± 5.43). (Figura 12).

5.5.4 Diferenças no efeito dos estresses na atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo em sujeitos com dentição completa

As fibras oxidativas-glicolíticas aumentaram ($P<0.001$) em GAS (30.40 ± 3.37), GRS (31.68 ± 2.55) e GVS (24.96 ± 3.41) quando comparados com GCS (14.56 ± 1.71). As fibras oxidativas também aumentaram ($P<0.001$) em GRS (38.92 ± 2.11) quando comparado aos outros grupos (GCS: 20.56 ± 4.97 , GAS: 20.00 ± 4.50 , GVS: 14.20 ± 2.91). As fibras glicolíticas diminuíram ($P<0.001$) em GRS (8.56 ± 0.792) e GAS (27.96 ± 5.18) quando comparados com GCS (44.32 ± 5.43) e GVS (40.20 ± 3.37). Estas fibras foram significativamente menores em GRS quando comparado com GAS. (Figura 13).

5.5.5 Diferenças no efeito da associação entre os estresses e a exodontia na atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo

As fibras oxidativas-glicolíticas aumentaram ($P<0.001$) em GAM (29.36 ± 6.61), quando comparado aos outros grupos (GCS: 14.56 ± 1.71 , GCM: 10.36 ± 2.28 , GRM: 12.72 ± 2.50 , GVM: 13.52 ± 3.23). As fibras oxidativas tiveram diminuição significativa em GVM (12.68 ± 4.01) quando comparado com GCS (20.56 ± 4.97) e GAM (20.84 ± 2.56). As fibras glicolíticas aumentaram ($P<0.001$) em GCM (52.84 ± 2.98), GRM (51.32 ± 2.21) e GVM (53.32 ± 3.59) quando comparados com GCS (44.32 ± 5.43); estas fibras foram significativamente menores em GAM (28.52 ± 7.27) quando comparado com GCS. (Figura 14).

Figura 12 - NADH desidrogenase. Grupos Controle Vs Grupos Estresse Crônico Variado.

Figura 13 - NADH desidrogenase. Grupo Controle S Vs Grupos Estresse S.

Figura 14 - NADH desidrogenase. Grupos Controle Vs Grupos Estresse M.

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

A fluorescência emitida pelas espécies reativas manifesta-se pela intensidade de luz vermelha nos núcleos celulares. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 15.

Todos os estresses associados à maloclusão tenderam ao aumento do estresse oxidativo; em GVS foi também observada esta tendência. Só em GVS ROS foi significativamente maior (254.85 ± 0.17) quando comparado com GCM (229.45 ± 23.95). (Figura 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. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 17.

Aumento significativo do número de capilares foi observado em GAS (173.80 ± 36.79), GRS (180.36 ± 22.95) e GVS (189.72 ± 30.07) quando comparados com GCS (116.16 ± 21.71). (Figura 18).

5.7.2 Laminina

A imunodectecção da laminina também revelou a presença de capilares por coloração marrom. Uma fotomicrografia representativa de cada grupo pode ser observada na Figura 19.

A análise qualitativa das microfotografias revelou diminuição da luz dos capilares nos grupos com exodontia. Os capilares dos grupos GRS e GAS mostraram contorno regular e maior calibre em comparação com os capilares de GAM, GRM, GCS e GCM.

Considerando possíveis anormalidades anatômicas microvasculares ou eventuais dificuldades na imunomarcagem para Alfa-CD 31 foram utilizados campos de alta qualidade marcados com laminina para complementar a contagem por senso.

59

Figura 15 - Histoquímica para espécies reativas de oxigênio (ROS)

Figura 16 – ROS. Grupos Controle Vs Grupos Estresse.

Figura 17 - Imunoistoquímica para Alfa CD-31. Os capilares estão marcados de cor marrom.

Figura 18 – Detecção de capilares por Alfa CD-31. Grupos Controle VS Grupos Estresse.

Figura 19 - Imunoistoquímica para laminina. Capilares contornados de cor marrom.

6 DISCUSSÃO

Na atualidade este estudo constitui o único trabalho que avaliou as alterações morfológicas e fisiológicas do músculo pterigóideo medial, em modelo animal submetido a condições de estresse e exodontia. Estudos prévios realizados em outros músculos mastigatórios têm utilizado metodologias de estresse físico ou psicológico, as quais reproduzem os eventos fisiológicos que ocorrem nos humanos durante situações estressoras. Neste modelo foram usadas situações de estresse físico descritas há duas décadas por Murua e Molina (1992) e posteriormente por Gomez et al (1998) e outros autores (CHEN et al, 2010; WILLNER, 2005). A resposta fisiológica ao estresse agudo permitiu comparar e analisar os efeitos adversos do estresse prolongado em sujeitos com e sem edentulismo unilateral. Os animais foram submetidos aos protocolos de estresse agudo e crônico (repetido e variado), cujas condições experimentais foram devidamente controladas; recursos de alta qualidade foram usados durante o processamento das amostras.

Os dois fatores de variação usados no modelo (estresse e exodontia) são condições de alta incidência e prevalência na população geral. A relação de causalidade desses fatores associados ainda não tinha sido considerada na patogênese das desordens funcionais dos músculos mastigatórios. Os resultados obtidos forneceram dados para melhor compreensão dos mecanismos patogênicos das DTM ainda pobremente entendidos e constituem uma ferramenta para seu diagnóstico e tratamento.

6.1 Níveis de corticosterona plasmática

Os resultados do nível de corticosterona plasmática permitiram comprovar a presença do estresse até o momento da remoção do músculo. Os três tipos de estresse aplicados aos animais estimularam a produção do córtex suprarrenal como reportado nos estudos realizados por Chappell et al (1986), Gomez et al (1998) e Li et al (2011).

A determinação da significância estatística dos níveis de corticosterona é fundamental num próximo estudo, porque alguns resultados devem ser analisados mais profundamente. Dos grupos estressados sem alteração oclusal, o grupo GRS apresentou o nível mais baixo do hormônio, sugerindo um possível processo endócrino adaptativo. A presença da exodontia aumentou os níveis hormonais, mas no grupo GVM o resultado foi surpreendentemente mais baixo que no grupo GCM. Na ausência de estudos comparativos semelhantes, não foi possível argumentar este dado.

6.2 Variação do peso no período experimental

O peso dos animais não foi afetado pela exodontia, dado que corresponde com o resultado obtido por Bani et al (1999). Dentre os protocolos usados neste estudo só o estresse crônico repetido diminuiu o peso dos animais. Há evidência de que o estresse psicológico prolongado diminui o peso corporal (GOMEZ et al, 1998; LI et al, 2011). No entanto o estresse crônico variado não alterou o peso dos animais; possivelmente pelo fato deste tipo de estresse ser inesperado e de curta duração, mecanismos eficientes restabeleceram a homeostase corporal sem alterar a massa corporal total. Porém, sugere-se que situações estressoras diferentes e de breve duração, mas persistentes por longo período poderiam diminuir os níveis de tolerância fisiológica alterando o peso corporal.

6.3 Alterações da morfologia celular (HE)

Foi confirmado que o estresse e a exodontia provocam alterações morfológicas no músculo pterigóideo medial. Considerando a maloclusão isoladamente, a avaliação qualitativa das fibras musculares mostrou dados semelhantes aos relatados por Dicker et al (2012), que descreveram características dismórficas nas fibras e diminuição no comprimento dos fusos neuromusculares nos músculos masseter e pterigóideo medial após da cirurgia de avanço mandibular. A diminuição da dimensão vertical maxilo mandibular (produzida entre outras causas, pela perda dos dentes posteriores) tem provocado a diminuição da área transversal e do volume total dos músculos elevadores mandibulares (DICKER et al, 2007). Bani et al (1999) não encontraram alterações morfológicas no músculo masseter após a hipofunção gerada pelo desgaste da superfície oclusal dos molares; porém nossos dados conferem com os achados de Iyomasa et al (2009b) que descreveram sinais de alteração das fibras, núcleos de localização central e diminuição do diâmetro dos miócitos no músculo pterigóideo medial de gerbis após a exodontia unilateral. Este trabalho sugere que a hipofunção mastigatória induzida pela exodontia é um importante fator indutor de sinais de atrofia muscular.

Neste estudo todos os tipos de estresse provocaram alterações morfológicas. O estresse psicológico também é conhecido como fator indutor de atrofia muscular, apoptose dos miócitos e lesões agudas nas fibras musculares (BJURSTRÖM et al, 1995; ENGELBRECHT

et al, 2010). O aumento dos glicocorticoides durante a ativação do sistema simpático foi já relacionado com atrofia no músculo masseter (MARTRETTE et al, 2004); este aumento está ligado com a redução da síntese de proteínas miofibrilares, o aumento do seu catabolismo e uma redução na reserva de proteínas (ODEDRA et al, 1983; SEENE; VIRU, 1982). Neste estudo as alterações morfológicas provocadas pelo estresse e a hipofunção foram isoladas, resultado semelhante ao obtido por Antonova (2008) em músculo bucinador usando o nado forçado como situação estressora, quando identificou hipertrofia de fibras individuais, focos com edema e degradação, desenvolvimento de fibrose leve, perda de estrias transversais e núcleos em posição irregular. Em GAS houve ausência de alterações no tamanho ou contorno celular, mas foi notória a localização irregular dos núcleos, achado que pode estar ligado com processos apoptóticos; este grupo não apresentou sinais de atrofia muscular pela curta duração da situação estressora. Os efeitos do estresse parecem estar relacionados principalmente com a liberação de catecolaminas (adrenalina), citocinas (IL-6) e enzimas (mieloperoxidases). Desta forma é possível que tais modificações induzidas pelo estresse sejam resultado de expressões gênicas diferenciais ou alteração hormonal em regiões específicas dos músculos mastigatórios (CVETKO; ERZEN, 2001). A alteração da função da glândula tireóide durante o estresse também tem sido postulada (D'ALBIS et al, 1990). A associação de estresse crônico e exodontia revelou efeitos mais severos quando comparada com a presença do estresse isolado; a alteração celular severa observada nestes grupos pode ser resultado do potente efeito indutor de atrofia quando os dois fatores estão conjugados. Neste modelo as alterações morfológicas foram moderadas. Recomenda-se um estudo futuro com maior duração do protocolo de estresse e a avaliação ultraestrutural por meio de microscopia eletrônica.

6.4 Metabolismo celular-Capacidade oxidativa (SDH-NADH)

Os efeitos do estresse crônico e da exodontia no metabolismo muscular foram os achados mais interessantes em este estudo. No músculo esquelético o metabolismo está relacionado com a velocidade de contração das fibras e duas categorias podem ser encontradas: fibras de contração rápida (tipo IIa ricas em mitocôndrias, IIb pobres em mitocôndrias e fibras intermediárias), e fibras de contração lenta (tipo I). As fibras tipo I são responsáveis por funções de manutenção, pelo qual precisam de abundante suprimento de ATP; seu metabolismo é aeróbico, são resistentes à fadiga, sensíveis à falta de oxigênio, ricas

em mioglobina e cercadas por uma rede capilar densa. As fibras do tipo II possuem menos mioglobina, sua atividade ATPase é alta e a obtenção de energia é através da glicólise (MIEHE et al, 1999).

Os resultados da atividade de SDH e NADH desidrogenase foram obtidos por contagem dos três tipos de fibras após as colorações. NADH é uma coenzima que participa em reações de óxido redução na cadeia respiratória no interior das mitocôndrias (complexo I) e na glicólise citoplasmática, transportando elétrons e átomos de hidrogênio de alta energia (CZARNECKA et al, 2010). Por sua vez 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) (BRIERE et al, 2005), o qual produz a energia necessária para a contração muscular (MIEHE et al, 1999). A importância destas moléculas na síntese de trifosfato de adenosina (ATP – principal fonte de energia celular) as converte em marcador fundamental do estado metabólico celular e especificamente da capacidade oxidativa dos tecidos em situações fisiológicas e patológicas (CEBASEK et al, 2006; GRIVENNIKOVA et al, 2010). Neste modelo estas reações permitiram diferenciar se o metabolismo das fibras do músculo pterigoideo medial foi oxidativo ou glicolítico dependendo da quantidade de mitocôndrias coradas. Na ausência da exodontia o estresse isolado aumentou a atividade metabólica e a capacidade oxidativa muscular, enquanto a exodontia isolada ou a associação dos dois fatores diminuiu estes parâmetros, como descrito por Miehe et al (1999). Sinais de atrofia muscular e aumento das fibras glicolíticas IIb já tinham sido descritas no músculos elevadores mandibulares depois da redução da função mastigatória (TSAI et al, 2012).

Neste modelo, o músculo pterigóideo medial normal (GCS) mostrou nas reações de SDH e NADH três tipos de fibras: Claras (42%), intermediárias (22%) e escuras (16%). Previamente Gauthier e Lowey (1979) e Katsura et al (1982) também demonstraram por histoquímica para SDH que este músculo em ratos possui fibras claras rápidas, fibras intermediárias rápidas e fibras escuras lentas; usando esta mesma reação Matsumoto e Katsura (1987) descreveram a distribuição destes três tipos de fibras em oito regiões musculares. Abundantes fusos neuromusculares foram descritos em relação com fibras escuras e localizados principalmente no feixe medial do músculo (ROKX et al, 1984). Foi então confirmado que o músculo pterigóideo medial de ratos em condições de normalidade apresenta os três tipos de fibras, sendo as mais predominantes as claras de metabolismo glicolítico.

Como esperado, a resposta ao episódio de estresse agudo mostrou aumento da

atividade metabólica e a capacidade oxidativa nos animais deste experimento, ainda na presença da maloclusão. Este achado corresponde à resposta fisiológica normal provocada pela ativação do sistema nervoso simpático com o intuito de aumentar o gasto energético (CUESTA; SINGER, 2012). Sugere-se que o efeito foi mais pronunciado em sujeitos com dentição completa por causa da contração isométrica que experimentam os músculos elevadores durante o contato oclusal posterior. O episódio de restrição física usado por duas horas neste modelo de estresse agudo sugere um rápido aumento mitocondrial para responder às demandas energéticas.

Na histoquímica para SDH, o estresse crônico (repetido e variado) aplicado nesta metodologia teve um efeito notável no aumento do metabolismo muscular em sujeitos com dentição completa. Um achado semelhante foi também observado no grupo GRM. Surpreendentemente o grupo GVM mostrou uma significativa diminuição da atividade metabólica muscular. Quando comparado com os outros estresses, o crônico repetido provocou um aumento mais pronunciado da atividade metabólica do músculo pterigóideo medial, mesmo na presença da hipofunção mastigatória. Este resultado poderia estar relacionado com o maior tempo de exposição neste protocolo. Estas variações drásticas no metabolismo podem ter um papel importante no desenvolvimento da desordem muscular dolorosa. Há relatos de que os efeitos do estresse na fisiologia muscular dependem do tempo e são mais severos com o estresse prolongado; assim dramáticas alterações no metabolismo energético dos músculos mastigatórios podem representar um mecanismo na patogênese das DTM (CHEN et al, 2010).

A avaliação da atividade metabólica muscular por meio de SDH revelou que a maloclusão isolada ou associada ao estresse variado aumentou as fibras claras-glicolíticas. Este aumento de fibras claras foi também encontrado nos músculos supra-hióideos após a exodontia unilateral esquerda (IYOMASA et al, 2008b; IYOMASA et al, 2009a). Estas fibras glicolíticas que aparecem claras pela baixa quantidade de mitocôndrias coradas por SDH ou NADH desidrogenase são base para determinar que o tipo de metabolismo predominante é anaeróbico (PETER et al., 1972). De modo semelhante uma análise da composição dos músculos mastigatórios usando NADH desidrogenase sob condições de dimensão vertical diminuída revelou uma redução temporal das fibras musculares IIa (ricas em mitocôndrias), as quais foram reconhecidas porque foram coradas por um azul mais profundo do que as fibras musculares tipo IIB (SEIRYU et al, 2012). Diante do exposto, infere-se que a maloclusão é um poderoso fator indutor da transformação anaeróbica do metabolismo muscular, tanto isoladamente quanto associada ao estresse variado prolongado.

A capacidade oxidativa do músculo pterigóideo medial determinada por meio de NADH aumentou significativamente nos animais com dentição completa submetidos ao estresse crônico repetido. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com o estresse agudo, porém contrários aos que justificam o aparecimento das DTM por aumentar o metabolismo oxidativo, mas no caso do estresse agudo era o esperado porque este constitui uma resposta fisiológica normal. Por outro lado em sujeitos sem edentulismo o estresse crônico variado tendeu à transformação glicolítica do músculo. Do mesmo modo, na presença da exodontia o grupo com estresse variado aumentou o metabolismo glicolítico e o estresse repetido mostrou a mesma tendência metabólica. Esses dados são fortalecidos com os relatos de Chen et al (2010) quando o estresse crônico e a ansiedade aumentaram a atividade da enzima lactato desidrogenase e diminuíram a atividade das enzimas sódio-potássio ATPase e cálcio ATPase, indicando que as fibras do músculo masseter de ratos se transformaram em glicolíticas. Há relatos de que em situações de estresse, as alterações da função mitocondrial e a hipoxemia gerada pela diminuição da perfusão sanguínea são fatores fundamentais no desenvolvimento das desordens funcionais dos músculos da mastigação (HIDAKA et al, 2004a; HIDAKA et al, 2004b; ZEREDO et al, 2009). Sugere-se que a hipoperfusão é consequência tanto do colapso dos capilares durante a contração muscular prolongada (INTRIERI et al, 1994; KIM et al, 1999; SIEBER et al, 2003), quanto da vasoconstrição das arteríolas musculares induzida pela adrenalina (ROATTA et al, 2009). Neste modelo o músculo pterigóideo medial homolateral ao edentulismo parcial mostrou uma transição com aumento das fibras claras-glicolíticas de metabolismo predominantemente anaeróbico. Desta forma as modificações mitocondriais e metabólicas causadas pelo estresse crônico em sujeitos com hipofunção mastigatória podem estar envolvidas na patogenia das DTM.

Foi notório o efeito da hipofunção mastigatória na diminuição da atividade metabólica e da capacidade oxidativa do músculo pterigóideo medial, embora ainda tenha pouca evidência para afirmar que as alterações oclusais são fatores etiológicos no desenvolvimento das DTM. Características dentais e condições relacionadas com o tamanho e a posição dos maxilares têm sido consideradas. Em animais, interferências oclusais têm provocado o aumento do contato dental (BUDTZ-JØGENSEN, 1980) e hiperatividade muscular (SHOJI et al, 1994); a combinação de interferência oclusal e estresse crônico tem induzido uma reação inflamatória local forte pelo aumento na produção de IL-6 em músculo masseter (SIMONIC-KOCIJAN et al, 2012), mas não têm sido fatores relevantes no desgaste dental (GOMEZ et al, 1998); a hipofunção induzida pelo desgaste oclusal dos molares também tem produzido lesões musculares distribuídas regionalmente que envolvem preferencialmente áreas de tecido

composto por fibras tipo I (BANI et al, 1999). Miehe et al (1999) observaram que a alteração na composição dos tipos de fibra muscular no masseter após a extração molar ou dieta mole foi transitória e retornou a sua composição original. Em humanos a correção da maloclusão com mordida aberta aumentou as fibras do tipo I no músculo masseter e o tratamento das mordidas profundas incrementou as fibras do tipo IIb (ROWLERSON et al, 2005). A diminuição dos fusos neuromusculares, dos estímulos aferentes e da atividade reflexa também foi descrita após a diminuição da dimensão vertical (MORIMOTO et al, 1996). Pelos resultados observados com a associação entre exodontia e estresse sugere-se que o estresse crônico é um cofator agravante das alterações morfológicas e fisiológicas provocadas pela hipofunção mastigatória. Em indivíduos com edentulismo parcial unilateral submetidos ao estresse variado prolongado pode ocorrer uma diminuição do nível de tolerância fisiológica levando ao desenvolvimento de disfunção muscular e dor.

Os efeitos do estresse e da exodontia sobre o metabolismo do músculo pterigóideo medial foram evidentes neste estudo, mas os eventos ultraestruturais que acontecem no interior dos miócitos ainda não estão bem esclarecidos. Além das alterações metabólicas, a adaptação interna das miofibrilas também acontece; com novas demandas funcionais os músculos mastigatórios podem se adaptar rapidamente, alterando a composição das fibras rápidas (tipo II) (SFONDRINI et al, 1996). Modificações nas fibras lentas (tipo I) são também comuns; assim condições funcionais que aumentam a atividade neuromuscular (estresse) ou a carga de trabalho provocam uma transição do tipo de fibras IIb a IIa, ou de fibras IIa para fibras tipo I e vice-versa. A velocidade da contração muscular depende fundamentalmente do tipo de cadeia pesada de miosina presente nas fibras musculares. Durante os episódios de estresse psicológico, modificações hormonais e dos músculos mastigatórios estão acompanhadas pelo aumento de isoformas mais rápidas desta proteína (CVETKO; ERZEN, 2001); um aumento na expressão de RNA mensageiro para sintetizar miosina IIb foi também induzida pela dieta mole (SAITO et al, 2004). Neste estudo o metabolismo glicolítico observado durante o estresse crônico variado associado à exodontia poderia ser caracterizado pelo aumento das fibras tipo IIb. Imediatamente após a diminuição súbita da dimensão vertical oclusal, muda a composição das fibras tipo IIb para IIa, ocorrendo depois um processo de adaptação rápido pela coordenação adequada entre os sinais dos receptores sensitivos e dos centros superiores retornando as características anteriores (SEIRYU et al, 2012). Um estudo futuro poderia avaliar por meio da imunoistoquímica a cadeia pesada de miosina presente no músculo pterigóideo medial após o estresse crônico associado à exodontia.

6.5 Estresse Oxidativo (Produção de espécies reativas de oxigênio-ROS)

Houve uma tendência ao desequilíbrio na produção de ROS em relação aos fatores de variação. Em sujeitos com dentição completa, submetidos ao estresse crônico variado houve uma tendência ao aumento na produção das espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, a exodontia unilateral isolada tendeu à diminuição do estresse oxidativo possivelmente pela diminuição da função muscular, mas associada com qualquer tipo de estresse provocou o aumento na produção de ROS. Em circunstâncias normais, existe um delicado equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes no organismo. Está estabelecido que as alterações metabólicas são acompanhadas pela alteração na produção destas espécies de oxigênio. 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; MØLLER et al, 1996). Durante a intensa atividade contrátil dos músculos esqueléticos, as mitocôndrias geram fluxos elevados de ROS, desencadeando diferentes vias de sinalização que induzem respostas divergentes desde a adaptação até a morte celular (BARBIERI; SESTILI, 2012). No músculo esquelético o estresse oxidativo acompanha as alterações hemodinâmicas (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004) causando dano molecular na estrutura e função das células pela modificação do sistema antioxidante (CHANG et al, 2007; POWERS; JACKSON, 2008). Os radicais livres produzem a oxidação química direta de muitas proteínas musculares, levando a mudanças em sua conformação estrutural e sua atividade (STEINBERG, 2013). O estresse oxidativo elevado está envolvido na patogênese de síndromes da disfunção e dor dos músculos mastigatórios (GEDRANGE et al, 2001; SPASSOV et al, 2011). Neste modelo não foi possível estabelecer que houve dano oxidativo nas fibras musculares; a resposta ao estresse oxidativo é muito complexa e depende do local de produção de ROS, da persistência do fluxo de radicais livres e do estado antioxidante do músculo. No entanto, sugere-se que sujeitos com hipofunção mastigatória e estresse prolongado são mais susceptíveis as DTM por lesão oxidativa.

6.6 Densidade Capilar (Alfa CD-31 e Laminina)

Neste modelo o estresse aumentou significativamente os capilares musculares em

sujeitos com dentição completa; esta resposta corresponde fisiologicamente com a vasodilatação inicial e o aumento da perfusão muscular para sustentar o maior metabolismo oxidativo. Foi observado aumento do diâmetro dos capilares nos grupos submetidos ao estresse crônico, principalmente no grupo repetido, em concordância com os achados de Chen et al, 2010. Nos grupos submetidos ao estresse crônico, o aumento dos capilares poderia também significar uma resposta compensatória à hipoxemia produzida pela contração muscular e a contração adrenérgica das arteríolas musculares durante o estresse prolongado. Berdina et al (1972) demonstraram que mesmo na deficiência de oxigênio resultante de alterações metabólicas causadas pelo sistema nervoso simpático, o estresse emocional aumenta a atividade muscular. A maloclusão por hipofunção mastigatória revelou uma tendência ao aumento dos capilares; o resultado previsto era sua diminuição, considerando o aumento do metabolismo glicolítico; porém, esse achado pode sugerir um aumento adaptativo da função muscular após a exodontia. Esta tendência ao aumento da densidade capilar pode também refletir a atrofia das fibras por hipoperfusão e redução do lúmen dos microvasos. A associação entre estresse e exodontia provocou um aumento moderado da densidade capilar quando comparado com o efeito produzido pelo estresse ou a hipofunção isolados. A constrição dos capilares constituiu uma observação qualitativa importante nos grupos com exodontia; capilares com lúmen reduzido e contorno irregular no músculo pterigóideo medial, ipsilateral à extração de molares já tinham sido descritos por Iyomasa et al (2009b). Além da vasoconstrição, o dano às células endoteliais e acúmulo de Ca^{++} no interior das fibras são características descritas no músculo masseter ipsilateral à exodontia, indicando que a lesão isquêmica é um evento precoce no início do dano do tecido muscular após alteração oclusal (BANI et al, 1999). Os resultados deste modelo confirmam que o aumento de capilares por fibra muscular indica o fator hemodinâmico, o qual pode atuar mais para remover metabólitos que para distribuir suplemento (EGGINTON; HUDLICKÁ, 2000). A lesão isquêmica deve ser estudada com maior profundidade nos músculos em hipofunção mastigatória submetidos ao estresse prolongado. É importante a realização de posteriores metodologias que permitam esclarecer com maior detalhe as condições hemodinâmicas e o consumo de oxigênio no músculo pterigoideo medial de sujeitos com ausência dental que estão submetidos ao estresse crônico variado.

Os três tipos de estresse usados neste trabalho acontecem no cotidiano e permitem reconhecer o limiar onde estímulos persistentes e respostas corporais alteradas podem induzir o aparecimento de doenças. Na atualidade, o ritmo acelerado da sociedade globalizada está

caracterizado pela ocorrência de situações estressoras físicas e psicológicas; níveis variáveis de estresse e ansiedade são denominadores comuns das pessoas em grandes e pequenas cidades. Durante o dia inúmeras situações de estresse agudo acometem as pessoas ativando respostas fisiológicas temporais, que protegem o organismo de possíveis danos. Os efeitos do estresse agudo descritos neste estudo (inócuos por natureza) constituem um parâmetro comparativo para estimar o potencial patogênico de respostas intensas em condições de estresse prolongado. Complexas interações entre fatores biológicos, psicológicos e sociais condicionam a resposta fisiológica ante o estresse crônico; o número e a intensidade das situações estressoras prolongadas que podem induzir um desequilíbrio na homeostase corporal e provocar um processo patológico dependem de fatores individuais. A aplicação das variáveis do estresse crônico (repetido e variado) permitiu neste modelo reproduzir respostas alteradas vinculadas com a etiologia das síndromes de dor e disfunção orofacial. Desde o início, a hipótese deste estudo foi que o estresse crônico variado tem maior incidência na população do que o estresse crônico repetido, mas pela heterogeneidade social as duas metodologias foram aplicadas. Foi comprovado que o estresse crônico tem efeitos nocivos sobre o músculo pterigóideo medial, sendo o estresse crônico variado mais compatível com a patogênese das DTM.

Estudos futuros deverão ser realizados para descrever com maior detalhe o efeito do estresse na produção de substâncias proinflamatórias e neurotransmissores relacionados com as intensas e persistentes dores que caracterizam algumas DTM, como a dor miofascial ou a mialgia crônica de mediação central. Determinar a importância real dos fatores envolvidos na etiologia e patogenia das DTM é fundamental para focar o seu tratamento, e este estudo permitiu descrever alterações musculares morfológicas e fisiológicas induzidas pelo estresse e a exodontia que podem resultar em disfunção e dor; assim pode se concluir que além da intervenção do estresse, a reabilitação de zonas edêntulas pode ter um impacto importante na terapia multidisciplinar que requerem as desordens funcionais dos músculos da mastigação. O objetivo primário da terapia das DTM musculares é a redução da dor e a recuperação da função normal, mas a dificuldade no tratamento dos pacientes com DTM crônicas é que a percepção da dor está mediada pelo sistema nervoso central. Em pacientes com DTM, altos níveis de estresse podem induzir hiperatividade muscular recorrente e afetar profundamente os processos biológicos de transmissão e percepção da dor (KATZ et al, 1989). O estresse crônico induz efeitos generalizados sobre os neurônios das colunas dorsais da medula espinal e aumenta a resposta aos neurotransmissores aferentes liberados por estímulos mecânicos vindos da ATM e da pele do rosto (OKAMOTO et al, 2012); além disso, aumenta a

sensibilidade mecânica nos músculos mastigatórios (HUANG et al, 2011) e altera as respostas nociceptivas orofaciais (GAMEIRO et al, 2005). Durante o estresse aumenta a atividade eletromiográfica orofacial (TSAI et al, 2002) e esta hiperatividade constitui um microtrauma; nos músculos que sofrem traumas mecânicos a aplicação de estímulos que normalmente são inócuos resulta em dor muscular (MCMILLAN; BLASBERG, 1994). A influência de uma situação estressora na percepção da dor é provavelmente independente da simples ativação de nociceptores periféricos e os processos de sensibilização neurológica podem explicar a persistência da dor, atribuída no passado ao comportamento psicológico (VEDOLIN et al, 2009). Os complexos efeitos do estresse psicológico prolongado sobre o sistema nervoso central e periférico precisam também ser estudados com maior detalhe.

Um processo adaptativo ao estresse crônico pode ter acontecido neste estudo. A alta capacidade de adaptação dos animais aos longos períodos de estresse é um problema que precisa ser resolvido (CHEN et al, 2010; LI et al, 2011). Um estudo longitudinal envolvendo a associação entre estresse crônico variado e exodontia precisa ser desenvolvido. Parece que os músculos da mastigação adaptam-se às mudanças oclusais menores e ao estresse crônico sem alterar a percepção da dor, mas quando estes dois fatores etiológicos propostos trabalham juntos podem intensificar a resposta dolorosa (HARTMANN et al, 1999). A adaptação morfológica, bioquímica e ultraestrutural que ocorre após a mastigação unilateral pode mudar quando associada ao estresse repetido ou variado persistente.

A variabilidade individual na resposta ao estresse e a exodontia também foi observada neste modelo. O conceito de estímulo-resposta-especificidade significa que diferentes estímulos provocam respostas de excitação diferentes em indivíduos diferentes (BIBBEY et al, 2012; LACEY, 1950). Sob as mesmas condições de estresse uns sujeitos podem iniciar rapidamente deficiências de saúde, enquanto outros mostram tolerância individual (HOISINGTON; HOISINGTON, 2000). A resposta individual tem significado etiológico nas síndromes de disfunção dos músculos mastigatórios (KAPEL; MCGLYNN, 1989) e neste modelo, estresses de magnitude idêntica podem ter produzido reações diferentes em indivíduos distintos. Respostas diferenciadas da musculatura mastigatória são perfeitamente possíveis após a aplicação de diferentes estressores, mas é fato que fatores psicológicos como o estresse e a alteração oclusal na presença de uma diminuição da tolerância fisiológica podem resultar no desenvolvimento de DTM (OKESON, 1995).

Os resultados obtidos neste estudo podem ser extrapolados aos outros músculos elevadores mandibulares de animais e humanos. Sugere-se que a dor e disfunção do músculo pterigóideo medial são tão prevalentes e incapacitantes quanto às desordens do músculo

masseter e podem ser consequência de modificações estruturais e metabólicas induzidas pelo estresse. Este modelo reforça a importância de um diagnóstico adequado deste músculo na presença de sinais e sintomas de DTM, assim como a necessidade de mais estudos anatomopatológicos avaliando diferentes fatores de variação.

7 CONCLUSÕES

1. O peso corporal total diminui nas condições de estresse crônico repetido, mas não é alterado pelos estresses agudo, 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.

3a. O estresse agudo tende ao aumento da atividade metabólica, mesmo na presença da maloclusão, mas o efeito é mais pronunciado em sujeitos com a dentição completa. O estresse sistêmico crônico associado à exodontia diminui a atividade metabólica muscular sendo o efeito mais pronunciado com o estresse crônico variado.

3b. O estresse agudo associado ou não à maloclusão aumenta a capacidade oxidativa. Os estresses crônicos associados à maloclusão diminuem a capacidade oxidativa muscular, mas no estresse crônico variado a resposta é mais significativa. A maloclusão isolada diminui tanto a atividade metabólica quanto a capacidade oxidativa.

4. A associação entre qualquer tipo de estresse e a maloclusão tende ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo efeito é produzido pelo estresse crônico variado em sujeitos com dentição completa.

5. No estresse agudo aumenta a densidade capilar muscular, mas quando associado à exodontia este efeito é menos proeminente. O estresse crônico aumenta a densidade capilar no músculo de sujeitos com dentição completa.

A presença do estresse e a exodontia isolados ou associados afeta a morfologia e a função do músculo pterigoideo medial. Os sinais de atrofia muscular, as alterações hemodinâmicas, as mudanças no metabolismo muscular e a tendência ao desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio, são efeitos do estresse crônico que podem ser fatores na etiopatogenia das DTM com ou sem a presença do edentulismo unilateral. Conclui-se que as alterações morfológicas e fisiológicas do músculo pterigóideo medial em sujeitos com estresse crônico e hipofunção mastigatória, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de DTM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ANISMAN H, Z. R. Depression: the predisposing influence of stress. *Behav Brain Sci*, v. 5, p. 89–137. 1982.

ANTONIO, R. C. et al. Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. *Mol Cell Biochem*. 2013.

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

BADEL, T; et al. Temporomandibular disorders and occlusion. *Acta Clin Croat*. 51: 419-24. 2012.

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.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10576170>.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11813885>.

BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*, v. 2012, p. 982794, 2012. ISSN 2090-1747 (Electronic) 2090-1747 (Linking).

BAVERSTOCK, H.; JEFFERY, N. S.; COBB, S. N. The morphology of the mouse masticatory musculature. *J Anat*. 2013. ISSN 0021-8782.

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

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17826114>.

BENOLIEL, R. et al. Persistent orofacial muscle pain. *Oral Dis*, v. 17, n. 1, p. 23-41, 2011.

BERDINA, N. et al. Increase in skeletal muscle performance during emotional stress in man *Circ Res*, v. 30, n. 6, p. 642-50, 1972.

BEUKES, J.; REYNEKE, J. P.; BECKER, P. J. Medial pterygoid muscle and stylomandibular ligament: the effects on postoperative stability. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 42, n. 1, p. 43-8, Jan 2013. ISSN 0901-5027.

BHOYAR, P. 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, p. 45-50. 2012.

BIBBEY, A. et al. Personality and physiological reactions to acute psychological stress. *Int J Psychophysiol*, p. 295-312, 2012.

BJURSTRÖM, S. et al. Distribution and morphology of skeletal muscle lesions after experimental restraint stress in normal and stress-susceptible pigs. *Zentral bl Veterinar med A*, v. 42, n. 9, p. 575-87, 1995.

BLACK, P. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 16, n. 6, p. 622-653, 2002.

BLISS, A. J. Relationship of stress and activity to brain dopamine and homovanillic acid. *Life Sciences*, v. 10, n. 20, p. 1161-1169, 1971.

BOTELHO, A. P. et al. The effects of acute restraint stress on nociceptive responses evoked by the injection of formalin into the temporomandibular joint of female rats. *Stress*, v. 13, n. 3, p. 269-75, May 2010. ISSN 1607-8888 (Electronic) 1025-3890 (Linking).

BOVE, M. et al. Psychosocial factors and metabolic parameters: is there any association in elderly people? The Massa Lombarda Project. *Aging Ment Health*, v. 14, n. 7, p. 801-6, Sep

2010. ISSN 1364-6915. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20635238>.

BRESIN, A. and KILIARIDIS, S. Dento-skeletal adaptation after bite-raising in growing rats with different masticatory muscle capacities Eur J Orthod, v. 24, p. 223–37. 2002.

BRESIN, A. et al. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat: Eur J Oral Sci, v. 107, p. 35-44. 1999.

BRIERE, J. et al. Succinate dehydrogenase deficiency in human: Cell Mol Life Sci, v. 62, p. 2317-24. 2005.

BUDTZ-JØGENSEN, E. Bruxism and trauma from occlusion. An experimental model in Macaca monkeys. J Clin Periodontol, v. 7, n. 2, p. 149-62, 1980.

BYRD, K. Characterization of brux-like movements in the laboratory rat by optoelectronic mandibular tracking and electromyographic techniques Archives of Oral Biology, v. 42, n. 1, p. 33–43, 1997.

CALLISTER, S. N., SEALS, D. R. Sympathetic activity is influenced by task difficulty and stress perception during mental challenge in humans. J Physiol, v. 454, p. 373-387, 1992.

CARLSON, C. R. et al. Psychological and physiological parameters of masticatory muscle pain. Pain, v. 76, n. 3, p. 297-307, Jun 1998. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959.

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

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>>.

CHANG, C. et al. Interaction of vitamin E and exercise training on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscles. J Nutr Biochem, v. 18, n. 1, p. 39–45, 2007.

CHAPPELL, P. B. et al. Alterations in corticotropin-releasing factor- like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neuroscience*, v. 6, p. 2908-2914, 1986.

CHEN, E. K.; HERRING, S. W. An unusual function for the medial pterygoid muscle in the guinea pig. *Arch Oral Biol*, v. 31, n. 11, p. 781-3, 1986. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969.

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.

CIENA, A. P. et al. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. *Micron*, v. 41, n. 8, p. 1011-4, Dec 2010. ISSN 0968-4328.

CLARK, G. T. A critical evaluation of orthopedic interocclusal appliance therapy: effectiveness for specific symptoms. *J Am Dent Assoc*, v. 108, n. 3, p. 364-8, Mar 1984. ISSN 0002-8177 (Print) 0002-8177 (Linking).

COX , P.; JEFFERY, N. Reviewing the morphology of the jaw-closing musculature in squirrels, rats, and guinea pigs with contrast-enhanced microCT. *Anat Rec*, v. 294, n. 6, p. 915-28, 2011.

CRUZ, D. Z.; RODRIGUES, L.; LUZ, J. G. Effects of detachment and repositioning of the medial pterygoid muscle on the growth of the maxilla and mandible of young rats. *Acta Cir Bras*, v. 24, n. 2, p. 93-7, Mar-Apr 2009. ISSN 0102-8650.

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

CVETKO, E.; ERZEN, I. Effect of chronic uncontrollable stress on myosin heavy chain expression in rat masseter muscle. *Pflugers Arch*, v. 442, n. 6 Suppl 1, p. R147-9, 2001. ISSN 0031-6768 (Print) 0031-6768.

CZARNECKA, A. et al. Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms as sporadic breast cancer risk factor. *Oncol Rep*, v. 23, p. 531-5. 2010.

D'ALBIS, A. et al. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem*, v. 193, p. 155–61, 1990.

DE ROSSI, S. Orofacial pain: a primer. *Dent Clin North Am*, v. 57, n. 3, p. 383-92, 2013.

DELCANHO, R. Masticatory muscle pain: a review of clinical features, research findings and possible mechanisms. *Aust Prosthodont J*, v. 9, p. 49–59, 1995.

DELEEuw, R.; BERTOLI, E.; SCHMIDT, J. Prevalence of anxiety in patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 63, p. 42-50, 2005.

DICKER, G. et al. Adaptation of jaw closing muscles after surgical mandibular advancement procedures in different vertical craniofacial types: a magnetic resonance imaging study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 103, p. 475–82, 2007.

DICKER, G. J. et al. Positional changes of the masseter and medial pterygoid muscles after surgical mandibular advancement procedures: an MRI study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 41, n. 8, p. 922-9, Aug 2012. ISSN 0901-5027.

DRUMMOND, P. Mechanisms of autonomic disturbance in the face during and between attacks of cluster headache. *Cephalalgia*, v. 26, n. 6, p. 633–41, 2006.

EGGINTON, S. and HUDLICKÁ, O. Selective long-term electrical stimulation of fast glycolytic fibres increases capillary supply but not oxidative enzyme activity in rat skeletal muscles: *Exp Physiol*, v. 85, p. 567-73, 2000.

ENGELBRECHT, A. et al. Daily brief restraint stress alters signaling pathways and induces atrophy and apoptosis in rat skeletal muscle. *Stress*, v. 13, n. 2, p. 132–41, 2010.

FELTON, D. Edentulism and comorbid factors: *J Prosthodont*, v. 18, p. 88-96. 2009.

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).

FLOR, H. et al. Stress-related electromyographic responses in patients with chronic temporomandibular pain. *Pain*, v. 46, n. 2, p. 145-52, Aug 1991. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959.

GAMEIRO, G. et al. The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol. Biochem. Behav*, v. 82, p. 338–344, 2005.

GAMEIRO, G. H. et al. How may stressful experiences contribute to the development of temporomandibular disorders? *Clin Oral Investig*, v. 10, p. 261–268, 2006.

GAUTHIER, G. F.; LOWEY, S. Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J Cell Biol*, v. 81, n. 1, p. 10-25, Apr 1979. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking).

GEDRANGE, T. et al. Oxidative state and histological changes in muscles of mastication after conditioning training. *Exp Toxicol Pathol*, v. 53, n. 1, p. 89-96, Apr 2001. ISSN 0940-2993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370740>>.

GLAROS, A.; 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15884314>.

GLAROS, A. G and RAO, S. M. Bruxism: a critical review. *Psychol Bull*, v. 84, p. 767–781, 1977.

GOMEZ, F. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology*, v. 63, n. 4, p. 327–37, 1996.

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

GRASSI C, D. F. et al. Sympathetic control of skeletal muscle function: possible co-operation between noradrenaline and neuropeptide Y in rabbit jaw muscles. *Neurosci Lett*, v. 212, p. 204-208, 1996.

GRIVENNIKOVA, V. et al. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria?, *Biochim Biophys Acta*, v. 1797: Netherlands, 2010 Elsevier B.V, p. 939-44. 2010.

HANNAM, A. G.; WOOD, W. W. Medial pterygoid muscle activity during the closing and compressive phases of human mastication. *Am J Phys Anthropol*, v. 55, n. 3, p. 359-67, Jul 1981. ISSN 0002-9483 (Print) 0002-9483.

HANNAM, A. G. and Wood, W. W. Relationships between the size and spatial morphology of human masseter and medial pterygoid muscles, the craniofacial skeleton, and jaw biomechanics. *J Phys Anthropol*, v. 80, p. 429-450, 1989.

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, p. 819-25. 2006.

HARTMANN, N. et al. Effects of controllable stress on masticatory behaviour and muscle structure: partial protective effect of clomipramine. *Eur J Pharmacol*, v. 366, n. 1, p. 19-26, Jan 29 1999. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

HASKIN, C. et al. Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint: *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 6, p. 248-277. 1995.

HERRING, S. W. Masticatory muscles and the skull: a comparative perspective. *Arch Oral Biol*, v. 52, n. 4, p. 296-9, Apr 2007. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969 (Linking).

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.

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

HOISINGTON, V.; HOISINGTON, E. Tri-immuno-phasic therapy: treatment of diseases of the periodontium with consideration of risk factors related to the state of immunity *Parodontologia*, v. 1, p. 52-55, 2000.

HSU, C.W. et al. Measurement of the size and orientation of human masseter and medial pterygoid muscles. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, v. 25, n. 1, p. 45-49, 2001.

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 , Q. et al. Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint: J Dent Res, v. 81, p. 209-13. 2002.

HUBBARD, D. R. and BERKOFF, G. M. Myofascial trigger points show spontaneous needle EMG activity. Spine, v. 18, p. 1803-1807, 1993.

INTRIERI, R. C.; JONES, G. E.; ALCORN, J. D. Masseter muscle hyperactivity and myofascial pain dysfunction syndrome: a relationship under stress. J Behav Med, v. 17, n. 5, p. 479-500, Oct 1994. ISSN 0160-7715 (Print) 0160-7715.

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

IYOMASA, M. M. et al. Morphological and histological effects on the medial pterygoid muscle after unilateral exodontia in gerbils. Micron, v. 39, n. 7, p. 785-90, Oct 2008. ISSN 0968-4328 (Print) 0968-4328 (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.

IZUMI, H. Nervous control of blood flow in the orofacial region. Pharmacol Ther, v. 81, p. 141-161, 1999.

JOËLS, M. and BARAM, T. Z. The neuro-symphony of estress. Nature Reviews – Neuroscience, v. 10, p. 459-466., 2009.

JOSKO, J. Liberation of thyreotropin, thyroxine and triiodothy- rone in the controllable and uncontrollable stress and after administration of naloxone in rats J Physiol Pharmacol v. 47, n. 2, p. 303– 310, 1996.

KANEHIRA, H. et al. Association between stress and temporomandibular disorder. Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi, v. 52, p. 375–380, 2008.

KAPEL, L. G. A and MCGLYNN, F. D. Psychophysiological responses to stress in patients with myofascial pain-dysfunction syndrome. J Behav Med v. 12, n. 4, p. 397-406, 1989.

KATSURA, S. et al. Histochemical studies on the histogenesis of rat pterygoid muscle. *Acta histochem Cyrochem*, n. 701-709, 1982.

KATSURA, S. I. H., MATSUMOTO, H., and NAKAE, Y. Histochemical studies on the architecture of rat medial pterygoid muscle *J. Oral Biol*, v. 23, p. 685-690, 1981.

KATZ, J. O. et al. Effect of experimental stress on masseter and temporalis muscle activity in human subjects with temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol*, v. 34, n. 6, p. 393-8, 1989. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969.

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

KILIARIDIS, S. et al. Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet.: *Arch Oral Biol*, v. 33, p. 187-93. 1988.

KIM, Y. J. Et al. Haemodynamic changes in human masseter and temporalis muscles induced by different levels of isometric contraction. *Arch Oral Biol*, v. 44, p. 641-650, 1999.

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

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, p. 271-6. 2004.

KUSUMAH, S. W. et al. Morphological observation of the medial pterygoid muscle by the superimposition of images obtained by lateral cephalogram and MRI. *J Orthod*, v. 36, n. 4, p. 243-52, Dec 2009. ISSN 1465-3125.

KWON, T. et al. Influence of unilateral masseter muscle atrophy on craniofacial morphology in growing rabbits: *J Oral MaxillofacSurg*, v. 65, p. 1530-7. 2007.

Sävendahl, L. The effect of acute and chronic stress on growth. *Sci Signal*, v. 23, n. 5, p. 247, 2012.

LACEY, J. Individual differences in somatic response patterns. *J Comp Physiol PsychoL*, v. 43, n. 5, p. 338-350, 1950.

LASKIN, D. M. Etiology of the pain-dysfunction syndrome. *The Journal of the American Dental Association*, v. 79, n. 1, p. 147-153, 1969.

LEVY, A. G. E.; BEN-NATHAN, D.; DE KLOET, E. R. New frontiers in stress research: modulation of brain function. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, v. 1, p. 105-16, 1998.

LI, Q. et al. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. In: (Ed.). *Physiol Behav*. United States: 2011 Elsevier Inc, v.104, 2011. p.365-72. ISBN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).

LIST, T.; AXELSSON, S. Management of TMD: evidence from systematic reviews and meta-analyses. *J Oral Rehabil*, v. 37, n. 6, p. 430-51, May 2010. ISSN 1365-2842 (Electronic) 0305-182X (Linking).

LUCCA, G. et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int*, v. 55, n. 5-6, p. 358-62, 2009.

LUND, J. P.; WIDMER, C. G.; STOHLER, C. S. The pain- adaptation model: a discussion of the relationship between chronic musculoskeletal pain and motor activity. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 69, p. 683-694, 1991.

SATOH, M. et al. Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain*, v. 49, n. 2, p. 273-278, 1992.

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

MANDARIN-DE-LACERDA, C. Métodos Quantitativos em Morfologia. 1. 1995. 131.

MANFREDINI, D. et al. Mood and anxiety Psychopathology and temporomandibular disorder. *J Oral Rehabil*, v. 41, p. 933-7, 2009.

MARTRETTE, J. M. et al. Effect of glucocorticoid receptor ligands on myosin heavy chains expression in rat skeletal muscles during controllable stress. *J Muscle Res Cell Motil*, v. 25, n. 4-5, p. 297-302, 2004. ISSN 0142-4319 (Print) 0142-4319.

MATSUMOTO, H. and KATSURA, S. Muscle-fibre architecture of the rat medial pterygoid muscle. *Archives of oral biology*, v. 32, n. 10, p. 705-11, 1987.

MCMILLAN, A.; BLASBERG, B. Pain-pressure threshold in painful jaw muscles following trigger point injection. *J Orofac Pain*, v. 8, p. 384-390, 1994.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10081556>.

MØLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact*, v. 102, n. 1, p. 17-36, Sep 1996. ISSN 0009-2797. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8827060>.

MORIMOTO, T. et al. Alteration in the bite force and EMG activity with changes in the vertical dimension of edentulous subjects. *J Oral Rehabil*, v. 23, p. 336-41, 1996.

MOTTAGHI, A. et al. Assessment of the relationship between stress and temporomandibular joint disorder in female students before university entrance exam (Konkour exam). *Dent Res J (Isfahan)*, v. 8, n. Suppl 1, p. S76-9, Dec 2011. ISSN 1735-3327 (Print) 1735-3327.

MULLER, J. et al. Bilateral effect of a unilateral occlusal splint on the expression of myosin heavy-chain isoforms in rat deep masseter muscle. *Arch Oral Biol*, v. 45, n. 12, p. 1017-24, Dec 2000. ISSN 0003-9969. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11084140>.

MURAKAWA, K. et al. Effects of electrical stimulation of cervical sympathetic trunks on microcirculation in the facial nerve. *Jpn J Physiol*, v. 45, n. 5, p. 801-9, 1995.

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

NACHLAS, M. et al. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole: *Journal of histochemistry & cytochemistry*, v. 5, p. 420-436. 1956.

NARANG, R. et al. Myositis ossificans: medial pterygoid muscle--a case report. *Br J Oral Surg*, v. 12, n. 2, p. 229-34, Nov 1974. ISSN 0007-117X (Print) 0007-117x.

NEWTON JP, A. E., ROBERTSON EM, YEMM R. Changes in human masseter and medial pterygoid muscles with age: a study by computed tomography. *Gerodontology*, v. 3, p. 151-54, 1987.

NICHOLSON, R. A. et al. Influence of a scheduled-waiting task on EMG reactivity and oral habits among facial pain patients and no-pain controls. *Appl Psychophysiol Biofeedback*, v. 25, p. 203, 2000.

ODEDRA, B.; BATES, P.; MILLWARD, D. Time-course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle. *Biochem J*, v. 214, p. 617-627, 1983.

OKAMOTO, K. et al. Temporomandibular joint-evoked responses by spinomedullary neurons and masseter muscle are enhanced after repeated psychophysical stress. *Eur J Neurosci*, v. 36, n. 1, p. 2025-34, Jul 2012. ISSN 0953-816x.

OKESON, J. P. Occlusion and functional disorders of the masticatory system. *Dent Clin North Am*, v. 39, n. 2, p. 285-300, Apr 1995. ISSN 0011-8532. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7781827>>.

OKESON, J. P. Differential diagnosis of temporomandibular disorders and other orofacial pain disorders. *Dent Clin North Am*, v. 55, n. 1, p. 105-20, 2011.

ORAL, K. et al. Etiology of temporomandibular disorder pain. *Agri*, v. 21, n. 3, p. 89-94, Jul 2009. ISSN 1300-0012 (Print) 1300-0012.

OTA, C. Y. Y., KAWAMOTO T. Relationship between craniofacial morphology and the volume and inclination of the medial pterygoid muscle. *J Osaka Odontol Soc*, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2006.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, v. 22, n. 4, p. 502-48, Aug 2001. ISSN 0163-769X.

Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11493581>.

PARKER, W. S. The comparative anatomy of the internal and external pterygoid muscles. Functional variations among species. *Angle Orthod*, v. 53, n. 1, p. 9-18, Jan 1983. ISSN 0003-3219 (Print) 0003-3219 (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).

PIERCE, C. et al. Stress, anticipatory stress, and psychologic measures related to sleep bruxism. *J Orofac Pain*, v. 9, n. 1, p. 51-56, 1995.

POLZER, I. et al. Edentulism as part of the general health problems of elderly adults: *Int Dent J*, v. 60, p. 143-55. 2010.

POVEDA RODA, R. et al. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 12, p. E292-8. 2007.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, v. 88, n. 4, p. 1243-76, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

QUINTERO, L. et al. Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 3, p. 449-458, 2000.

RAADSHEER, M. et al. Contribution of jaw muscle size and craniofacial morphology to human bite force magnitude: *J Dent Res*, v. 78, p. 31-42. 1999.

RAMMELSBERG, P. et al. Longitudinal outcome of temporomandibular disorders: a 5-year epidemiologic study of muscle disorders defined by research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. *J. Orofac. Pain*, v. 17, p. 9-20, 2003.

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

RASMUSSEN, O. C. et al. Blood flow in human mandibular elevators at rest and during controlled biting. *Arch Oral Biol*, v. 22, p. 539-543, 1977.

RICHARDIN, P. et al. Influence of stress and occlusal interference on the EMG activity of some masticatory muscles during a single mastication cycle: *J Oral Rehabil*, v. 22, p. 775-80. 1995.

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.

ROKX, J.; WILLIGEN, J. V.; JANSEN, H. Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat *Archives of oral biology*, v. 29, n. 1, p. 25-31, 1984.

ROSALES, V. 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11887374>.

ROWLERSON, A. et al. Fiber-type differences in masseter muscle associated with different facial morphologies. *AmJ Orthod Dentofacial Orthop*, v. 127, n. 1, p. 37-46, 2005.

RUF, S. et al. Stress-induced changes in the functional electromyographic activity of the masticatory muscles. *Acta Odontol Scand*, v. 55, n. 1, p. 44-8, Jan 1997. ISSN 0001-6357 (Print) 0001-6357.

RUGH, J. D.; SOLBERG, W. K. Psychological implications of temporomandibular pain and dysfunction. *Oral Sci. Rev*, v. 7, p. 3-30, 1976.

SAITO, T. et al. Effects of diet consistency on the expression of insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors and IGF binding proteins during the development of rat masseter muscle soon after weaning. *Arch Oral Biol*, v. 49, n. 10, p. 777-82, 2004.

SATO, C. et al. Bruxism affects stress responses in stressed rats. *Clin Oral Investig*, v. 14, n. 2, p. 153-60, Apr 2010. ISSN 1432-6981.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823732>>.

SAVENDAHL, L. The effect of acute and chronic stress on growth. *Sci Signal*, v. 5, n. 247, p. pt9, Oct 23 2012. ISSN 1937-9145 (Electronic).

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

SCHMITTER, M. et al. Chronic stress in myofascial pain patients. *Clin Oral Investig*, v. 14, n. 5, p. 593-7, Oct 2010. ISSN 1436-3771 (Electronic) 1432-6981 (Linking).

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

SEENE, T.; VIRU, A. The catabolic effect of glucocorticoids in different types of skeletal muscle fibers and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. *J Steroid Biochem*, v. 16, p. 349-352, 1982.

SEIRYU, M. et al. Decreases of occlusal vertical dimension induce changes in masticatory muscle fiber composition. *Orthodontic Waves*, v. 71, n. 4, p. 123-128, 2012.

SFONDRINI, G. et al. Adaptations of masticatory muscles to a hyperpropulsive appliance in the rat. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, v. 110, n. 6, p. 612-617, 1996.

SHOJI, Y.; BRUCE, I.; SIU, L. Electromyographic assessment of non-functional masseter muscle in an awake animal model. *Cranio.*, v. 12, n. 2, p. 110-3, 1994.

SIEBER, M. et al. Relation between stress and symptoms of craniomandibular disorders in adolescents. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, v. 113, n. 6, p. 648-54, 2003.

SIMONIC-KOCIJAN, S. et al. Alterations in the masseter muscle and plasma IL-6 level following experimentally induced occlusal interference and chronic stress--a study in rats. *Coll Antropol*, v. 36, n. 2, p. 651-5, Jun 2012. ISSN 0350-6134 (Print) 0350-6134.

SITTHISOMWONG, P. et al. The effect of a cholecystokinin agonist on masseter muscle activity in the cat *Journal of Dental Research*, v. 79, p. 1823–1828, 2000.

SPASSOV, A. et al. Increased oxidative stress in dystrophin deficient (mdx) mice masticatory muscles. In: (Ed.). *Exp Toxicol Pathol*. Germany: 2010 Elsevier GmbH, v.63, 2011. p.549-52. ISBN 1618-1433 (Electronic) 0940-2993 (Linking).

STARR, J. M., and R. HALL. Predictors and correlates of edentulism in healthy older people: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 13, p. 19-23. 2010.

STÅL, P. et al. Differences in capillary supply between human oro-facial, masticatory and limb muscles.: *J Muscle Res Cell Motil*, v. 17, p. 183-97. 1996.

STEINBERG, S. F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ Res*, v. 112, n. 2, p. 393-405, Jan 18 2013. ISSN 0009-7330.

SUVINEN, T. I. et al. Temporomandibular disorder subtypes according to self-reported physical and psychosocial variables in female patients: a re-evaluation. *J Oral Rehabil*, v. 32, p. 166-73, 2005.

THANGAVELU, A.; VAIDHYANATHAN, A.; NARENDAR, R. Myositis ossificans traumatica of the medial pterygoid. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 40, n. 5, p. 545-9, May 2011. ISSN 0901-5027.

TANAKA , E.et al. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment: *J Dent Res*, v. 87, p. 296-307. 2008.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338229>>.

TSAI, C. 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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11844031>.

TSAI , C. et al. The influence of masticatory hypofunction on developing rat craniofacial structure: *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 39, p. 593–8. 2010.

TSAI , C. et al. Masseter muscle fibre changes following reduction of masticatory function: *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 41, p. 394-9. 2012.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12535150>.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nature Reviews – Neuroscience*, v. 10, p. 459-466., 2009.

VAN SELMS, M. K. et al. Craniomandibular pain, oral parafunctions, and psychological stress in a longitudinal case study. *J Oral Rehabil*, v. 31, n. 8, p. 738-45, Aug 2004. ISSN 0305-182X (Print) 0305-182x.

VAN SELMS, M. K. et al. Myofascial temporomandibular disorder pain, parafunctions and psychological stress. In: (Ed.). *J Oral Rehabil*. England, v.35, 2008. p.45-52. ISBN 0305-182X (Print) 0305-182X (Linking).

VANDERAS, A. et al. Urinary catecholamine levels and bruxism in children. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 26, n. 2, p. 103–110, 1999.

VECCHIONE, L. et al. Craniofacial morphology in myostatin-deficient mice: *J Dent Res*, v. 86, p. 1068-72. 2007.

VEDHARA, K. et al. An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. *Biol Psychol*, v. 62, p. 89–96, 2003.

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

VIEL, E. 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, p. H281-8. 2008.

VIGNON, C. et al. Further histochemical studies on masticatory muscles: J Neurol Sci, v. 45, p. 157-76. 1980.

WANMAN, A.; AGERBERG, G. Etiology of craniomandibular disorders: evaluation of some occlusal and psychosocial factors in 19-year-olds. J Craniomandib Disord, v. 5, n. 1, p. 35-44, Winter 1991. ISSN 0890-2739 (Print) 0890-2739.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation: Psychopharmacology (Berl), v. 134, p. 319-29. 1997.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS.: Neuropsychobiology, v. 52, p. 90-110. 2005.

WODA , A. et al. 2006, The regulation of masticatory function and food bolus formation: J Oral Rehabil, v. 33, p. 840-9.

WODA , A.; PIONCHON, P. A unified concept of idiopathic orofacial pain: pathophysiologic features. J Orofac Pain, v. 14, p. 196–212, 2000.

WRIGHT, E. F. Medial pterygoid trismus (myospasm) following inferior alveolar nerve block: case report and literature review. Gen Dent, v. 59, n. 1, p. 64-7, Jan-Feb 2011. ISSN 0363-6771 (Print) 0363-6771.

WU, G. et al. Psychological stress may contribute to temporomandibular joint disorder in rats. J Surg Res, Dec 29 2012. ISSN 0022-4804.

ZEREDO, J. L. et al. Measuring biting behavior induced by acute stress in the rat. Behav Res Methods, v. 41, n. 3, p. 761-4, Aug 2009. ISSN 1554-351X (Print) 1554-351x.