RICARDO ALEXANDRE JUNQUEIRA CALZZANI

EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DO ESTRESSE CRÔNICO E EXODONTIA EM MÚSCULO MASSETER DE RATOS

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

RICARDO ALEXANDRE JUNQUEIRA CALZZANI

EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DO ESTRESSE CRÔNICO E EXODONTIA EM MÚSCULO MASSETER DE RATOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador(a): 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 à fonte.

Calzzani, Ricardo Alexandre Junqueira
Efeitos morfofisiológicos do estresse crônico e exodontia em músculo masseter de ratos. Ribeirão Preto, 2013.
100 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.
Orientador: Iyomasa, Mamie Mizusaki

1. Exodontia. 2. Masseter. 3. Estresse Crônico Repetido. 4. Morfofisiológico. 5. Ultraestrutural.

CALZZANI, Ricardo Alexandre Junqueira
Efeitos morfofisiológicos do estresse crônico e exodontia em músculo masseter de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral – Área de concentração Biologia Oral

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP) – área de concentração Biologia Oral, em sessão pública realizada em: / / ,considerou o candidato:.....

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

À minha avó ***Leonor*** *(in memoriam), pelo amor incondicional e dedicação.*

Aos ***meus pais Fernando e Iolanda****, com muito carinho e admiração. Esta vitória é fruto do que vocês plantaram ao longo dos anos. São meus exemplos de esforço e perseverança. Agradeço muito o amor e apoio incondicional que sempre me proporcionaram.*

Ao ***meu filho Yuri****, com muito amor, de onde tiro forças para seguir a minha jornada. Obrigado pela compreensão e pelo laço, apesar de toda a distância.*

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradecimento Especial

À minha orientadora ***Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa****, pelo apoio e compreensão, por confiar e me transferir toda a sua sabedoria, não apenas do ensino acadêmico e pesquisa, mas também pelos conselhos diários e estilo de vida, que tanto admiro e pretendo levar comigo sempre. Agradeço todas as considerações, conselhos e palavras de ânimo que a Sra. me deu nos momentos difíceis e espero algum dia retribuir todo o que tem feito por mim.*

Agradecimentos

*Ao **CRIADOR**, pelo Dom da vida, que me ilumina e me guia em todas as minhas decisões e caminhos, viabilizando mais esta etapa de minha vida acadêmica.*

*Aos **meus irmãos, Junir, Guto e Cristiane e sobrinhos, João, Beatriz e Isadora**. Espero poder compartilhar momentos maravilhosos com vocês.*

*À **Regima Fracon,** pelo companheirismo e afeto depositados, e por fazer parte de minha família.*

*Aos meus amigos **Tobias e Alanina,** a quem considero divisor de águas. Se hoje este sonho realiza-se, foi devido à entrada de vocês em minha vida.*

*À minha família de CORAÇÂO, **Dinbers, Forga, Guaxupé, Chico Marmita, Bia, Tiago Morgan, André Marques.** O bom da vida e poder levar conosco, não importa aonde vamos, algo das pessoas que amamos. Tenho vocês como exemplo, para me tornar uma pessoa melhor a cada dia.*

*A **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo,** representada pelo seu Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet de Rocha Barros.***

*Aos companheiros do Laboratório de Pesquisas Morfológicas: **Fernando, Eduardo, Rodrigo, Yamba, Daniela, Kenia, Bruna, Nilce, Júnia e Felipe.** Obrigado pela ajuda fornecida durante todo o desenvolvimento do meu projeto.*

*À **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza,** coordenadora do Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral. Agradeço pela disposição concedida sempre que necessitei da Sra.*

*Aos funcionários, alunos e companheiros do **Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica,** pela convivência diária e compreensão.*

*Aos **Professores José Antônio Brufato Ferraz e Artur Martini** do Curso de Aperfeiçoamento da APCD Ribeirão Preto, que me apoiam e ajudam sem medir esforços. Serei sempre grato pelo conhecimento entregado nas horas de aula e de lazer.*

Aos ***Professores Raphael, João Paulo, Raquel e Christie*** *pela constante preocupação e dicas no desenvolvimento de pesquisas. Agradeço a consideração e a oportunidade entregue ao longo da minha estadia na faculdade.*

Às secretarias do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: ***Fernanda Talita de Freitas e Regiane Tirado*** *pela disposição e prontidão.*

À ***Daniela Focosi,*** *pelo apoio incondicional, confiança, paciência e ajuda nos momentos difíceis.*

Aos Drs. Romário e Conceição, e a Regiane pelo apoio, ajuda e compreensão ao longo desta jornada. Obrigado pela oportunidade e pelo conhecimento transferido. Saibam que sempre estão comigo.

Aos ***companheiros de aulas*** *da Pós pelos bons momentos que vivenciamos na nossa etapa de formação.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta Dissertação, expresso aqui minha gratidão.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida, nos momentos bons e ruins, concordando ou discordando de meus atos, pois se hoje sou assim, levo um pouco de cada um.

Aos ***animais*** *utilizados nesse estudo, que tiveram suas vidas tiradas para que esse trabalho pudesse ser realizado.*

À ***FAPESP****, que concedeu fomento e possibilitou o andamento desta pesquisa.*

Resumo e Abstract

RESUMO

CALZZANI, R.A.J. **Efeitos morfofisiológicos do estresse crônico e exodontia em músculo masseter de ratos.** 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O estresse parece favorecer a hiperalgesia e alodinia, podendo estar associados à alteração da função muscular mastigatória. Alterações morfofisiológicas em músculos da mastigação induzidos pela alteração oclusal associado ao estresse crônico ainda são escassas na literatura. Este estudo investigou os efeitos do estresse crônico repetido em músculo masseter superficial e profundo de ratos submetidos ou não à exodontia unilateral no ganho do peso dos animais, nas alterações morfológicas (HE, MET), histoquímicas (NADH, SDH e ROS), imunoistoquímicas (laminina e CD31), atividade de MMP-2, -9 e infiltração de neutrófilos (MPO). Vinte ratos (machos, 200g) foram alocados em quatro grupos (n=5): controle (GC), exodontia unilateral (GM), estresse crônico repetido (GE), exodontia associado ao estresse crônico repetido (GME). GE e GME foram submetidos a 10 dias de protocolo de estresse crônico repetido (2 horas diárias) a partir do 14º dia após a exodontia. Houve uma diminuição significativa no ganho de peso dos animais GE e GME. Não foram observadas alterações nos níveis de MMPs e na infiltração de neutrófilos no feixe superficial dos diferentes grupos. GE, GM e GME demostraram alterações morfofisiológicas, ultraestruturais e histoquímicas no feixe profundo, com características específicas e distintas de GC; GE apresentou as maiores alterações. Conclui-se que a exodontia e sua associação ao estresse foram responsáveis por discretas alterações morfofisiológicas no músculo masseter de ratos, contudo o estresse crônico repetido causou modificações morfofisiológicas e ultraestruturais significantes, sendo responsável também pela alteração no peso dos animais.

Palavras Chave: exodontia, masseter, estresse crônico repetido, morfofisiológico, ultraestrutural.

ABSTRACT

CALZZANI, R.A.J. **Morphophysiological effects of chronic stress and exodontia in the masseter muscle of rats.** 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Stress seems to favor the hyperalgesia and allodynia, which may be related with altered masticatory muscle function. Morphological and physiological changes in the masticatory muscles induced by occlusal alteration associated with chronic stress are still scarce in the literature. This study investigated the effects of repeated chronic stress in superficial and deep masseter muscle of rats with or without the extraction unilateral weight gain of animals and morphological changes (HE MET), histochemical (NADH, SDH and ROS), immunohistochemical (laminin and CD31), MMP-2, -9 activities and neutrophil infiltration (MPO). Twenty rats (male, 200g) were allocated into four groups (n=5): control group (CG), unilateral exodontia (MG), repeated chronic stress (EG), extodontia and repeated chronic stress (MEG). EG and MEG were submitted to 10 days of repeated chronic stress protocol, 2 hours daily, from the 14th day after the extraction. There was a significant decrease in weight gain of animals EG and MEG. No changes were observed in the levels of MMPs and neutrophil infiltration among different groups. EG, MG and MEG have shown morphophisyological, ultrastructural and histochemical changes with specific characteristics and distinct GC GE presenting the higher changes. We conclude that the exodontia and its association to stress were responsible for discrete morphophysiological changes in the masseter muscle of rats, however repeated chronic stress caused significant morphophysiological and ultrastructural changes, being also responsible for change in weight of the animals.

Keywords: exodontia, masseter, repeated chronic stress, morphophysiological, ultrastructural.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1. ESTRESSE E DORES MIOFACIAIS 21
2.2. MALOCLUSÃO E DORES MIOFACIAIS 22
2.3. METALOPROTEINASES (MMPs) 23
2.4. MIELOPEROXIDASE (MPO) 24
2.5. LAMININA E GRUPAMENTO DE DIFERENCIAÇÃO 31 (CD31) 25
2.6. HISTOENZIMOLOGIA (SDH E NADH) 26
2.7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) 27
3. OBJETIVOS 31
4. MATERIAL E MÉTODO 33
4.1. ANIMAIS 33
4.2. INDUÇÃO DA ALTERAÇÃO OCLUSAL EM ANIMAIS: 33
4.3. PROTOCOLO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO 34
4.4. PESAGEM DOS ANIMAIS 34
4.5. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS 36
4.5.1. FEIXE SUPERFICIAL 36
4.5.1.1. MMPs-2, -9 37
4.5.1.2. MPO 38
4.5.2. FEIXE PROFUNDO 38
4.5.2.1. HE 39
4.5.2.2. MET 39
4.5.2.3.1. LAMININA e CD31 40
4.5.2.4.1. SDH 41
4.5.2.4.2. NADH 41
4.5.2.4.3. ROS 42
5. RESULTADOS 44
5.1. CONTROLE DE PESO 44
5.2. METALOPROTEINASE (MMP- 2 e -9) 45

5.3. MIELOPEROXIDASE (MPO) 47
5.4. HEMATOXILINA E EOSINA (HE) 48
5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) 50
5.6.1. LAMININA 54
5.6.2. GRUPAMENTO DE DIFERENCIÇÃO 31 (CD31) 55
5.7.1. SUCCINATO DESIDROGENASE (SDH) 57
5.7.2. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (NADH) 60
5.7.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) 64
6. DISCUSSÃO 67
7. CONCLUSÃO 79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O estresse pode ter efeito bilateral no fenômeno de dor relatada. O estresse de natureza repetida parece favorecer a hiperalgesia e alodinia. Atualmente alguns estudos têm revelado que o estado emocional pode afetar a função oral em animais (ANTONOVA, 2008) bem como em seres humanos (CARVALHO, CURY e GARCIA, 2008). Há relatos de que o estresse desempenha papel importante na patogênese de doenças crônicas, como a ansiedade e outros distúrbios afetivos (PACÁK e PALKOVITS, 2001), no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e também no complexo processo de síndrome metabólica (BOVE et al., 2010). Segundo Schweinhardt, Sauro e Bushnell (2008) o estresse precoce, prolongado ou grave afetam os circuitos cerebrais moduladores da dor, sugerindo que a fibromialgia não seja um distúrbio primário do sistema nervoso central. A fibromialgia é uma síndrome de dor crônica que afeta 2-4% da população, sendo caracterizada por pontos de sensibilidade e dores musculares generalizadas (WOLFE, 1990). Além disso, condições de estresse relacionadas às guerras e conflitos armados (UHAC et al., 2003), e outros como a simples realização de exercícios mentais de aritmética e/ou soluções de anagramas simples (RAO E GLAROS, 1979; TSAI et al., 2002) podem aumentar a atividade da musculatura mastigatória e estar associados às disfunções temporomandibulares (GLAROS, WILLIAMS e LAUSTEN, 2005).

Apesar de estudos clínicos correlacionarem o estresse emocional ou psicológico com alterações fisiológicas em músculo masseter (HIDAKA, YANAGI e TAKADA, 2004), dores crônicas e (VAN SELMS et al., 2008) aumento da sensibilidade dos músculos da mastigação em indivíduos portadores de dores miofaciais (VEDOLIN et al., 2009), alterações na função oral (CARVALHO, CURY e GARCIA, 2008) e ativação da musculatura em pacientes com sintomatologia dolorosa (SCHMIDT e CARLSON, 2009), a etiopatogenia dessas disfunções ainda é pouco compreendida.

Algumas desordens funcionais acometem o sistema estomatognático, dentre elas a sensibilidade dolorosa à palpação nos músculos da mastigação e desconforto da musculatura ao despertar (CARVALHO, CURY E GARCIA, 2008). Essa parafunção dos músculos da mastigação tem despertado interesse nos pesquisadores com o intuito de correlacionar os fatores etiológicos e de compreender os mecanismos pelos quais os músculos se adaptam a essas

alterações. Com esse propósito os músculos da mastigação têm sido analisados em diversas condições como, tais como em situações de aumento (KAWASAKI, SAEKI e OHNUKI, 1997; MULLER et al., 2000) ou diminuição da dimensão vertical (MIEHE et al., 1999), após a exodontia (MAEDA et al.,1990; BAZAN et al., 2008; IYOMASA et al., 2008; IYOMASA et al., 2009) ou desgaste oclusal (BANI, BANI e BERGAMINI, 1999; BANI e BERGAMINI, 2002) e situações de desordens temporomandibulares (DTM) tratadas com terapias oclusais (KIRVESKARI e JÄMSÄ, 2009), com auxíli de diferentes tipos de metodologias, tais como: histoenzimologia (MAXWELL et al., 1981; MIEHE et al., 1999; KITAGAWA et al., 2004); análise ultraestrutural (BANI, BANI e BERGAMINI, 1999; BANI E BERGAMINI, 2002; IYOMASA et al., 2009); e análise microscópica (ABE *et al.*, 1998; NISHIDA *et al.*, 1999; Nishide, *et al.*, 2001).

A hipótese desse trabalho é que a alteração oclusal associada ao estresse crônico repetido leve a alterações morfológicas em músculos da mastigação, cujo tema ainda é pouco discutido na literatura. Diante do exposto, o propósito deste trabalho foi estudar as características do músculo masseter superficial e profundo de animais com e sem alteração oclusal, expostos ou não ao estresse crônico repetido.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRESSE E DORES MIOFACIAIS

A teoria psicofisiológica propõe que hiperatividade muscular é iniciada no sistema nervoso central, sendo resultado de estresse psicológico (YEMM, 1969a), recebendo apoio experimental e tornando-se base para muitos tratamentos de DTM, contração muscular e dores de cabeça (YEMM, 1969b; THOMAS, TIBER e SHIRESON, 1973). Thomas e companheiros (1973) observaram por meio da atividade eletromiográfica (EMG) dos músculos masseter e temporal, que tanto em situações de ansiedade quanto de frustração aumentam significativamente a hiperatividade muscular. A depressão e o estresse foram associados à hiperatividade muscular mastigatória, podendo resultar em dor e outros sinais e sintomas de DTM (KIGHT, GATCHEL e WESLEY, 1999; YAP et al., 2002).

Os níveis de ansiedade e/ou depressão podem modificar a situação de apertamento e hábitos de ranger os dentes e afetar indiretamente os sintomas de DTM (FERREIRA-BACCI A, CARDOSO e DÍAZ-SERRANO, 2012). Entretanto, ainda não é bem compreendido se distúrbios psicológicos são fonte ou consequência da dor crônica (DWORKIN, 1996; MCNEILL, 1997).

Os fatores etiológicos da hiperatividade muscular mastigatória por ativação central mais citado são os fatores psicológicos e/ou estresse físico (BERRY, 1967; FRANKS, 1965), no entanto vários fatores podem influenciar nos resultados: diferenças fisiológicas dentro e entre grupos de indivíduos, variações de idade, raciais e sexuais; controle do experimento em laboratórios e ambiente natural. (MOSS, GARRETT e CHIODO, 1982).

O estresse no trabalho foi estudado e relacionado com doenças cardiovasculares, (KARASEK et al., 1988; KIVIMÄKI et al., 2012), de origem imunológica, alterações homeostáticas (DOHMS e METZ, 1991), bem como distúrbios psicossomáticos, comportamentais e desordens musculoesqueléticas, analisando diferentes dimensões de risco. Observaram também que o ritmo de trabalho e estressores físicos estão associados a queixas de saúde psicossomática, musculoesqueléticas e distúrbios osteomusculares, tanto agudos como crônicos. Sentimentos de medo, ansiedade e frustração também desencadearam apertamento

dentário (MANFREDINI et al., 2004) e susceptibilidade ao estresse (KANEHIRA et al., 2008). Desta forma, o apertamento dentário pode estar associado com situações de vigília e ansiedade, depressão, estresse e características de personalidade.

Huang et al. (2011) e demonstraram em músculo masseter de ratos uma relação estímulo-resposta entre o estresse psicológico e a sensibilidade muscular mecânica, e notaram que a remoção do fator desencadeador do estresse pode ser um método útil para aliviar aumento da sensibilidade mecânica induzida por estresse psicológico.

Ferreira-Bacci observaram em 2012 que 18,75% das crianças de seu estudo apresentaram manifestações físicas e psicológicas significativas de estresse caracterizado por dores nas pernas, ranger de dentes, dor de estômago, enurese, nervosismo, preocupação, mau-humor, medo, distúrbios do sono, infelicidade, entre outras manifestações, e concluiu que problemas comportamentais e emocionais podem ser fatores de risco para DTM.

2.2. MALOCLUSÃO E DORES MIOFACIAIS

Bush sugeriu em 1984 que alterações oclusais representam a provável etiologia da dor orofacial e DTM por meio da propriocepção, promovendo uma mudança no posicionamento mandibular, causando stress muscular unilateral, e que quando a mandíbula evita uma interferência, há contacto com o lado contralateral, ocasionando sensibilidade muscular e dores de cabeça. O termo DTM refere-se a sinais e sintomas associados com dor e distúrbios funcionais e estruturais do sistema mastigatório, especialmente nas articulações temporomandibulares (ATM) e músculos mastigatórios (SONNESEN e SVENSSON, 2008).

Foi descrito na literatura que uma oclusão adequada para a saúde dental e do paciente compreende: estabilidade bilateral dos dentes superiores e inferiores, contactos oclusais bilateralmente iguais durante os movimentos laterais sem contacto no lado contralateral, contacto oclusal bilateral simultâneo com os dentes na intercuspidação, contatos oclusais simultâneos entre os dentes anteriores e ausentes nos posteriores durante a protrusão, forças dirigidas ao longo do eixo de cada dente, entre outros (KLASSER e GREENE, 2009).

Os sinais e sintomas de DTM associados com maloclusão, tais como a oclusão molar distal, apinhamento, overjet maxilar extremo, mordida profunda,

agenesia e perdas dentais por cáries ou traumas, têm sido motivos de estudo devido às severas implicações para a saúde de um modo geral. No entanto, o sintoma mais comum relacionado à DTM foi dor de cabeça, e os sinais mais comuns foram sensibilidade nos músculos temporal anterior, occipital, trapézio e masseter superficial e profundo (BENOLIEL e SHARAV, 2010), mobilidade reduzida ou deficiente da mandíbula e os sons da ATM. (BUSH E DOLWICK, 1995).

O diagnóstico em pacientes com DTM é complicado pela multiplicidade de sinais e sintomas e etiologia multifatorial, sugerindo que o diagnóstico deve ser baseado em uma avaliação clínica minuciosa. Para a avaliação da ATM é indicado o auxílido das técnicas radiogáficas obtendo uma melhor visão interna, reservando a ressonância magnética para a avaliação de tecidos moles e tomografia computadorizada de estruturas ósseas (MANFREDINI, BUCCI e NARDINI, 2007).

Interferências oclusais associadas ao estresse crônico aumentaram níveis de interleunina-6 (IL-6) no músculo masseter de ratos, e o nível de dor no m. masseter avaliado pelo teste de formalina mostrou estar diretamente relacionado com os níveis de IL-6. Entretanto a complexidade da avaliação da dor orofacial e dos níveis de mediadores locais e sistemicos da inflamação exigem aprofundamento (SIMONIĆ-KOCIJAN et al., 2012).

2.3. METALOPROTEINASES (MMPs)

Uma importante característica do desenvolvimento, morfogênese, reparação e remodelação do tecido é a degradação da matriz extracelular (ECM), que por meio de interações intercelulares fornecem informações que controlam funções específicas do tecido, sendo as metaloproteinases (MMPs) principais enzimas relacionadas com a degradação da ECM (WERB, 1997).

Dentre as metaloproteinases, as MMP-2 e a MMP-9, denominadas gelatinase pela atividade enzimática, são as mais amplamente estudadas em se tratando de tecido muscular (LEWIS et al., 2000), pois degradam os principais componentes da lâmina basal, uma barreira que os mioblastos devem transpor durante o desenvolvimento e regeneração muscular (TIPPETT et al., 2008). Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 têm a capacidade de clivar a elastina, colágeno tipo IV e diversas moléculas da ECM com a ajuda da fibronectina tipo II, porém a MMP-2 digere colágenos intersticiais tipo I, II e III (NAGASE, VISSE e MURPHY, 2006).

A inibição de MMP-9 e MMP-2 provocaram diminuição significativa de proliferação e diferenciação de mioblastos. Apesar desse efeito negativo, esses fatores diminuem a fibrose e melhoram a regeneração muscular em ratos (ZIMOWSKA et al., 2012).

Yeghiazaryan e colaboradores (2012) observaram uma ativação e distribuição nuclear de MMP-2, ao passo que a MMP-9 foi associada ao compartimento citoplasmático, especialmente em células satélite de mioblastos ativados no músculo sóleo após treinamento.

2.4. MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os polimorfonucleares leucócitos (PMNs) são os primeiros tipos celulares do sistema imunológico do hospedeiro que são ativados frente a processos infecciosos. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima específica dos neutrófilos e monócitos, porém os monócitos apresentaram apenas um terço da MPO encontrada nos PMNs (ARNHOLD, 2004). A MPO é uma proteína catiônica, com peso molecular de 144 kD, que consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. Sua função é catalisar a formação de numerosas espécies reativas oxidantes (ROMAN, WENDLAND e POLANCZYK, 2008).

Quando excessivamente estimulados, os neutrófilos podem liberar MPO no meio extracelular (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). Nos neutrófilos ativados, ânion superóxido (O^{2-}) são produzidos pelos NADPH-oxidase (NOx), que catalisa em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este utilizado pela mieloperoxidase como substrato para produção de ácido hipocloroso (HOCl), composto oxidante forte na formação de radical hidroxila (•OH) instável altamente reativa (DEBY-DUPONT, DEBY e LAMY, 1999; POWERS e JACKSON, 2008). Observações sugerem que a MPO tem propriedades pró-inflamatórias, independentemente da sua atividade enzimática (HAEGENS et al., 2007). Há relatos da participação de neutrófilos logo após uma injuria muscular (TIDBALL, 2005), e Morozov et al. (2006) relataram uma alta intensidade de infiltrado inflamatório nas fibras vermelhas, em relação às fibras brancas do músculo quadríceps de ratos após o exercício físico de alta intensidade, porém em animais treinados um efeito protetor foi revelado por um acúmulo menor

de neutrófilos, mesmo após exercício exaustivo. No entanto ainda é um tema controverso se ocorre infiltração de neutrófilos em músculos esqueléticos após exercícios (SCHNEIDER e TIIDUS, 2007).

A mieloperoxidase secretada por neutrófilos e monócitos produz moléculas que oxidam a tetrahidrobiopterina, cuja molécula é importante para a dilatação endotélio dependente (DED). A DED deficiente em adultos saudáveis de meia-idade foi relacionada com uma concentração maior de neutrófilos, eosinófilos, monócitos mediada pela resposta reduzida para NO, com aumento da mieloperoxidase associada a reduções em tetrahidrobiopterina (WALKER et al. 2010).

2.5. LAMININA E GRUPAMENTO DE DIFERENCIAÇÃO 31 (CD31)

O sistema vascular tem a finalidade de garantir o fluxo de sangue adequado às células com quantidade suficiente de nutrientes e oxigênio. A neoformação vascular pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: vasculogênese (formação a partir do plexo vascular primitivo) e angiogênese (formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes) (DISTLER et al., 2003). Tal fenômeno pode ocorrer em resposta a estímulos químicos ou físicos e relacionados a uma ampla gama de doenças (WILLIAMS et al., 2006; CHIDLOW et al., 2007) .

Na musculatura esquelética, a neoformação de capilares ocorre através de divisão longitudinal do vaso após uma tensão de cisalhamento elevada ou pela germinação abluminal (WILLIAMS et al., 2006), dependente de mediadores angiogênicos com papéis específicos (RIVILIS et al., 2002), da interação de células endoteliais e pericitos com a membrana basal (SIMON-ASSMANN et al., 2011) e sinalização dinâmica coordenada de contatos intercelulares do endotélio (METTOUCHI, 2012).

Lamininas são moléculas presentes na membrana basal que interagem com receptores de superfície celular e acionam a sinalização intracelular (HODGES et al., 1997; SIMON-ASSMANN et al., 2011). São os principais componentes da membrana basal de vasos sanguíneos (SOROKIN et al., 1997; LJUBIMOVA et al., 2006) que participam de processos envolvidos na migração celular durante o desenvolvimento, cicatrização de feridas e angiogénese (MALINDA et al., 1999; FUJIWARA et al., 2001) e atua na formação e integridade estrutural da membrana basal neoformada (THYBOLL et al., 2002)

As moléculas de adesão plaquetária da célula endotelial (PECAM-1), conhecidas como grupamento de diferenciação 31 (CD31) são componentes da superfamília de imunoglobulinas expressas pelo endotélio vascular adulto capaz de mediar à adesão ou sinalização por mecanismos heterofílicos ou homofílicos com função determinante durante a angiogênese (CAO et al., 2002). Por estar presente no lado luminal de células endoteliais e em junções intercelulares, PECAM-1 tem papel importante nas primeiras fases da diapedese por interações homofílicas (EARDLEY e COCKWELL, 2005). Durante a neoformação vascular a CD31 pode participar de adesão ou de sinalização necessários para a motilidade de células endoteliais, estabilização vascular e na subsequente organização em tubos vasculares (BOGEN et al., 1994; DISTLER et al., 2003; CAO et al., 2002).

Por meio de marcação CD31-positivas de capilares da musculatura Matsakas determinou em 2012 os efeitos benéficos do estrógeno relacionado receptor-gamma (ERRγ) na estimulação vascular, devido à neoangiogênese oito após a indução de isquemia dos membros posteriores.

2.6. HISTOENZIMOLOGIA (SDH E NADH)

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é um importante carreador de elétrons para reações de oxirredução, especializada em transportar elétrons e átomos de hidrogênio de alta energia, atuando em importantes reações biossintéticas (ALBERTS, 2004). As mitocôndrias dos mamíferos possuem cinco complexos enzimáticos do sistema oxidativo, sendo o carreamento de elétrons pela NADH pertencente ao maior complexo enzimático multiprotéico (complexo I) da cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria (TRIEPELS et al., 2001; SMEITINK et al., 2004; YAGI et al., 2006;). O monitoramento dos níveis da NADH nos tecidos fornece informações do estado metabólico na mitocôndria em termos de níveis de oxigênio intracelular e produção de energia, importante na interpretação de situações fisiológicas e patológicas (MAYEVSKY e BARBIRO-MICHAELY, 2009). Em contrapartida, a NADH não é específica da cadeia respiratória, pois atua em outras reações energéticas, como exemplo, a glicólise (ALBERTS, 2004).

A succinato desidrogenase (SDH) é uma enzima complexa e covalentemente ligada ao cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (RUTTER, WINGE e SCHIFFMAN, 2010), que intervém no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória, sendo

componente do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial. É específica à cadeia respiratória, atuando na “etapa 6” do ciclo de Krebs, em que ocorre a terceira oxidação (ALBERTS, 2004).

Conforme Peter et al. (1972), as fibras musculares foram classificadas nos seguintes tipos: a) contração rápida glicolítica, predominantemente anaeróbica, possuindo alta concentração de glicogênio e fosforilase alta. Sua capacidade aeróbica é muito limitada manifestada pela baixa atividade da succinato desidrogenase, assim como pela baixa concentração de citocromo e mioglobina; b) contração rápida oxidativa-glicolítica com capacidade de metabolismo aeróbico maior devido à atividade de SDH e altas concentrações de citocromo e mioglobina; c) contração lenta oxidativa, com um metabolismo aeróbico predominante e baixa concentração de glicogênio e fosforilase.

As fibras classificadas como vermelhas, intermediárias e brancas analisadas com base nas atividades da SDH ou da nicotinamida adenina dinucleotídeo diaforase (NADH-D) revelaram: a) fibras brancas com baixa taxa oxidativa, identificadas pela ausência de diformazana subsarcolemal; b) fibras intermediárias caracterizadas pela dispersão uniforme dos grânulos de diformazana de pequenos tamanhos; c) fibras vermelhas com maior deposição de grânulos de diformazana nas regiões subsarcolemais (MAXWELL, FAULKNER e LIEBERMAN, 1973). Foi observada uma relação inversamente proporcional entre a área de secção do músculo esquelético e a atividade do SDH, de modo que o tamanho da fibra e sua respectiva atividade de SDH estão funcionalmente relacionados pelas limitações da difusão do substrato energético (SIECK et al., 1986).

A análise de NADH-TR e SDH dos músculos supra-hióideos e gênio-hióideo de gerbil não revelou alterações significantes após 60 dias de exodontia unilateral, no entanto o músculo digástrico tornou-se menos resistente á fadiga (IYOMASA et al., 2008).

Cebasek et al. (2007) verificaram por meio de técnicas de quantificação estereológica da área das fibras musculares que após duas semanas neurotimese ou quatro semanas de axonotimese, os músculos de ratos apresentaram reações positivas para o SDH e o NADH-TR.

2.7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O^{2-}•), hidroperoxila (HO2•) e hidroxila (OH•), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ROS é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A redução dos estoques de glicogênio muscular promove a fadiga dos músculos estimulados, coincidindo com um aumento na produção de ROS (SILVEIRA et al., 2008), crucial para o remodelamento que ocorre no músculo esquelético em resposta à prática de exercícios físicos e por inatividade muscular por períodos prolongados (POWERS et al., 2010). O efeito agudo de ROS sobre a função muscular é mediada por alterações na sensibilidade do Ca^{2+} miofibrilar e pode contribuir para o desenvolvimento de fadiga muscular (LAMB e WESTERBLAD, 2011).

Até a década de 90 do século passado, ROS eram considerados subprodutos tóxicos resultantes dos processos patogênicos, envelhecimento celular e do estresse oxidativo. O papel das mitocôndrias foi avaliado como fonte principal para a geração de superóxido como um subproduto do metabolismo oxidativo normal, mas estudos recentes identificaram vários locais subcelulares em que o superóxido ou de óxido nítrico são gerados em resposta a estímulos celulares. A produção de ROS é um fenômeno onipresente na vida de células eucarióticas, e evidências claras comprovam que estes elementos são tóxicos, mas também servem de sinalizadores que regulam os processos fisiológicos. (JACKSON, PYE e PALOMERO 2007; BARBIERI e SESTILI, 2012).

Um aumento nos níveis de ROS pode provocar uma oxidação parcial ou severa de componentes celulares, alterando a capacidade de redução nas células, do controle de ROS e do metabolismo celular, decisivos em condições de estresse (JUBANY-MARÍ, MUNNÉ-BOSCH e ALEGRE, 2010; WOJCIK, BURZYNSKA-PEDZIWIATR e WOZNIAK, 2010).

ROS são geradas em presença de O_2 por mitocôndrias, células fagocitárias, peroxissomos e citocromo P450 em condições fisiológicas, podendo apresentar dupla função no organismo humano (WOJCIK, BURZYNSKA-PEDZIWIATR e

WOZNIAK, 2010): participam das cascatas de transdução de sinal da célula, ativando fatores de transcrição responsáveis pela expressão dos genes relevantes para o crescimento e diferenciação celular (MELO et al., 2011) ou causando dano oxidativo ao DNA celular, proteínas e lipídios, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, Diabetes mellitus tipo 2, catarata, artrite reumatoide ou doenças neurodegenerativas diferentes (MILAEVA, 2011). Compostos endógenos (glutationa, ubiquinol, urato, bilirrubina) e enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase) estão envolvidos na desintoxicação de ROS (AFANAS'EV, 2011), assim como numerosos componentes dietéticos (vitamina C, a vitamina E, carotenóides e polifenóis) estão associados ao sistema de defesa antioxidante (MCGINLEY, SHAFAT e DONNELLY, 2009).

Khanfer et al. observaram em 2010 uma elevação nos níveis de superóxido liberados por neutrófilos em indivíduos submetidos à provas acadêmicas, simulando fontes de stress psicológico agudo e crônico, com elevação a curto prazo na fagocitose e redução na produção de superóxido induzida pelo estresse agudo. A concentração de ROS nos sistemas biológicos é extremamente baixa e suas velocidades de reação são extremamente altas, sendo as taxas de produção iguais às reações com biomoléculas, tornado difícil a detecção destes elementos (FLOYD, 1990). O mecanismo de ação da ROS permanece desconhecido (LUIN, GINIATULLIN e SCIANCALEPORE, 2011) e sua atividade em músculos da mastigação é escassa na literatura.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do estresse crônico repetido em músculo masseter superficial e profundo de ratos associado ou não à exodontia unilateral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1.1. Avaliar do papel do estresse, da maloclusão ou associação de estresse e maloclusão no ganho de peso dos animais;

3.2.1.2. Avaliar o músculo masseter superficial por meio de:

3.2.1.2.1. Análise da atividade gelatinolítica total (MMPs);

3.2.1.2.2. Extração e dosagem da mieloperoxidase (MPO).

3.2.1.3. Avaliar o músculo masseter profundo por meio de:

3.2.1.3.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE);

3.2.1.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);

3.2.1.3.3. Imunoistoquímica:

3.2.1.3.3.1. Anticorpo contra a laminina e CD31 do endotélio dos capilares marcados;

3.2.1.3.4. Histoquímica:

3.2.1.3.4.1. Reação com a Succinato Desidrogenase (SDH) para demonstrar a capacidade oxidativa da fibra e sua resistência à fadiga;

3.2.1.3.4.2. Reação com a Nicotinamida Adenina Dinucleotideo (NADH) para demonstrar a atividade metabólica;

3.2.1.3.4.3. Concentração das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) produzidas pelas fibras.

Material e Método

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. ANIMAIS

Ratos machos Wistar pesando aproximadamente 200g foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (Tabela 1): controle (GC), submetidos à exodontia unilateral dos molares superiores esquerdos (GM), expostos ao protocolo de estresse crônico repetido (GE) e submetidos à exodontia associado ao estresse crônico repetido (GME). A tabela abaixo representa a distribuição dos animais nos respectivos grupos e os protocolos utilizados nas diferentes situações. Os animais dos grupos GC e GE (n=10) receberam o protocolo pré-operatório para exodontia e mantiveram com a boca aberta, porém sem a exodontia.

Tabela 01 *- Grupos experimentais*

Grupo	n	Estresse	Maloclusão
GC	5	-	-
GM	5	-	+
GE	5	+	-
GME	5	+	+

Os ratos foram procedentes do biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Campus Ribeirão Preto, mantidos em temperatura ambiente controlada entre 22 a 24°C e com timer programado para 12 horas de iluminação diárias (ciclo claro inicia às 6:00 h). Os animais receberam ração e água filtrada à vontade ou controlada, de acordo com o protocolo experimental realizado. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais conforme protocolo n^{o} 11.1.130.53.5.

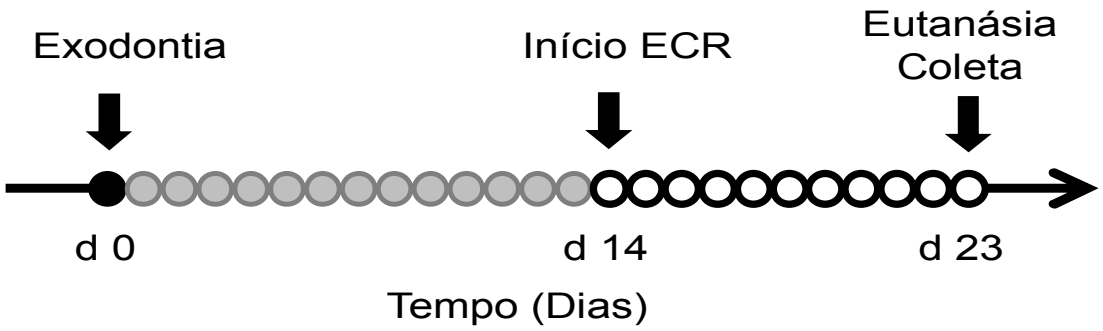
4.2. INDUÇÃO DA ALTERAÇÃO OCLUSAL EM ANIMAIS:

Nos grupos com alteração oclusal (GM e GME), dez ratos foram previamente anestesiados com associação de Xilazina 4% (10mg/kg) e Cetamina 10% (80mg/kg), intraperitonialmente, para a exodontia com auxílio de pinça anatômica infantil e

Hollemback 3S, esterilizados com Polivinilpirrolidonaiodo (PVPI), no Dia 0 (Figura 01: A). 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 (Diclofenaco sódico -*"Voltaren")* na dose de 0,004ml/100g peso corpóreo.

4.3. PROTOCOLO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO

Os animais do GE e GME foram submetidos ao estresse por contensão (n=10) no laboratório de Fisiologia, mantidos em aparato metálico com ventilação adequada (Figura 01: B), permanecendo individualmente em restrição física 2 horas por dia, durante 10 dias (adaptado de Ferretti et al., 1995), a partir do 14º dia (Fluxograma 01) após o tempo zero.



Fluxograma 01 - *intervenções realizadas nos animais de GE,GM e GME ao longo do período experimental.*

4.4. PESAGEM DOS ANIMAIS

Usando uma balança Marca Toledo do Brasil, modelo 9094C/4, série 10286058 os animais foram pesados individualmente e os dados foram registrados em um protocolo, para avaliar se o peso do animal responde às situações de estresse associado ou não à maloclusão (Tabela 2).

Tabela 2 - peso dos animais ao longo do experimento em gramas

Grupo	Animal	Dia					
		D_0	D_5	D_{10}	D_{15}	D_{20}	D_{23}
GM-I	1	202	237	273	291	314	327
	2	191	210	247	268	290	310
	3	200	225	261	283	311	328
	4	205	224	267	300	309	330
	5	203	222	264	281	315	315
GSM-I	1	248	288	336	344	380	392
	2	223	252	297	326	332	347
	3	232	257	290	304	312	324
	4	225	255	293	294	313	320
	5	213	231	261	283	292	300
GM-II	1	187	225	269	302	342	353
	2	208	259	307	351	382	391
	3	206	240	278	314	353	372
	4	210	254	298	338	369	380
	5	188	239	296	343	379	388
GSM-II	1	239	282	330	368	387	401
	2	254	305	361	383	405	430
	3	251	296	355	383	409	428
	4	201	242	300	345	376	385
	5	211	269	330	375	408	415

Tabela 3 - peso dos animais ao longo do experimento em gramas

Grupo	Animal	Dia				
		D_5	D_{10}	D_{15}	D_{20}	D_{23}
GM-I	1	35	71	89	112	125
	2	19	56	77	99	119
	3	25	61	83	111	128
	4	19	62	95	104	125
	5	19	61	78	112	112
GSM-I	1	40	88	96	132	144
	2	29	74	103	109	124
	3	25	58	72	80	92
	4	30	68	69	88	95
	5	18	48	70	79	87
GM-II	1	38	82	115	155	166
	2	51	99	143	174	183
	3	34	72	108	147	166
	4	44	88	128	159	170
	5	51	108	155	191	200
GSM-II	1	37	61	100	139	161
	2	60	94	146	214	250
	3	41	89	135	124	150
	4	52	92	141	155	189
	5	44	89	133	174	194

Posteriormente, outra tabela foi montada com o ganho real do peso, considerando que no dia zero (D_0) era nulo (0). Por meio desta tabela, foi realizada a quantificação no programa SPSS (Tabela 3).

4.5. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

No 23º dia, os animais de todos os grupos previamente anestesiados intraperitonialmente com associação de Xilazina 4% (10mg/kg) e Cetamina 10% (80mg/kg); tiveram o músculo masseter esquerdo removido por dissecação e separado em feixes: superficial e profundo.

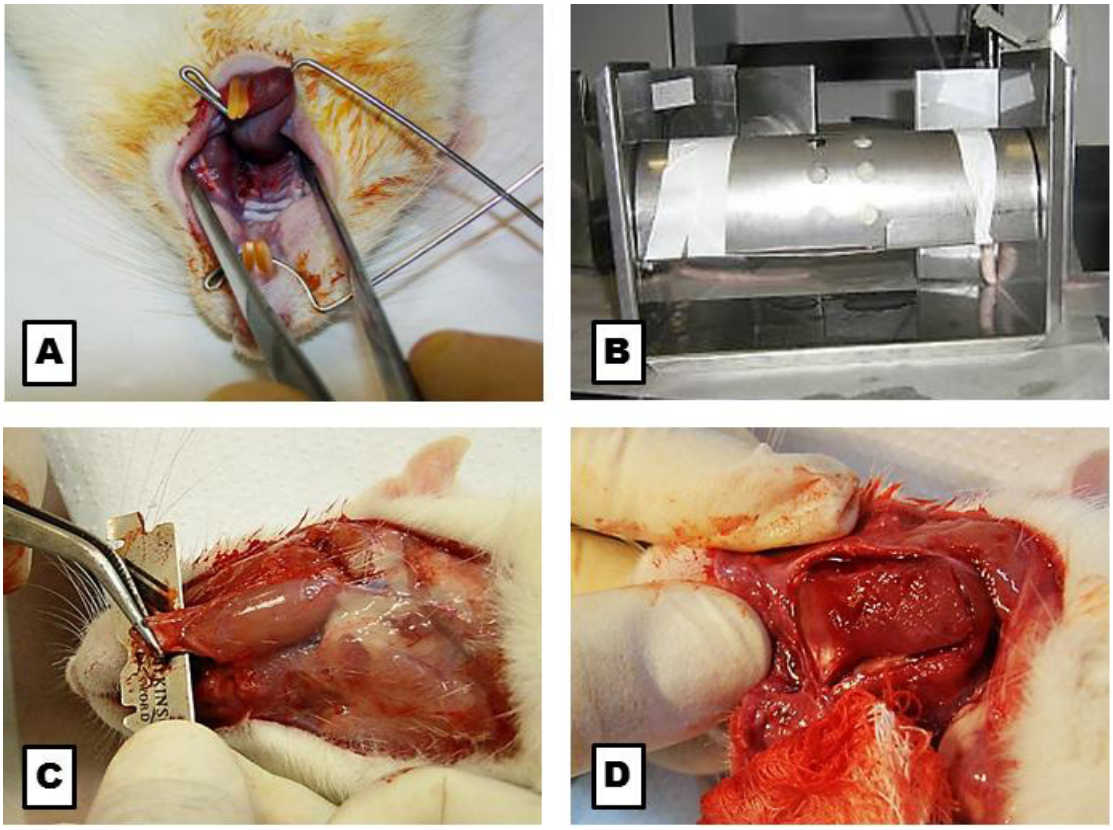


Figura 01 - *A: procedimneto cirúrgico para exodontia unilateral; B: aparato metálico para contenção e estresse crônico repetido; C, D: remoção do feixe superficial e profundo do músculo masseter, respectivamente*

4.5.1. FEIXE SUPERFICIAL

O feixe superficial do músculo masseter (Figuras 01:C) foi dividida em porções anterior para MMPs e posterior para MPO (Figuras 02), os quais

foram acondicionados em um recipiente, congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80°C.

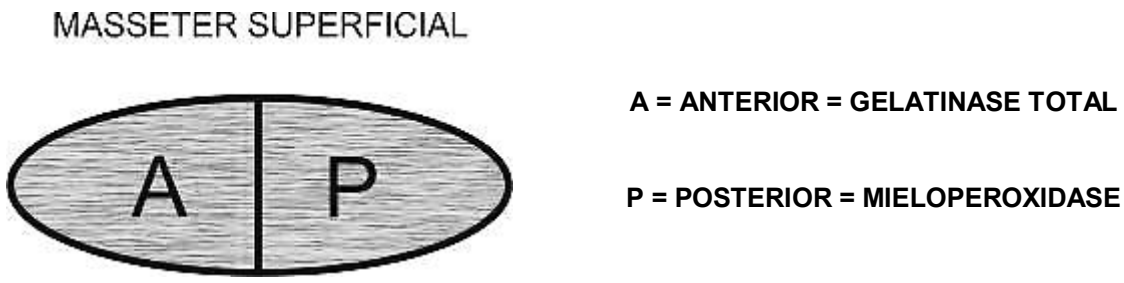


Figura 02: *representação do corte no músculo masseter superficial*

4.5.1.1. Técnica para dosar atividade de MMPs-2, -9

O zimograma permite visualizar diferentes isoformas de uma enzima ou das formas pró-enzima e enzima ativa, que são muito frequentes em enzimas proteolíticas extracelulares, como as MMPs.

Os níveis de MMP-2 e MMP-9 foram determinados na região anterior do feixe superficial do músculo masseter pela técnica de zimografia. Zimografia consiste em um gel de eletroforese ao qual é co-polimerizado o substrato para as enzimas em estudo. Neste caso, utilizamos gelatina, uma vez que a MMP-2 e a MMP-9 são gelatinases. As amostras de músculos foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração ($CaCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo os inibidores de proteases fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubadas por 16 horas em geladeira. Do sobrenadante destes extratos, aplicou-se volume correspondente a 30 µg de proteína misturados em igual volume de tampão contendo SDS em géis de poliacrilamida a 12%, contendo 1% de gelatina. Após eletroforese, estes géis foram submetidos a dois banhos de Triton de 30 minutos, para remover o SDS e para ocorrer a renaturação das proteínas e ativação enzimática. Em seguida os géis foram incubados em tampão Tris-$CaCl_2$ pH 7,4 por 16 horas a 37 °C. Por fim, os géis foram fixados e corados com solução de Coommassie Blue 0,05%, que cora todo o gel em azul por sua afinidade por proteína (gelatina). Para visualização das bandas referentes às MMPs, os géis foram descorados em solução de metanol a 30%/ácido acético 10%. Observa-se a formação de bandas claras,

devido à degradação da gelatina incorporada ao gel, contra o fundo azul escuro do Coommassie. A quantificação das bandas das MMPs foi feita usando o programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health). A formas da MMP-2 foram identificas pelas bandas de 75, 72 e 64 kDa; e a MMP-9 como a banda de 92, 87, 125, 250... kda .

A obtenção das imagens foi realizada com o aparelho fotodocumentador DNR Chemi-bis 1.6 e a quantificação da atividade gelatinolítica das bandas observadas no gel foi realizada com *software* ImageJ. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.5.1.2. Técnica para extração e dosagem de MPO

A porção posterior do feixe superficial foi triturada em polytron, para extrair e dosar MPO, que é diretamente proporcional ao número de polimorfonucleares (PMNs) presentes no tecido. A quantidade de MPO em cada amostra de músculo triturado foi medida enzimaticamente pela suspensão do material em 2.0ml de Hixadeciltrimetilamônio e 0,5% brometo (Sigma Chemical Co.,St Louis,Mo USA) em 50mM de tampão de fosfato de potássio, pH 5.4 para solubilizar MPO.

A concentração da MPO foi avaliada espectrofotometricamente pela adição de 1.6mM de tetrametil benzidina (Sigma Chemical Co) diluido em δ-dianisidina dicloridrato (Sigma Chemical Co) e 0.5mM peróxido de hidrogênio em placas Costar de 96 poços (Corning Inc., New York, NY, USA).

Após a adição de 4M H_2SO_4 para interrupção da reação, foi realizada a leitura colorimétrica das placas Costar com auxilio de leitora μQuant^{tm} (Bio-Tek instruments Inc, Winooski,VT,USA) em um comprimento de onda de 450nm.

4.5.2. FEIXE PROFUNDO

O músculo masseter profundo (Figura 01: D)foi dividido em quatro porções, sendo que apenas as regiões anterior (A) e médio posterior (MP) foram utilizadas para a realização das diferentes análises (Figura 03),.

A = ROS
MET
IMUNOISTOQUÍMICA
HE
MP = HISTOQUÍMICA (SDH, NADH)

Figura 03 - *representação gráfica do corte no músculo masseter profundo*

4.5.2.1. Técnica de HE

Um fragmento da porção anterior foi imersa em solução fixadora contendo 2% paraformaldeído, 0,25% glutaraldeído e 0,1% ácido pícrico durante 48 horas. Após o período de fixação a peça foi lavada em tampão PBS (tampão fosfato salino), processada e incluída em parafina para técnica de HE.

Os cortes de 5 µm de espessura foram colocados sobre lâminas e submetidas ao procedimento rotineiro de coloração com hematoxilina, e eosina, Posteriormente, foram desidratadas em no álcool 95º, álcool absoluto (I, II, III) e por último em xilol (I, II, III) e montadas com entelan.

4.5.2.2. Técnica de MET

Após o período de estresse, foi realizada a perfusão dos animais com solução (100 ml) contendo PFA a 2%, 2,5% de glutaroldeido em tampão fosfato 0,1M com pH 7,4. O músculo masseter foi dissecado e fragmentos da porção anterior do feixe profundo foram imersos em glutaraldeído a 2%, por 2 horas. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas a 4°C, em seguida foram contrastados em uranila a 2,5%.

As peças foram desidratadas em série crescente de alcoóis, passadas pelo óxido de propileno por duas vezes, durante 20 minutos cada uma, em seguida submetidas a infiltração na mistura de 1:1 de óxido de propileno e resina epóxi 812 e incluídas em resina. As peças foram mantidas em estufa à 60°C até a polimerização (±36 horas). Os blocos foram trimados e montados no ultramicrótomo para a obtenção de cortes semi-finos de 1-3 µm, os quais foram corados com azul de

metileno para a identificação da área de interesse. Os cortes ultra-finos de ± 90nm foram obtidos em ultramicrótomo Reichert, Ultra-Cut e coletados em telas de 200 “mesh”, contrastados com soluções de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão, JEOL 1010.

4.5.2.3. Técnica para imunoistoquímica

Para a imunoistoquímica foi utilizado o método indireto com sistema de amplificação (biotina - streptavidina - peroxidase).

4.5.2.3.1. Detecção de capilares (Laminina e CD31)

A porção anterior do feixe profundo do músculo masseter ipsilateral à exodontia foi congelada em nitrogênio líquido e preservada em freezer -80°. Os cortes transversais obtidos em micrótomo criostato, coladas em lâminas silanizadas e foram imersas em H_2O_2, 25 volumes (Dinâmica, Brasil) para fixação. Para o bloqueio de outras proteínas inespecíficas presentes no tecido, foram incubados em câmara úmida com solução de BSA 3% (Pentex, USA) em tampão PBS. Após lavagem, os cortes foram incubados nos seguintes anticorpos primários: laminina e CD-31. Após incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e submetidos ao “Kit” LSAB – HRP (DAKO Cytomation, Dinamarca) de amplificação (anticorpo secundário biotinilado) e streptavidina conjugada à peroxidase. As reações foram reveladas em DAB (3,3 diaminobenzina, Sigma Aldrich, USA). Ao final da reação, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados, contracorados com hematoxilina de Harris (Dinâmica, Brasil) e as lâminas montadas com Permount (Fisher Chemicals, USA).

Os capilares demonstrados com anticorpos anti-laminina e CD31, permitiram verificar a densidade de capilares no músculo nas diferentes condições experimentais. Para a quantificação cinco imagens aleatórias das lâminas foram sistematicamente capturadas com a objetiva de 40X com auxilio de câmera acoplada ao microscópio LEICA, realizando a contagem do número total de capilares de cada campo com o auxílio do programa *ImageJ*. Análise qualitativa de capilares marcados com CD31 foi realizada para observar a disposição, o calibre aparente e o grau de marcação dos capilares no músculo masseter.

4.5.2.4. Técnicas de Histoquímica

A porção média posterior foi criprotegida com talco e congelada por imersão em nitrogênio (-150°C), durante 1 minuto e acondicionado em freezer à -70°C, até ser transferido para a câmara de um micrótomo criostato à -20°C, para a realização de cortes transversais de 10 µm de espessura.

4.5.2.4.1. Demonstração de SDH

Lâminas contendo cortes do músculo foram incubadas em solução de succinato de sódio e sais de nitroblue tetrazólio (NBT) a 37°C, por 30 minutos. Posteriormente lavadas com água destilada, fixadas em formol Cálcio Baker por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada e montadas com xarope de Apaty.

De cada secção transversal de músculo, cinco imagens foram sistematicamente capturadas com a objetiva de 20x, com auxilio de uma câmera OLYMPUS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61. Usando um sistema teste de 80 pontos sobreposto à imagem, foram quantificados os pontos que recaiam sobre as fibras claras, intermediarias e escuras por campo analisado.

4.5.2.4.2. Demonstração da NADH

Lâminas contendo cortes do músculo foram incubadas em solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) mais sais de tetrazólio a 37°C, por 30 minutos, lavadas com água destilada, fixadas em formol 5% tamponado pH 7,0 por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada e montadas com xarope de Apaty.

De cada secção transversal de músculo, imagens foram sistematicamente capturadas com auxilio de uma câmera OLYMPUS DP72 acoplada ao microscópio OLYMPUS BX61, com a objetiva de 20x. Usando um sistema teste de 80 pontos sobreposto à imagem foram quantificadas as fibras claras, intermediárias e escuras por campo analisado, avaliando a quantidade relativa de fibras por área de músculo analisada. Essa análise permitiu determinar a capacidade oxidativa do músculo em diferentes condições experimentais.

4.5.2.4.3. Demonstração de ROS

A porção anterior do feixe profundo foi crioprotegida com talco, imersa em nitrogênio líquido por um minuto e mantida em freezer -80°. Cortes de secções transversais com espessura de 05 µm foram realizados em micrótomo criostato, posicionados em lâminas e incubados com dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 µg/mL (HAO et al., 2006; VIEL et al., 2008) por 30 minutos em câmara úmida e escura. Esse "probe" reage com o superóxido ($O_2^{\bullet -}$) presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxietídeo e dietídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha no local. Em seguida os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em PFA 4%.

As lâminas foram analisadas, in situ, com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltda, Cambridge, England), fotografadas em aumento de 40x e a quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. CONTROLE DE PESO

Foi analisado o ganho de peso ao longo do período experimental dos animais do diferentes grupos com auxílio de balança de precisão, com coleta dos dados nos dias D^0, D^5, D^{10}, D^{15}, D^{20} e D^{23}. Foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA para três fatores por se tratar de dados vinculados.

Este teste revelou que os animais dos grupos GM tiveram um ganho de peso semelhante ao GC, sendo estatisticamente diferente de GE e GME, onde o ganho de peso foi irregular e inferior aos animais do GC. Os dados demostraram que a exodontia unilateral isolada não interfere no ganho de peso, porém o estresse crônico repetido isolado ou associado à exodontia diminuiu significativamente o ganho de peso quando comparado com o grupo controle.

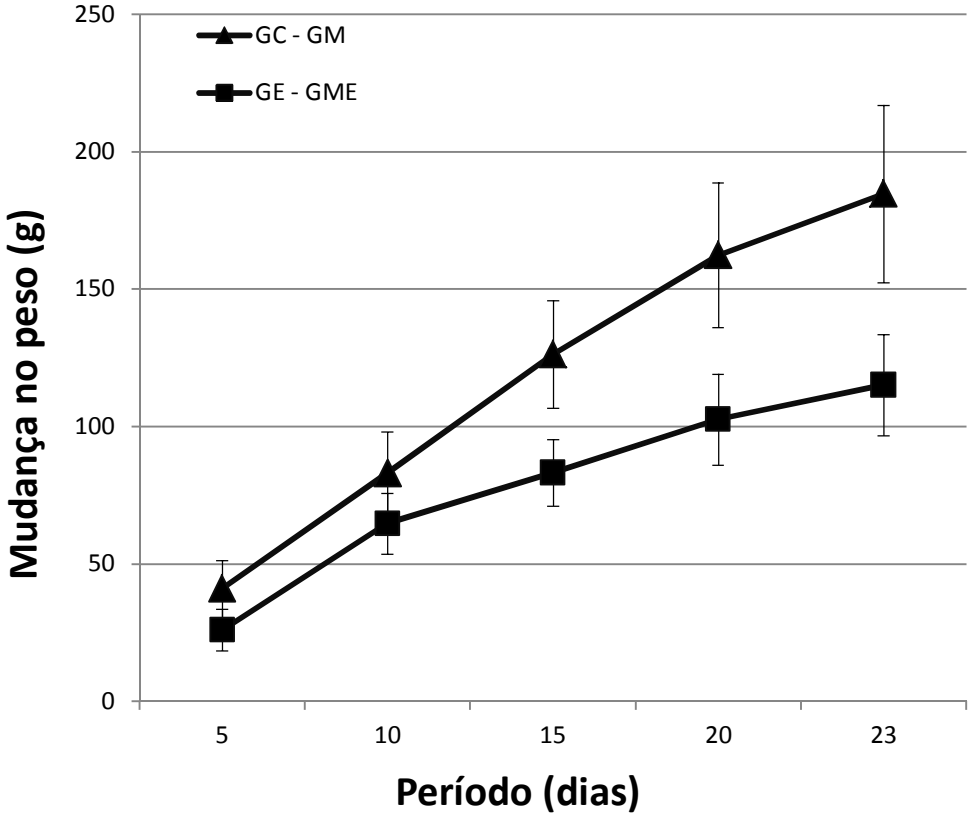


Gráfico 01 - *representação do ganho de peso no período experimental nos difernetes grupos experimentais*

5.2. METALOPROTEINASE (MMP- 2 e -9)

O gel representativo do ensaio de zimografia (Figura 4) revelou bandas com peso molecular de 72 kDa, correspondentes a atividade gelatinolítica da MMP-2, entretanto não foi possível visualizar a MMP-9 (92 kDa) no feixe superficial dos músculos masseteres ipsilateral à exodontia dos grupos controles e experimentais. A análise quantitativa da atividade gelatinolítica no tecido muscular demostrou que os dados tiveram distribuição normal. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Não houve diferença significante (p>0,05) na atividade gelatinolítica da MMP-2 entre os diferentes grupos estudados.

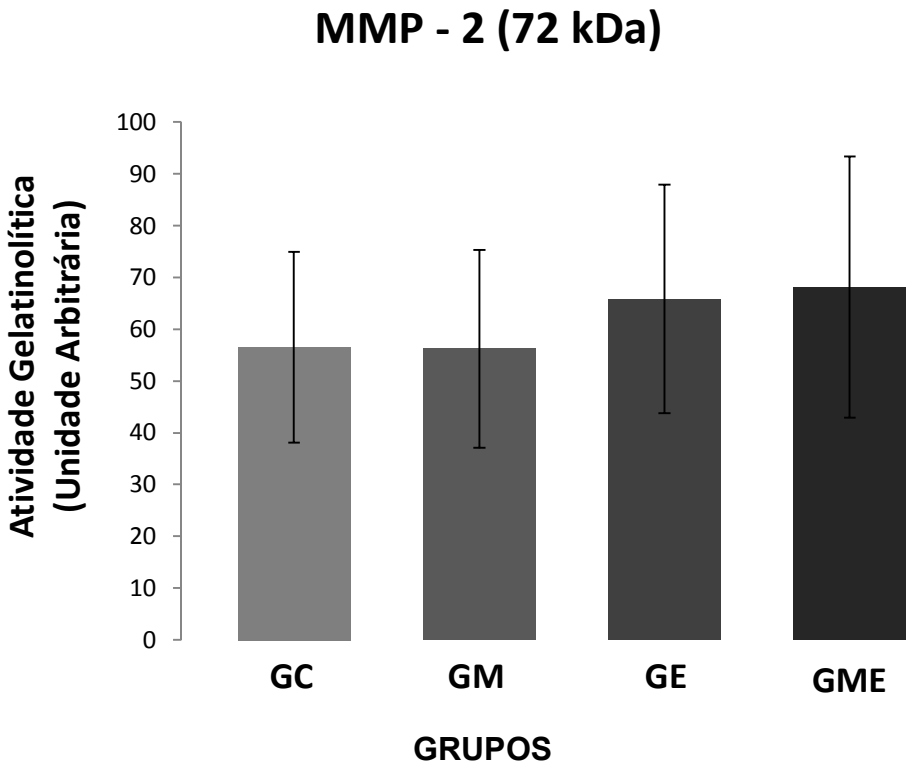


Gráfico 02 - *quantificação da atividade gelatinolítica correspondente às bandas de MMP-2 (72 kDa) (Média e Desvio Padrão)*

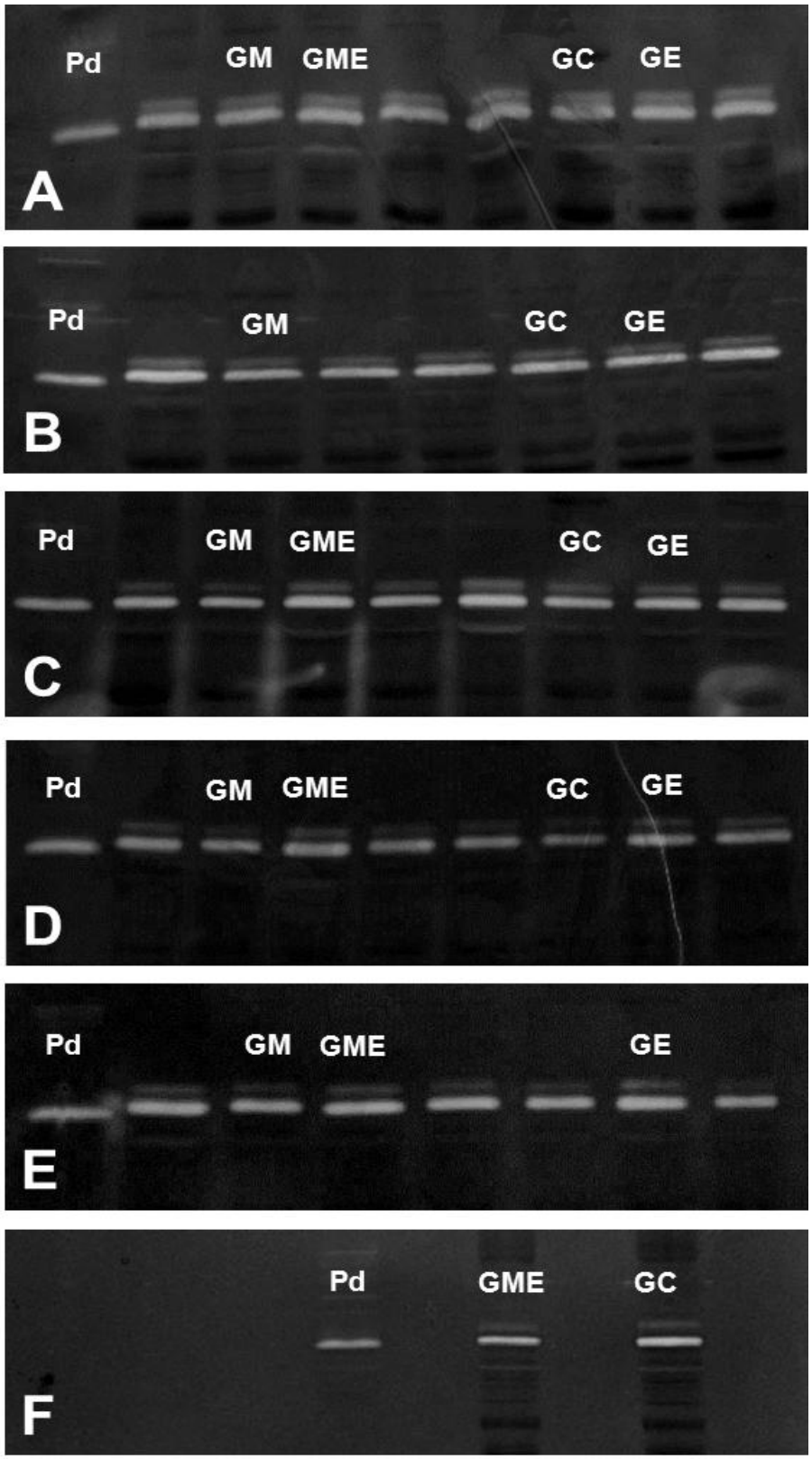


Figura 04 – *fotografia dos géis imunomarcados em membranas de nitrocelulose. Letras (A – E) representam os animais 1 - 5, respectivamente; Pd: padrão de soro bovino; F: reposição do animal 2 – GM e animal 5 – GC*

5.3. MIELOPEROXIDASE (MPO)

A quantidade de MPO é diretamente proporcional ao número de polimorfonucleares (PMNs), principalmente neutrófilos presentes nos tecidos com inflamação. A análise quantitativa do número de polimorfonucleares por miligrama de tecido muscular obtido através de equipamento de leitura colorimétrica e gráfico de curva total e baixa no programa *Microsoft Excel,* demostrou que os dados tiveram distribuição normal. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Não houve processo inflamatório distinto no feixe superficial do músculo masseter nos diferentes grupos, independente da realização da maloclusão, do estresse crônico repetido ou da associação dos protocolos.

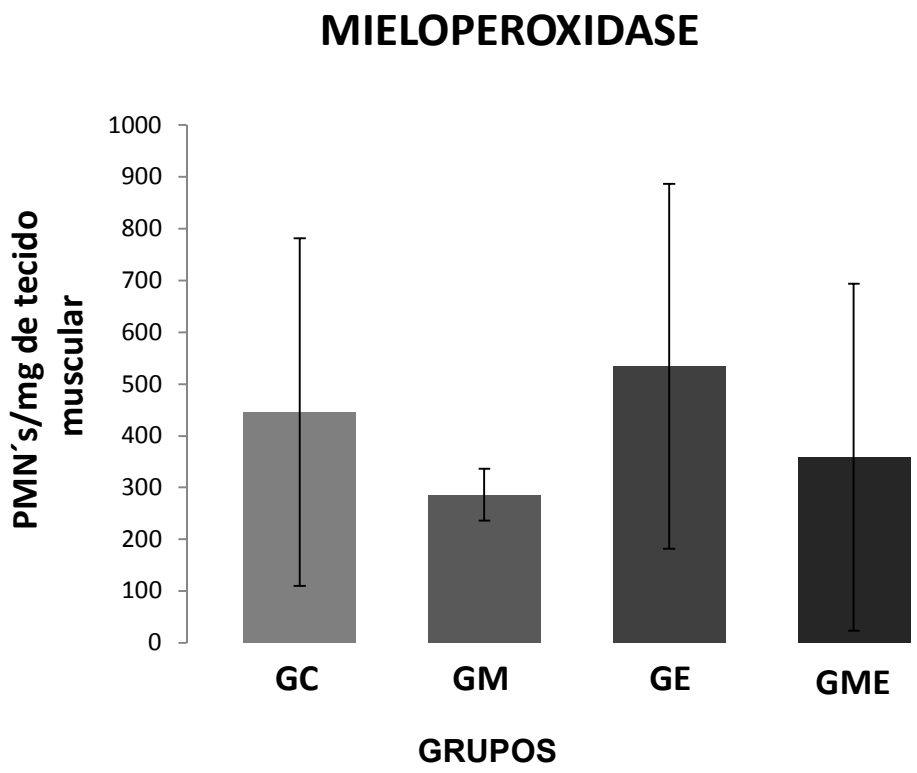


Gráfico 03 – *representação gráfica de polimorfonucleares por miligrama de tecido nos diferentes grupos (Média e Desvio Padrão)*

5.4. HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

GC

O músculo masseter do grupo controle apresentou fibras musculares em corte transversal com tamanho similar, contorno suavemente arredondado e endomísio e perimísio com aspecto de normalidade (Figura 05-A, B).

GM

O músculo de animais submetidos à exodontia exibiu fibras musculares de tamanho variado, contorno irregular, algumas com núcleos centrais (nc) e fibras pequenas com sinais de atrofia (seta branca). O perimísio e o endomísio preenchidos por tecido conjuntivo com ausência de células inflamatórias (Figura 05-C, D).

GE

Em determinadas regiões do músculo de animais do grupo GE foram notáveis as fibras grandes de forma arredondada ou ovalada, contorno arredondado e poucas fibras musculares com núcleos em região central (nc). O perimísio e endomísio com aspecto de normalidade (Figura 05-E, F).

GME

Nos animais deste grupo, foram observadas alterações no tamanho das fibras, destacando fibras maiores de contorno arredondado e as menores contorno mais angulado. Também foram observadas regiões com fibras de núcleo central (nc), perimísio e endomísio com ausência de células inflamatórias (Figura 05-G, H).

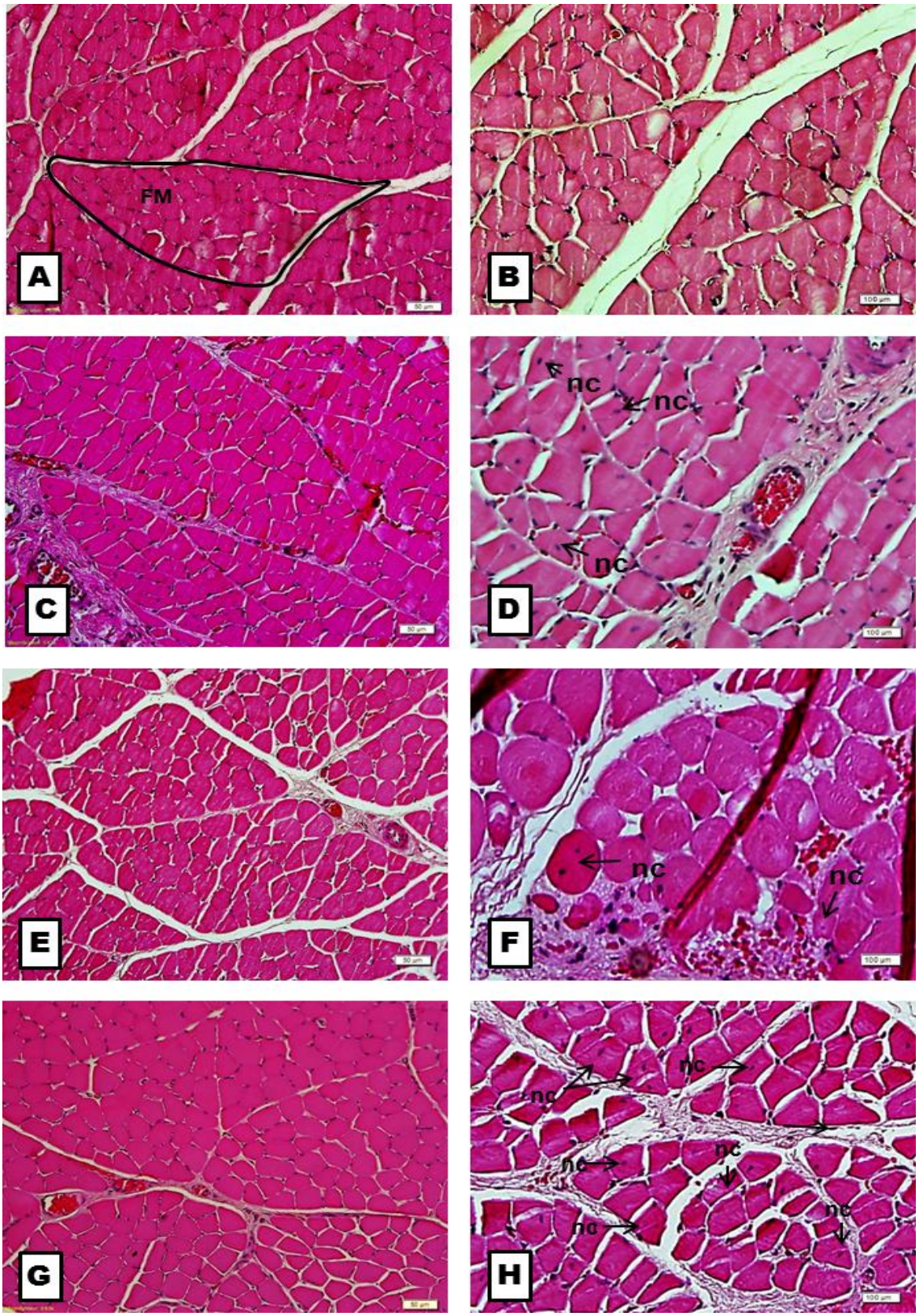


Figura 05 - *imagens representativas de HE dos grupos GC (A: 12K; B: 100K; C-D: 12K) e GM (E: 12K; F-G:40K)*

5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

GC

A ultraestrutura do músculo masseter do grupo controle revelou em corte transversal (Figura 06-A) miofibrilas entremeadas por mitocôndrias intermiofibrilares arredondadas ou ovaladas (-M, M) de tamanhos variados. Em maior aumento (Figura 06-B), essas mitocôndrias revelaram cristas mitocondriais (CM) formadas a partir da membrana interna, separadas da membrana externa (me) pelo espaço intermembranoso. Entre as miofibrilas foram evidentes os túbulos T (T) e as cisternas do retículo sarcoplasmático (cRS) com as membranas preservadas (meRS).

A Figura 06-C mostrou fibras musculares com numerosas mitocôndrias tanto subsarcolemais (MS) quanto intermiofibrilares (M) de tamanhos variados. Entre as fibras musculares, os capilares (CAP) com lúmen de aspecto normal revelaram núcleo (N) das células endoteliais (Figura 06-D).

GM

A figura 06 (E–G), mostra cisternas do retículo sarcoplasmático irregulares dispostas entre as miofibrilas (cRS*). As mitocôndrias possuem uma desorganização das cristas (CM*) e dos espaços intermembranosos. O capilar visualizado na figura XXXXX possui lúmen reduzido (L-) e escassas vesículas pinocíticas.

GE

É possível visualizar na figura 07-A, que as mitocôndrias intermiofibrilares possuem morfologia alterada revelando expansões (M*) e cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático (cRSd). Em aumento de 40.000X (Figura 07-B) observou-se mitocôndrias com numerosas cristas mitocondriais (+CM). Pode-se observar na figura 07- C o capilar sanguíneo com numerosas cavéolas e vesículas pinocíticas. Fibras musculares com mitocôndrias subsarcolemais e intermiofibrilares de tamanhos e formas (ovais e esféricas) variados (Mo) e cisternas do retículo sarcoplasmático dilatadas (cRSd) são vistas na figura 07-D.

GME

Na condição de exodontia associado ao estresse crônico repetido observou-se (Figura 07-E) miofibrilas desorganizadas, entremeadas por mitocôndrias esféricas de tamanhos variados, sendo algumas de tamanho muito reduzido (M-), e cisternas do retículo sarcoplasmático ausentes ou alteradas. Houve a diminuição das na quantidade de cristas mitocondriais (-CM) e as mitocôndrias apresentaram espaço intermembranoso irregular, observadas na figura 07-F. Na figura 07-G, observamos que a membrana das cisternas do retículo sarcoplasmático desaparece, permanecendo áreas elétron-lúcidas irregulares (cRS*) entre as miofibrilas; em outras áreas, as miofibrilas ficam contínuas umas com as outras, revelando apenas os túbulos T (T) isolados entre elas. Observamos um adelgaçamento na parede do capilar (PCp) e poucas vesículas pinocíticas (Figura 07-H), com mitocôndrias subsarcolemais, alongadas (MSa), mitocôndrias intermiofibrilares mostram expansões ou fusões (Mf) e as cisternas do retículo endoplasmático estão dilatadas e a membrana não é evidente (cRS*).

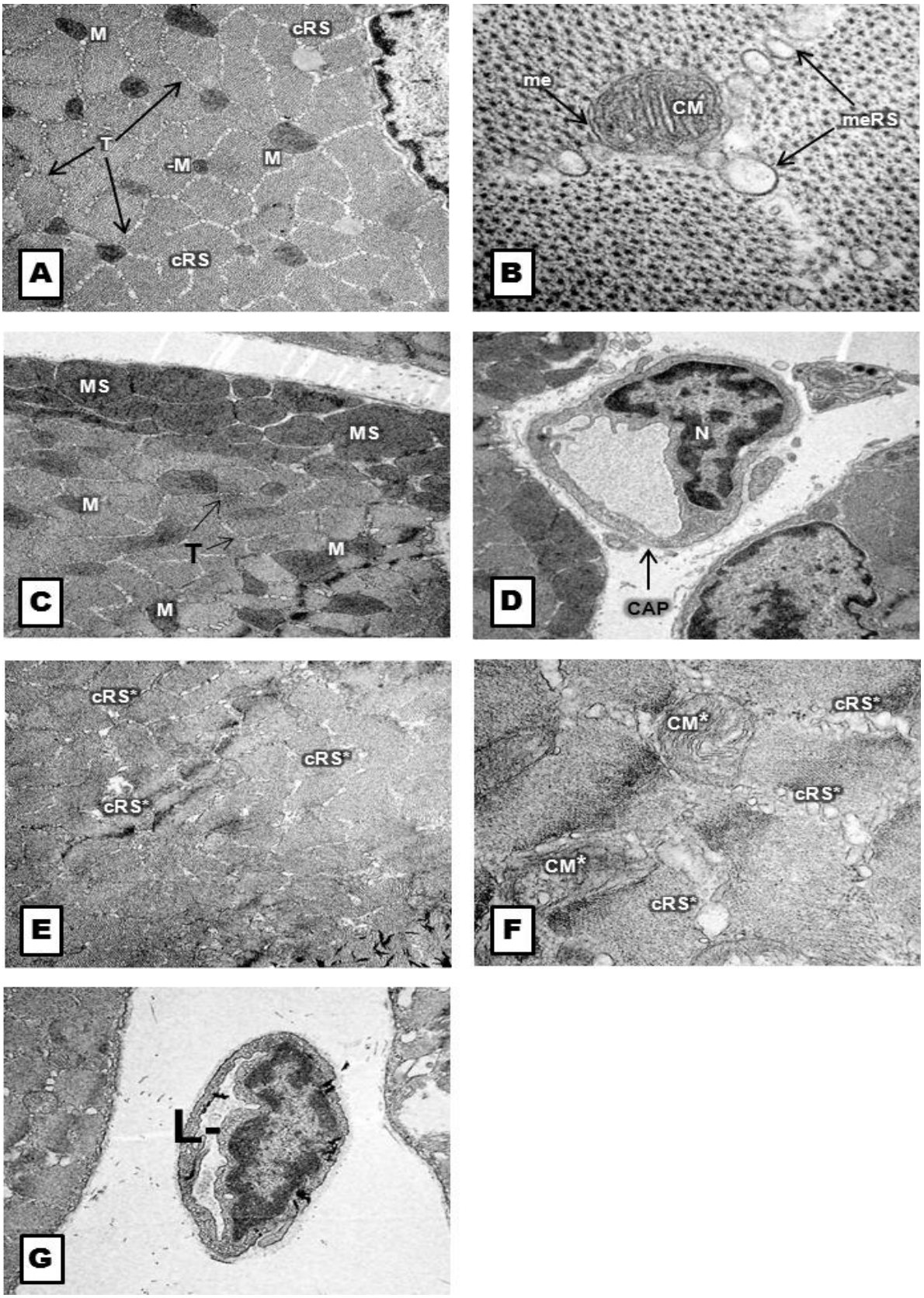


Figura 06 - *imagens representativas de MET dos grupos GC (A: 12K; B: 100K; C-D: 12K) e GM (E: 12K; F-G:40K)*

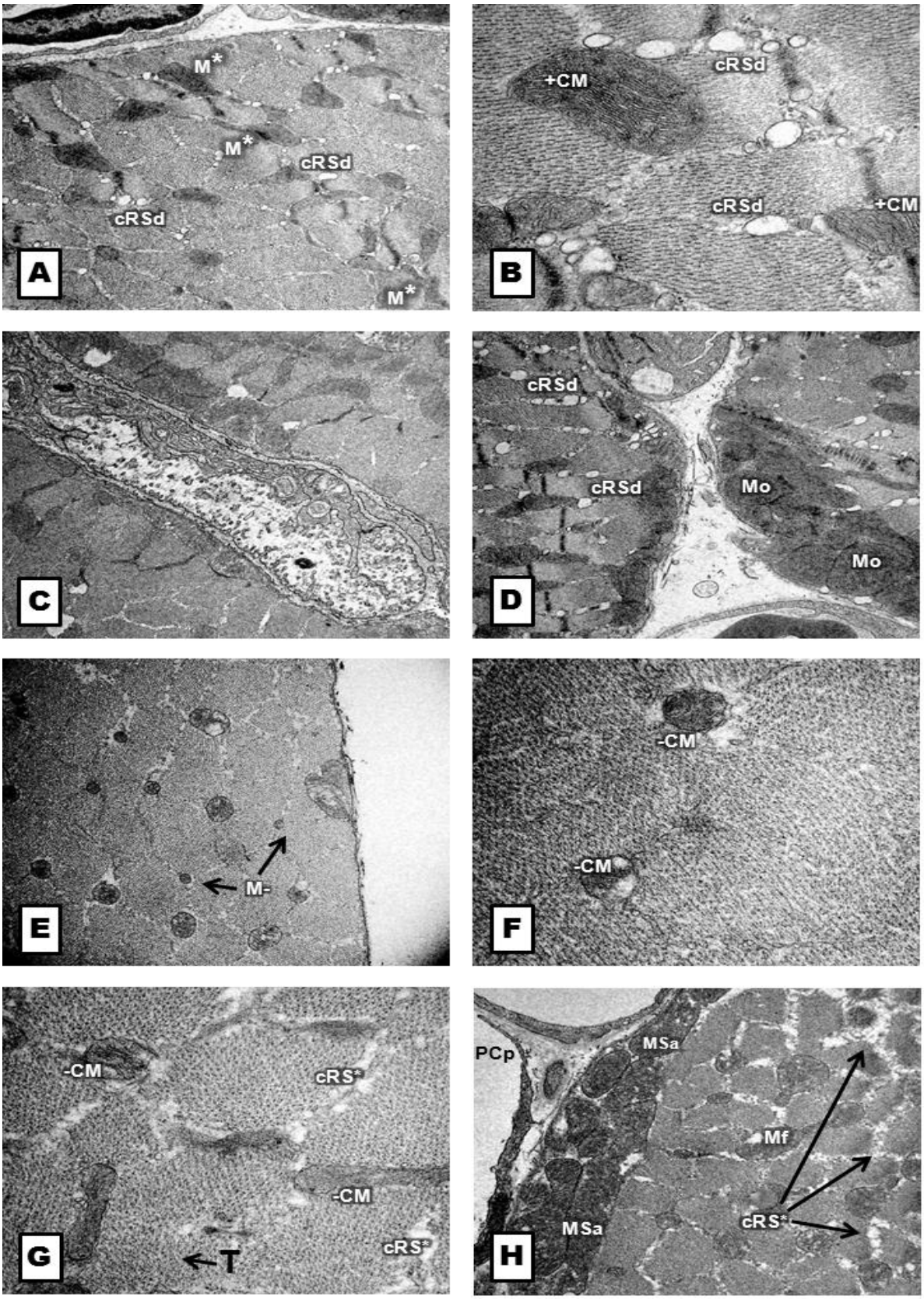


Figura 07 - *imagens representativas de MET dos grupos GE (A: 12K; B-D: 40K) e GM (E,H: 12K; F,G:40K)*

5.6. IMUNOISTOQUÍMICA

5.6.1. LAMININA

A análise quantitativa de capilares imunomarcados pela laminina (Figura 08-A-D) no tecido muscular demonstrou que os dados tiveram distribuição normal. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Houve aumento significante ($p<0,05$) na densidade de capilares em GM quando comparado com o grupo GME.

No entanto, em relação ao controle (109,9±11,9), GM (122,8±29,5) tendeu ao aumento, enquanto os grupos GE (99,6±10,6) e GME (78,2±5,57) tenderam à redução da densidade de capilares.

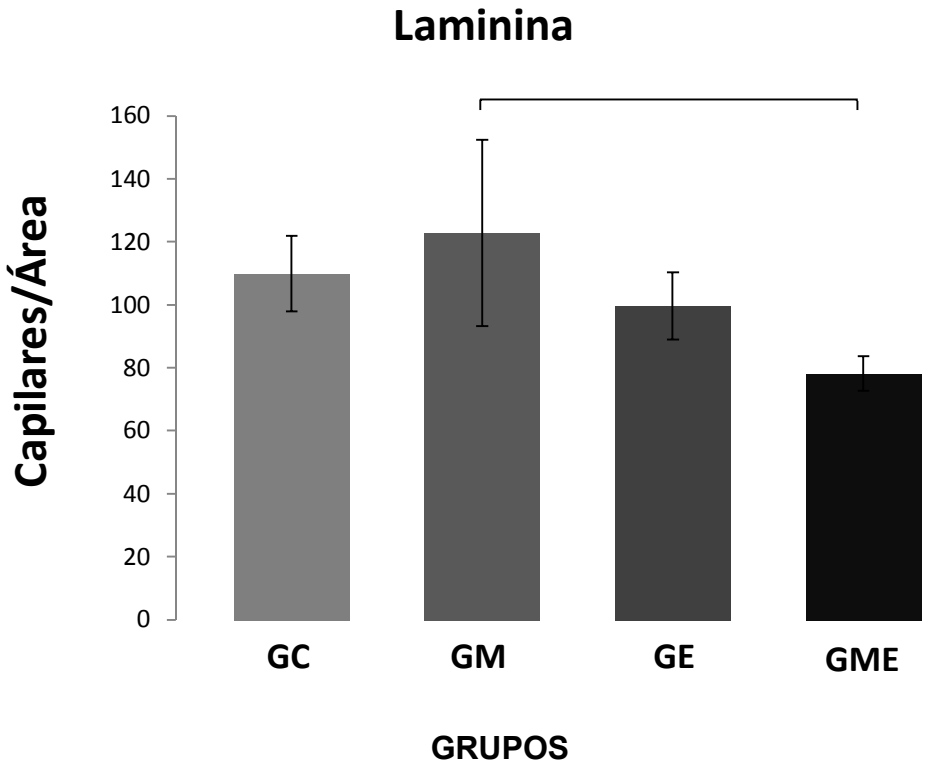


Gráfico 4 - *resultados estatísticos da densidade de capilares entre os diferentes grupos(Média e Desvio Padrão)*

5.6.2. GRUPAMENTO DE DIFERENCIÇÃO 31 (CD31)

GC

Por meio da imunomarcação de CD31 em células endoteliais foram detectados os capilares corados em marrom. Em GM, capilares com luz aberta e aspecto de normalidade foram evidentes no endomísio bem preservado por todo o músculo (Figura 08-E).

GM

O grupo submetido à exodontia apresentou capilares com aparente diminuição de lúmen, localizados no endomísio (Figura 08-F), entre as fibras musculares, algumas delas de aspecto atrófico.

GE

No grupo submetido apenas ao estresse, capilares dilatados estão dispostos no endomísio e localizados entre as fibras (Figura 08- G).

GME

Este grupo revelou a presença de capilares dilatados e outros contraídos no endomísio. Estes localizam-se entre as fibras pequenas alteradas com núcleo central e outras de aspecto normal (Figura 0-8 H).

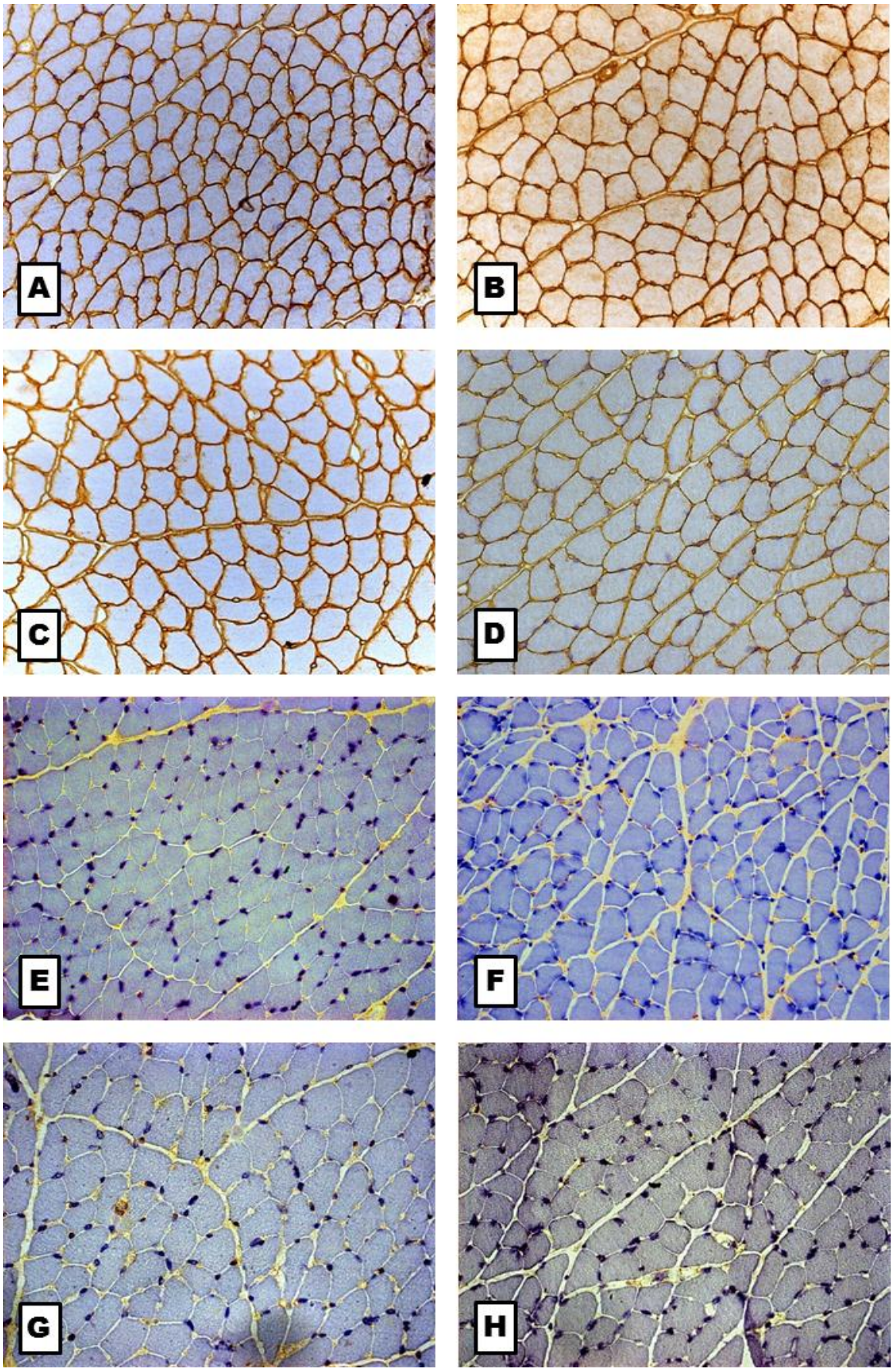


Figura 08 - *imagens representativas de capilares imunomarcados pela laminina (GC: A, GM: B, GE: C e GME:D) e por CD31 (GC: E, GM: F, GE: G e GME:H) em aumento de 40X*

5.7. HISTOQUÍMICA

5.7.1. SUCCINATO DESIDROGENASE (SDH)

No grupo GE aumentou significativamente a área de fibras escuras (13,55±4,13) quando comparado com os grupos GC (6,9±2,65), GM (9,1±5,42) e GME (8,85±6,06). As fibras intermediárias também tiveram a área relativa aumentada ($p<0,05$) nesse grupo (26,05±4,32) em relação aos grupos GC (22,45±6,04), GM (22,2±5,2) e GME (20,75±6,12). A área relativa das fibras claras por sua vez, teve significativa diminuição no GE (36,05±5,02) em relação aos grupos GC (45,95±7,11), GM (42,6±5) e GME (46,5±9,16). O aumento das fibras escuras e intermediárias em razão da diminuição de fibras claras mostra que o estresse aumentou a atividade metabólica músculo masseter profundo. A área relativa das fibras escuras, intermediárias e claras não foi diferente nos grupos GM e GME quando comparados com o grupo controle, portanto esses fatores não alteraram a atividade metabólica do feixe muscular (Figura 09-A-D).

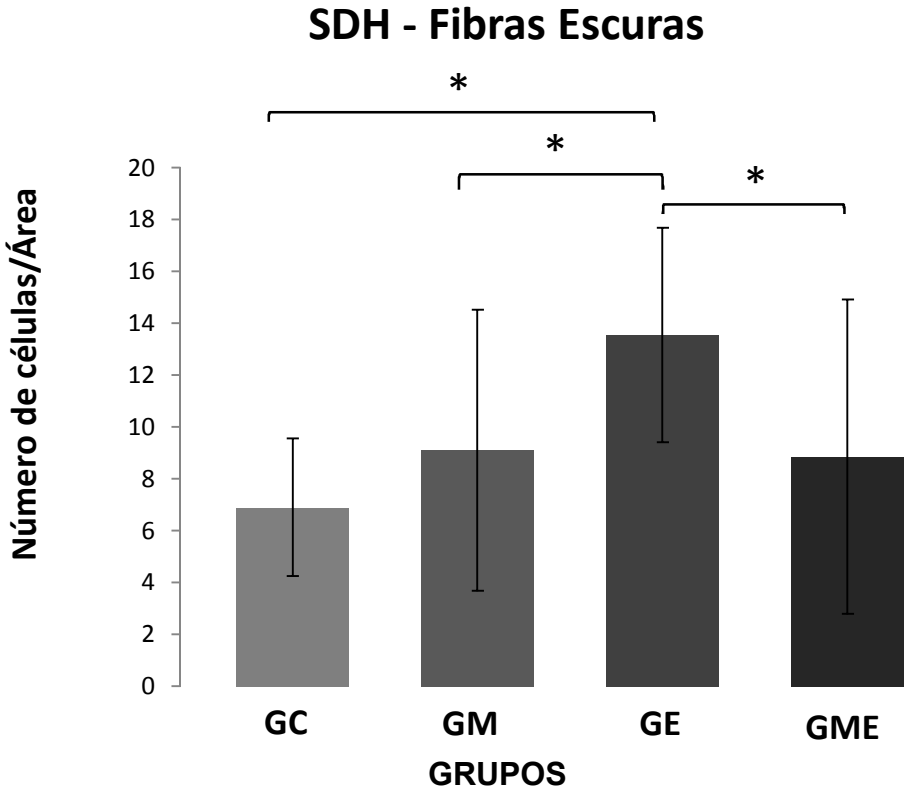


Gráfico 05 - *area de fibras escuras nos grupos diferentes. Cada coluna representa a média com o erro padrão (Média e Desvio Padrão)*

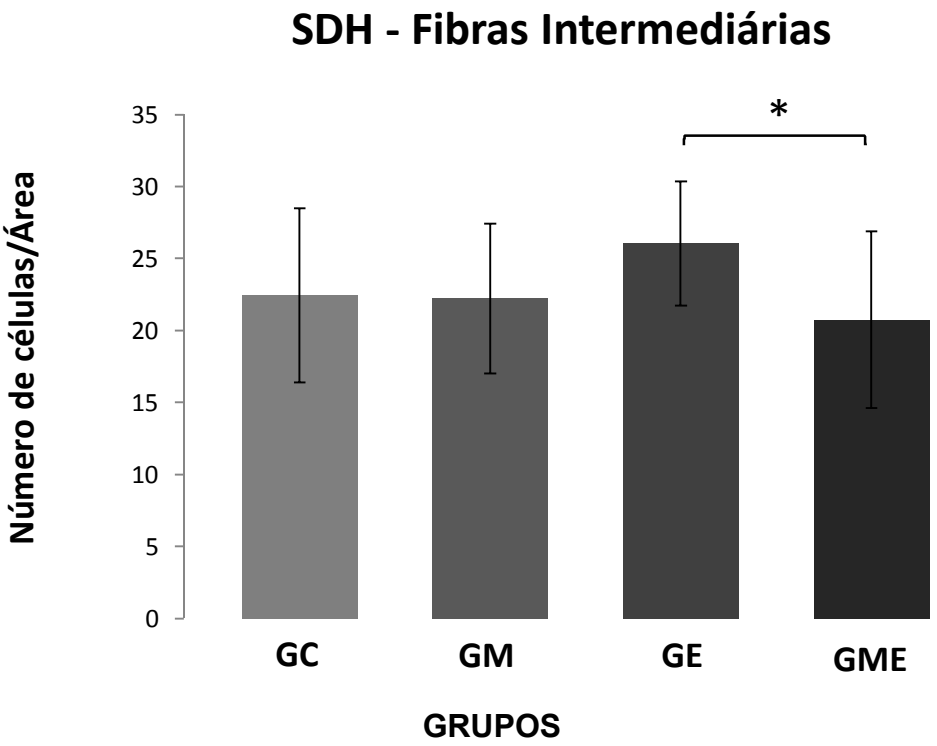


Gráfico 06 - *fibras intermediárias dos diferentes grupos com representação da significância (Média e Desvio Padrão)*

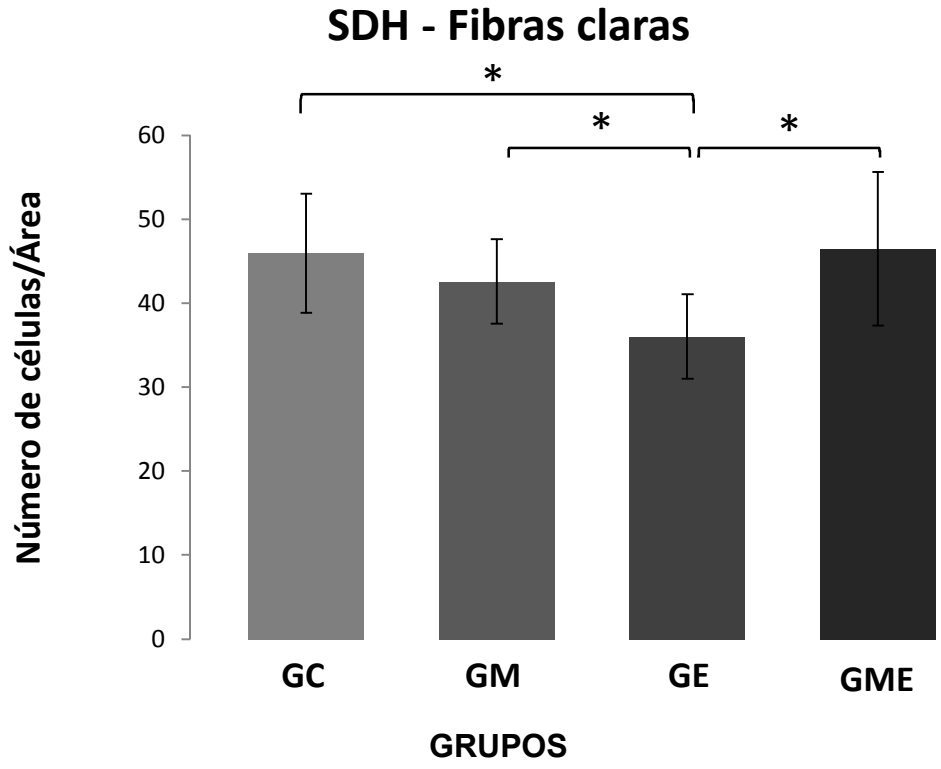


Gráfico 07 - *área de fibras claras nos diferentes grupos (Média e Desvio Padrão)*

FIBRAS TOTAIS

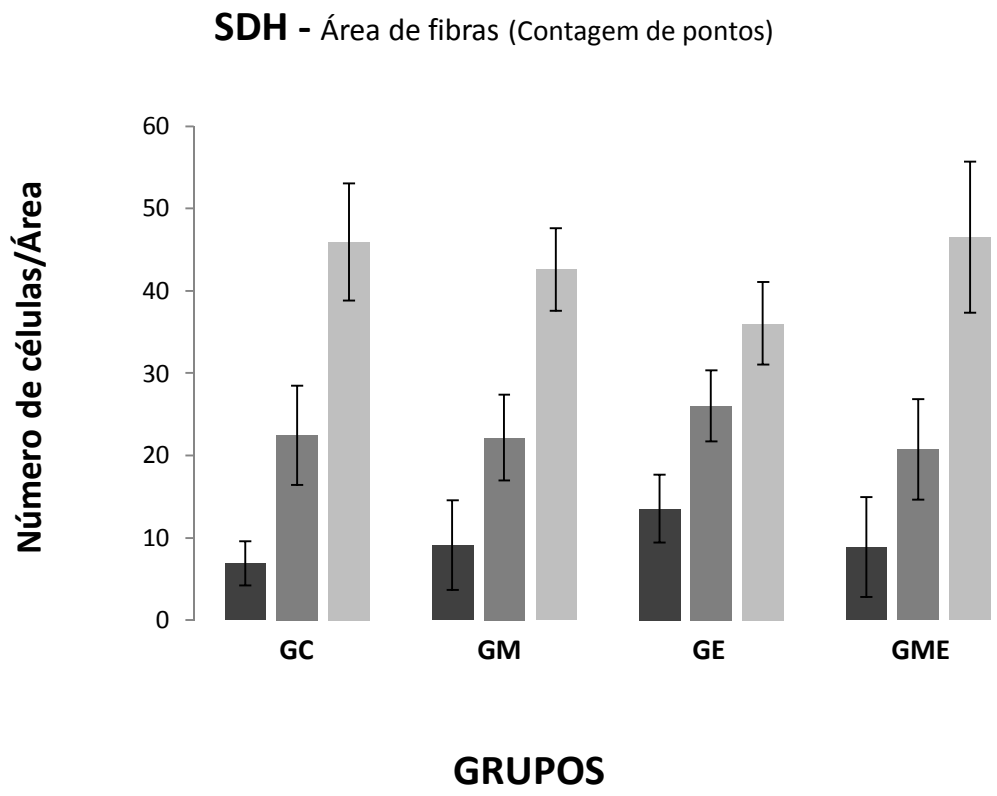


Gráfico 08 - *área relativa de fibras totais nos grupos (Média e Desvio Padrão)*

5.7.2. NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (NADH)

A reação com NADH revelou três intensidades de coloração de fibras musculares (claras, intermediárias e escuras) no feixe profundo do músculo masseter (segmento médio posterior), cujas características permitiram avaliar a sua capacidade oxidativa (Figura XXXXXX: E-G). As fibras mais escuras representaram as de maior capacidade oxidativa.

A contagem de pontos do sistema-teste que recaíram sobre as fibras coradas pela reação da NADH, foram realizadas com auxílio do *software* "*ImageJ*". A análise quantitativa das fibras mostrou que os dados de interesse tiveram uma distribuição normal. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

A área relativa de fibras escuras foi maior ($p<0,05$) nos grupos GM (10,85±3,32) e GME (8,4±4,13), enquanto no grupo GE (2,05±1,27) a área tendeu a diminuir quando comparada ao grupo controle (4,9±4,45).

Em relação à área relativa de fibras intermediárias, houve uma tendência à diminuição nos grupos GM (19,7±5,55) e GME (21,55±7). No entanto, houve aumento significante no grupo GE (33,45±5,39) quando comparada a área do grupo GC (23,6±5,43).

Não foi observada diferença estatística na área relativa de fibras claras (glicolíticas) nos diferentes grupos, com $p>0,05$, apenas uma tendência à diminuição no grupo GE (Figura 09-E-H).

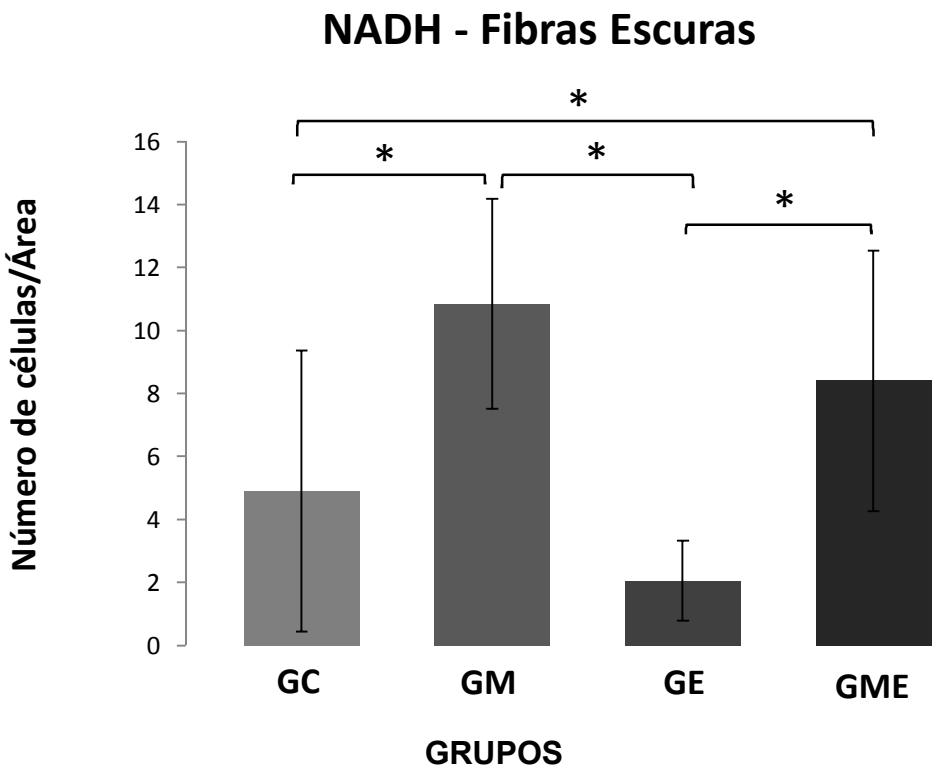


Gráfico 09 - *área relativa de fibras escuras nos diferentes grupos (Média e Desvio Padrão)*

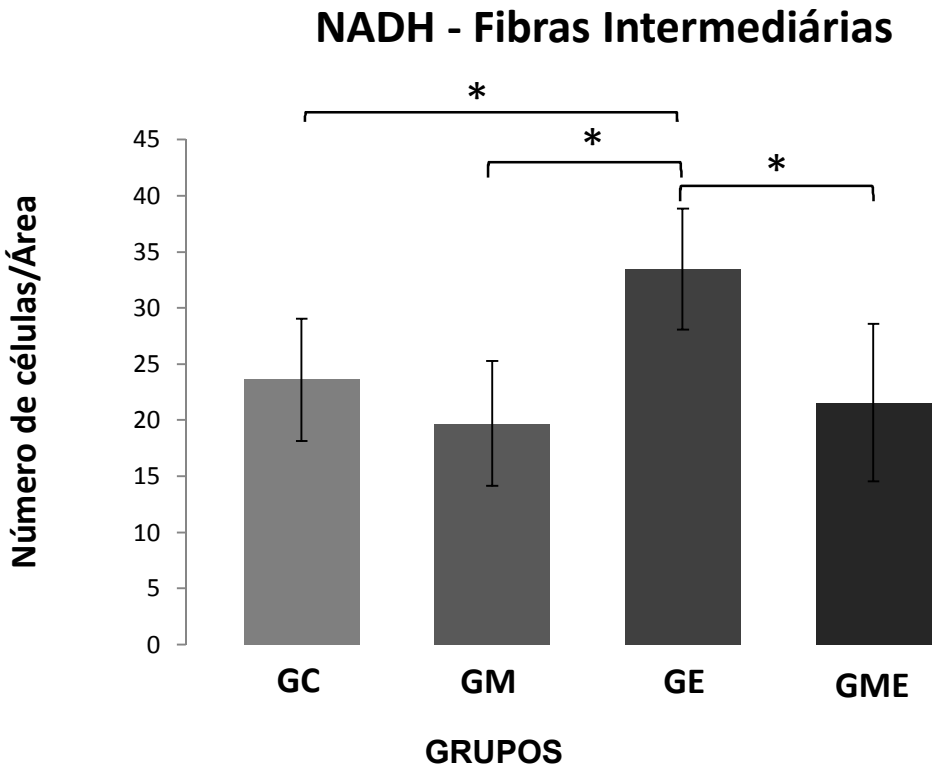


Gráfico 10 - *área relativa de fibras intermediárias nos grupos(Média e Desvio Padrão)*

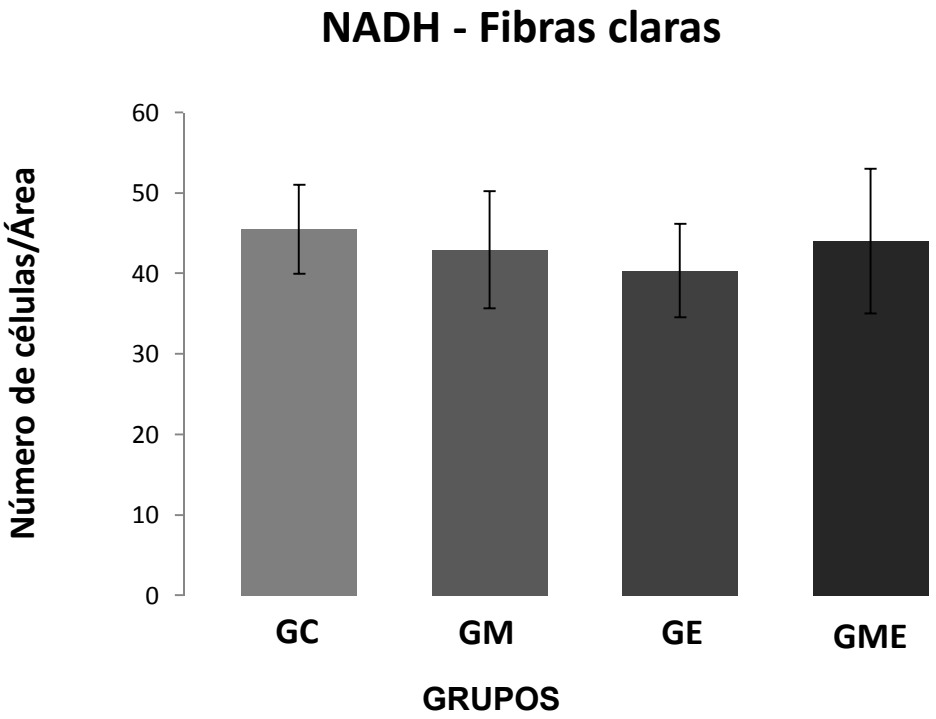


Gráfico 11 - *área relativa de fibras claras nos grupos (Média e Desvio Padrão)*

FIBRAS TOTAIS

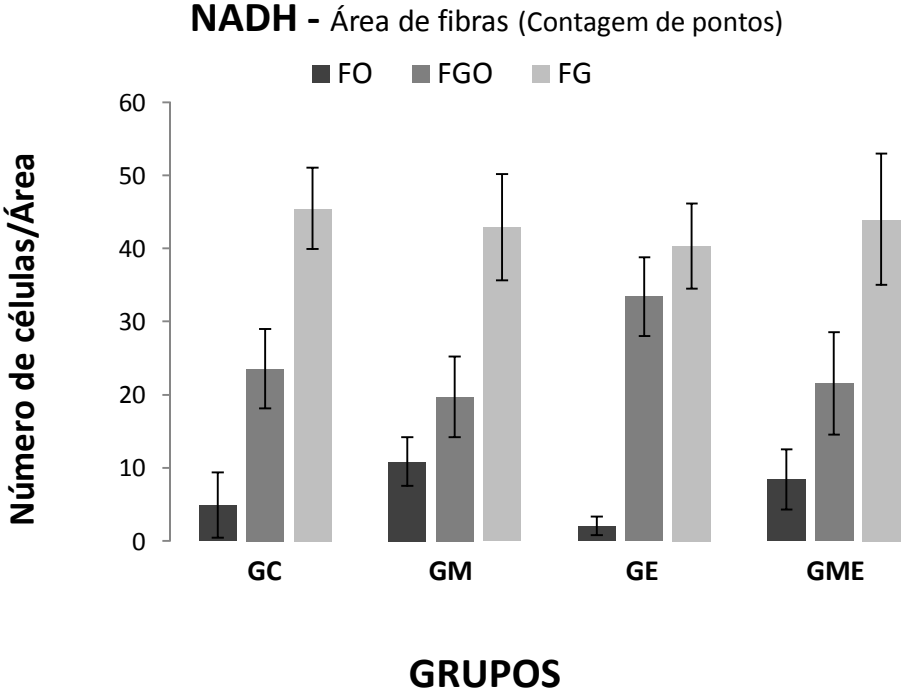


Gráfico 12 - *área relativa de fibras totais nos grupos. Cada coluna representa a média com o erro padrão (Média e Desvio Padrão)*

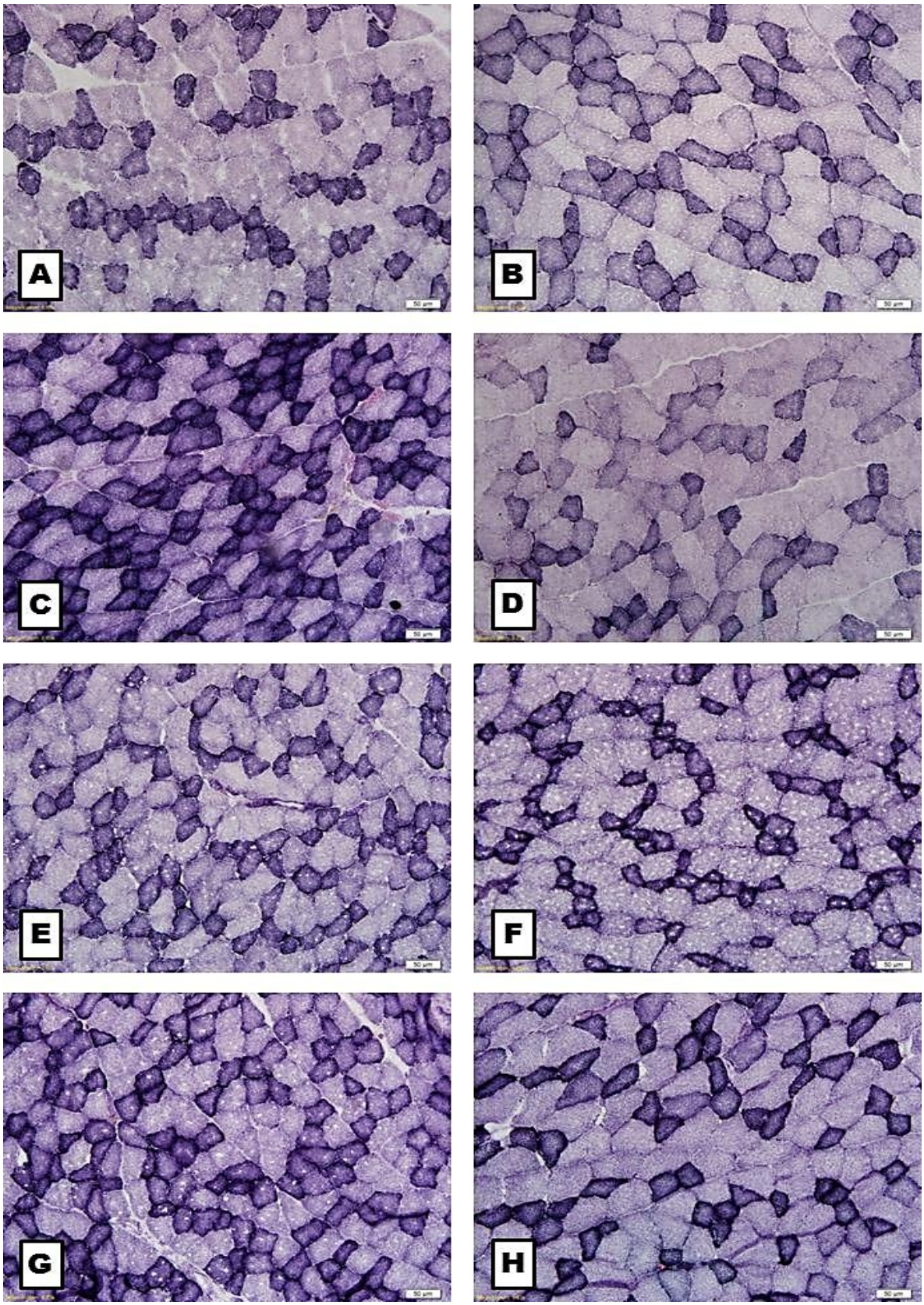


Figura 09 - *representativas de histoquímicas com fibras marcadas pelas técnicas de SDH (GC: A, GM: B, GE: C e GME:D) e NADH(GC: E, GM: F, GE: G e GME:H) em aumento de 40X*

5.7.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

ROS manifestam-se pela luz vermelha fluorescente nos núcleos das fibras musculares, cujas imagens (Figura 10-A-H) foram obtidas com auxílio com um microscópio de fluorescência. A análise quantitativa da intensidade de fluorescência revelaram as espécies reativas de oxigênio nos diferentes grupos, por meio do *software* "*ImageJ".* Os dados de interesse tiveram uma distribuição normal. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni de múltiplas comparações. As concentrações de ROS mostraram tendência ao aumento em animais estressados, mas seu aumento foi significativo ($p<0,05$) apenas quando comparado o grupo GM (82,6±1,53) com o GE (88,8±5,61).

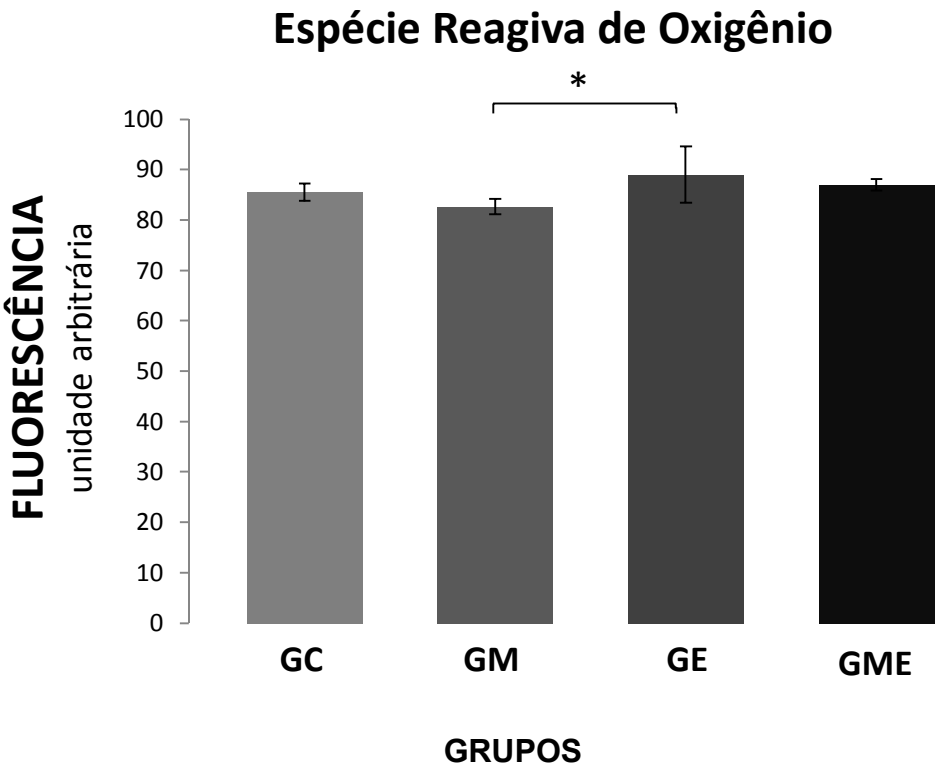


Gráfico 13: *resultados estatísticos de ROS entre os grupos experimentais (Média e Desvio Padrão)*

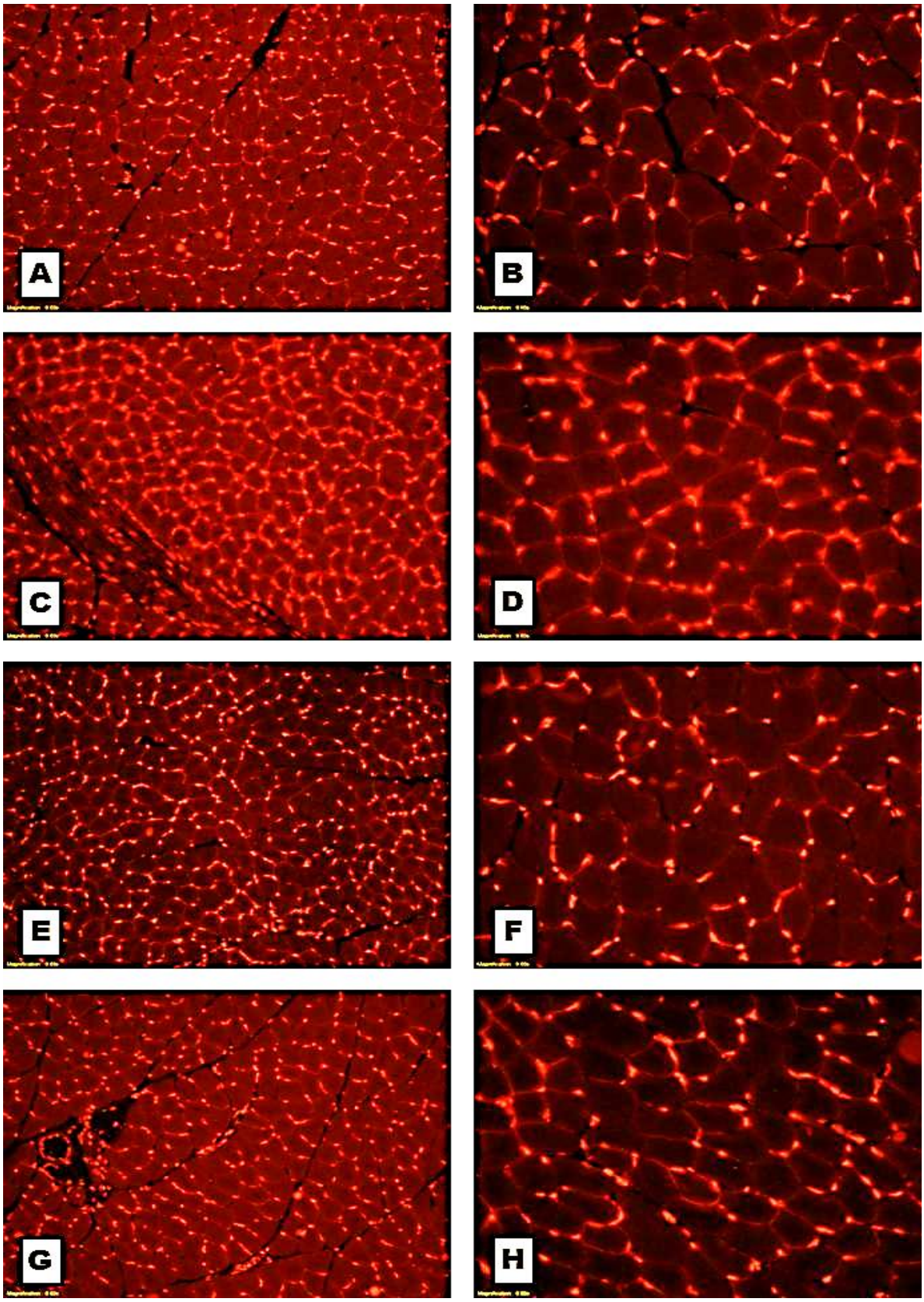


Figura 10 - *imagens representativas de histoquímicas com núcleos para avaliação de ROS, em aumento de 20x (GC: A, GM: C, GE: E e GME:G) e 40x (GC: B, GM: D, GE: F e GME:H) em aumento de 40X*

Discussão

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, o estresse crônico repetido e maloclusão pela exodontia unilateral em ratos, isolados ou associados, foram realizados para avaliar os possíveis efeitos no músculo masseter. A exodontia como modelo de maloclusão em animais para analisar músculos da mastigação já foi estudado em cobaias (BAZAN et al., 2008) e coelhos (IM et al.; 2012); a restrição física em aparato metálico foi escolhida por ativar componentes do sistema simpatoadrenal, resultando em mudanças na nocicepção (FONTELLA et al., 2005) e aumento dos níveis de corticoide no plasma de animais (ULLOA et al., 2010).

Um menor ganho de peso ao longo do tempo experimental foi observado nos animais submetidos ao ECR por contenção. Essa alteração no peso pode ser consequência do aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona geralmente expresso na presença do estresse por contenção (LEE et al., 2012). O cortisol é secretado a partir do córtex suprarrenal sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DERIJK, SCHAAF e DE KLOET, 2002), que pode alterar a região da amigdala (SHEPARD, BARRON e MYERS, 2000) e núcleo da estria terminal diretamente ligados a casos de ansiedade tempo-dependentes (SINK et al., 2013; VENTURA-SILVA et al., 2013). Essas estruturas atuam sobre o hipotálamo e o tronco encefálico na produção de componentes autonômicos, endócrinos e somatomotores das experiências emocionais, que regulam as atividades básicas de beber, comer e pertinentes ao comportamento sexual (RIBAS, 2007), levando a distúrbios comportamentais como a redução na ingestão de alimentos e água e subsequente diminuição no ganho de peso (HENNEBELLE et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados por Matsuura et al., 2012 em ratos submetidos ao estresse por contenção das patas, onde houve a diminuição na ingestão de água, comida e de excreção e um consequente diminuição do peso corporal. O autor também refere à diminuição do peso das glândulas suprarrenais e timo também, causando uma alteração crônica da secreção hormonal.

No entanto, a maloclusão, por si só, não interferiu no ganho de peso dos animais, corroborando com os dados obtidos por Farias-Neto, Martins e Rizzatti-

Barbosa (2012) e Yamazaki et al. (2008), que observaram um aumento normal do peso corporal de animais após exodontia.

O músculo masseter é considerado um dos mais importantes músculos da mastigação com origem no arco zigomático e inserção na face lateral e ângulo do ramo da mandíbula (KEBEDE e MEGERSA, 2011), e pode ser acometido por condições fisiopatológicas ou idiopáticas, com ou sem a presença de dor (RISPOLI et al., 2008; KEBEDE e MEGERSA, 2011). Um desajuste da relação harmônica entre os elementos dentais mandibulares e maxilares pode levar ao colapso das estruturas do sistema estomatognático, desencadeando efeitos locais e sistêmicos, com possibilidade de ocorrer adaptação da musculatura e de estruturas adjacentes para que não haja comprometimento das funções normais (TSAI et al. 2010; TSAI et al., 2012).

Apesar de existir um consenso entre os anatomistas de que esse músculo é dividido em duas partes distintas, não há concordância quanto à importância relativa de cada uma dessas partes (GAUDY et al., 2000), cuja complexidade foi colocada em questão ao longo deste experimento.

A região posterior do feixe superficial do músculo masseter esquerdo revelou atividade gelatinolítica da MMP-2 em todos os grupos deste experimento, sem diferença significante entre eles, porém a atividade da MMP-9 não foi evidencia pela técnica de zymografia, que detecta de forma simples e sensível as MMPs pela degradação do substrato e pelo seu peso molecular (KUPAI et al., 2010). As gelatinases são enzimas chave na remodelação da matriz extracelular (YANG et al., 2002), expressas em músculos esqueléticos e estão envolvidas na regeneração após injurias (ZIMOWSKA, SWIERCZYNSKA e CIEMERYCH 2013). Durante a plasticidade muscular as metaloproteinases aumentam a migração de células miogênicas, pela função hidrolítica contra componentes da ECM, modulam tecidos e são importantes reguladores da imunidade inata e inflamação. (ALAMEDDINE, 2012). Em condições basais, os músculos esqueléticos de ratos adultos podem expressar a MMP-2 constitutiva na forma de 60 kDa, que representa sua forma latente; em contraste, a MMP-9 não é detectada, tanto a proteína quanto para os níveis de mRNA (KHERIF et al., 1999). Diante do exposto, os dados encontrados no

atual estudo sugerem que o feixe superficial do músculo masseter não é afetado pelas condições de alteração oclusal e ECR, isolados ou associados.

No entanto, Chen et al. (2010) afirmaram que o estresse psicológico ao longo de três a cinco semanas modifica significativamente os músculos da mastigação de ratos, correlacionando-o como um fator de risco para o desenvolvimento de dor musculoesqueléticas. Okamoto et al., (2012) também consideram o estresse psicológico como fator de risco para o desenvolvimento de dor musculoesquelética da cabeça e pescoço. O fato do estresse crônico repetido associado ou não à maloclusão não alterar os níveis de gelatinases neste estudo pode estar relacionado à complexidade do m. masseter, indicando que a porção do músculo estudada não foi afetada.

A MPO foi avaliada no atual estudo como marcador enzimático para medir acumulação de neutrófilos nas amostras (HARMSEN e TURNEY, 1985) revelando que não houve infiltrado inflamatório na região posterior do feixe superficial do músculo masseter em nenhum dos grupos estudados. Liu et al. (2013) relata que infiltração excessiva e/ou a retenção prolongada de neutrófilos no local da injúria pode danificar ainda mais o tecido através da libertação de oxidantes e enzimas hidrolítica dos neutrófilos ativados, produzindo lise da membrana das células musculares através do mecanismo dependente de superóxido (TIDBALL, 2005). O experimento Colón et al. (2004) também não foi capaz de promover o aumento de MPO na mucosa do cólon de fêmeas *Wistar* quando induziram o estresse por contenção de seis horas diárias durante dez dias seguidos. Contudo, a associação do ECR com doses subinflamatórias de ácido trinitrobenzeno-sulfónico causou colite e aumento considerável dos níveis inflamatórios (COLÓN et al., 2004).

Para Ali e Sultana (2012), o estresse repetido prejudica o recrutamento de neutrófilos pelo comprometimento da resposta imune inata de ratos. Tymen et al. (2013) por sua vez verificaram que o estresse por contensão não altera o número de neutrófilos na fase inicial de reparo tecidual, porém após três e cinco dias de estresse promove aumento de neutrófilos. Tem sido reportado que quando há um aumento na atividade muscular, a infiltração de polimorfonucleares neutrófilos é mais intensa nas fibras vermelhas, a qual é diretamente proporcional o aumento de trabalho realizado pelo músculo (MOROZOV et al., 2006). Para Tidball (2005), a modificação na função muscular ou lesão podem produzir resposta inflamatória com

invasão inicial de neutrófilos seguido por macrófagos, promovendo dano e posterior reparo através das ações combinadas de radicais livres, fatores de crescimento e quimiocinas. Possivelmente, neste estudo, a maloclusão e o ECR, associados ou não, não produziram inflamação dessa região especifica, pelo fato de não alterar a atividade muscular devido à orientação das fibras.

Análises histológicas de músculo corado em HE mostraram no grupo GE regiões com algumas fibras musculares de grande diâmetro, núcleos centrais, perimísio com fibroblastos e fibras colágenas de aspecto normal. Nishide et al. 2001 verificaram que o aumento na oclusal dental causaram pequenas alterações histológicas no feixe profundo do músculo masseter de ratos, destacando as fibras com núcleo central. Segundo Schmalbruch, Al-Amood e Lewis (1991) e Nonaka (1993) apud Nishide et al. 2001 fibras com núcleo central são fibras imaturas regeneradas, portanto neste estudo há indicações de reparo após degeneração muscular causado pelo ECR.

O músculo dos animais GM e GME revelaram características histológicas semelhante, representadas por algumas fibras com diminuição no diâmetro e fibras com núcleos centrais, acrescentando que os animais do GME mostraram também regiões com fibras de diâmetro aumentado. Estes resultados sugerem que após 23 dias de perda de suporte unilateral, as alterações provocadas são provavelmente indicações de uma atividade reduzida da musculatura. O tempo experimental pode estar diretamente relacionado ao grau de alteração no grupo submetido apenas a maloclusão, visto que em 2004, Issa et al. verificaram alterações funcionais induzidas pela extração dental em cobaias, resultando em uma diminuição significativa no tamanho do músculo masseter no lado ipsilateral, sessenta dias da alteração oclusal.

Maeda et al. (1990) observaram que a extração dental em ratos inibe o crescimento do músculo masseter, sendo mais severo quando associado a uma dieta macia, sugerindo que as informações sensoriais de terminações no ligamento periodontal podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento desse músculo. Mercado et al. (2002) demonstraram em estudo que estresse induzido por contenção tem fundamental papel na regulação da expressão de genes alvos em leucócitos, queratinócitos e fibroblastos em lesões teciduais, podendo prejudicar a qualidade dos tecidos em reparação. Lewis et al. (2013) evidenciaram no músculo

vasto intermédio de ratos que exercícios excêntricos promovem o aumento de células do sistema imunológico responsáveis pelo dano celular da musculatura esquelética. Baron et al. (2011) referem que condições patológicas afetam a transcrição de numerosas vias moleculares e funções biológicas que alteram as características morfológicas dos músculos esqueléticos. Diante do exposto, a alterações morfológicas localizadas em determinadas regiões do músculo, decorrentes dos fatores utilizados neste trabalho permite correlacionar essas áreas com os chamados “pontos-gatilho”.

A MET permitiu a observação do comportamento mitocondrial e do retículo sarcoplasmático do músculo masseter. No grupo GE foram observadas mitocôndrias intermiofibrilares aparentando expansões e outras com aumento de cristas mitocondriais, além de cisternas do retículo sarcoplasmático dilatadas. As mitocôndrias desempenham um papel importante na homeostase do Ca^{2+}, servindo como um dissipador deste íon quando em excesso no citoplasma, modulando assim sinais de Ca^{2+} intracelular. A função do retículo sarcoplasmático é absorver, armazenar e liberar íons cálcio, enquanto as mitocôndrias tem papel fundamental na produção de energia através da geração de ATP. Além disso, (GUNTER et al. 1998 e 2000). As mitocôndrias desempenha um papel importante na regulação dos sinais desses íons durante o ciclo de contração-relaxamento dos músculos esqueléticos de mamíferos (ISAEVA e SHIROKOVA, 2003). Chen et al. 2010 evidenciaram mitocôndrias inchadas com perda de cristas e redução na densidade da matriz, além de uma diminuição Na+-K+ATPase e Ca^{2+}-ATPase nos músculos mastigatórios em situações de estresse prolongado, sugeriram que a alteração morfológica das mitocôndrias indicam uma diminuição na glicólise aeróbica e hipóxia ou isquemia dos músculos e consequente aumento no metabolismo anaeróbico. No entanto, as alterações ultraestruturais deste experimento indicam que o estresse crônico repetido podem estar relacionado com o aumento do metabolismo oxidativo pelas mitocôndrias e, disponibilidade de ións cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Tal fato é fortalecido com os dados de que o volume da área de superfície das mitocôndrias e cristas mitocondriais podem ser indicadores da capacidade oxidativa da célula (ISAEVA e SHIROKOVA, 2003).

As amostras dos animais do grupo GM analisadas diante do MET revelaram algumas cisternas com integridade da membrana e áreas elétron-lúcidas irregulares

no local em que a membrana das cisternas do retículo sarcoplasmático desapareceu, desorganização das cristas mitocondriais e do espaço intermembranosos das mitocôndrias e capilares com lúmen contraído e escassas vesículas pinocíticas. O material de GME analisado revelou alterações ultraestruturais semelhantes ao GM, no entanto, a associação dos fatores promoveu maior dano nas membranas das cisternas do reticulo sarcoplasmático. Este resultado pode ser associado a uma diminuição de geração de energia por danos das mitocôndrias causados pelo excesso de Ca^{2+} liberado pelo RE, com a membrana alterada. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Bani, Bani e Bergamini (1999), que observaram aumento nos níveis de íons cálcio no músculo masseter superficial e profundo, ipslateral ao desgaste oclusal unilateral em ratos, com inchaço mitocondrial e áreas com fibras mostrando sinais de degeneração tecidual após 14 dias da indução da maloclusão. Entretanto, Im et al. (2012) verificaram um aumento nos níveis da cálcio no músculo masseter de coelho seis semanas após a exodontia unilateral, seguido de um decréscimo nessa concentração após doze semanas. A maloclusão isolada ou associada ao ECR induzem alterações ultraestruturais das fibras do músculo masseter, possivelmente relacionadas ao aumento dos níveis de cálcio no tecido.

Houve tendência à diminuição na densidade capilar observado pela imunomarcação com laminina e aumento no calibre dos mesmos demonstrados por CD31 nos animais submetidos ao estresse crônico, associado ou não à exodontia, sendo mais acentuada na associação dos dois fatores, sugerindo potencialização do efeito do estresse a partir da maloclusão gerada no animal. Korthuis (2011) relata que a tonicidade vascular e vasomotora pode ser influenciada por fatores de controle central - como a resposta humoral e neuronal - ou locais intrínsecas dos tecidos - como fatores metabólicos, mecânicos, endoteliais e parácrinos - promovendo a abertura ou fechamento dos canais de membranas, ativação de receptores de membrana e vias de sinalização celular, além de sinais mecânicos. O sistema vascular controla tanto a deterioração quanto a reparação dos diferentes tecidos, como observaram De Medeiros, Vieira e Nishimura (2005). Portanto, este estudo avaliou a densidade de vasos no músculo masseter imunomarcados pela laminina (principal componente da membrana basal de vasos sanguíneos) (SOROKIN et al., 1997; LJUBIMOVA et al., 2006). Uma análise qualitativa também foi realizada pela

imunomarcação de PECAM 1/CD31 dos capilares, pela sua participação em fenômenos de adesão e sinalização necessários para a motilidade de células endoteliais, essencial na indução de fatores de crescimento fibroblástico e na sua subsequente organização em tubos vasculares durante a neoformação vascular (BOGEN et al., 1994; DISTLER et al. 2003; CAO et al., 2002). Segundo Korthuis (2011), a isquemia crônica pela contração muscular dos membros induz resposta inflamatória e pode contribuir na injúria e dor muscular. A menor densidade capilar nos animais de GE e GME sugerem uma hipoperfusão sanguínea e possível fator etiológico de dores musculares em casos de DTM. As alterações vasculares em músculos esqueléticos causadas pelo estresse de diferentes naturezas ainda são escassas na literatura, necessitando mais estudo para contribui na elucidação da relação entre fatores estressores, morfofisiologia dos músculos e etiopatogenia das dores miofaciais.

Houve uma tendência ao aumento na densidade de capilares imunomarcados pela laminina em animais do grupo GM, porém foi evidenciada a diminuição no lúmen dos capilares e vasos por CD31. Estes achados estão de acordo com Gedrange et al. (2001), que demonstraram aumento da densidade capilar em determinadas regiões do músculos masseter de suínos após protrusão mandibular sagital e hipofunção muscular. Brown e Hudlicka (2003) sugerem que o estresse mecânico geram mudanças no comprimento de sarcômero durante a contração ou relaxamento, alterando capilar, cujos fatores estão ligados a angiogênese. Im et al. (2012) suportam a hipótese de que os movimentos anormais dos músculos masseter de coelhos ipsilateral a exodontia podem ocasionar lesão isquêmica devido à diminuição do fluxo sanguíneo. A inatividade física representa um estímulo potente para a atrofia muscular e alterações no lúmen de vasos e artérias (THIJSSEN, GREEN E HOPMAN, 2011). Bani, Bani e Bergamini (1999) reportaram que a injúria do músculo masseter ipsilateral à exodontia foi decorrente da vasoconstricção capilar, isquemia o tecido e contínuo aumento dos níveis de cálcio. Portanto, sugere-se que a maior densidade de capilares por áreas analisadas é devido à diminuição do tamanho das fibras musculares no lado ipslateral a exodontia, como consequência da diminuição da atividade muscular, visto que a análise ultraestrutural e a imunomarcação pela CD31 revelaram capilares com lúmen reduzido, corroborando com os achados de Bani, Bani e Bergamini (1999).

Pela proporção dos três tipos de fibras musculares (9% de escuras, 30% intermediárias e 60% claras) o feixe profundo do músculo masseter (segmento médio posterior) caracteriza-se por apresentar uma baixa capacidade oxidativa devido a predominância de fibras claras. Este resultado está em concordância com os achados de Sano et al. (2007), que verificou a presença de 36% de fibras IIB, 31% IIA e 30% IIX na região póstero anterior e 50% IIX e40% IIA na região póstero medial do músculo masseter de ratos. A analise de todos os tipos de fibras musculares juntos, demonstradas pelas reações de NADH e SDH revelaram que a esta região tem um predomínio de fibras claras, cujas características refletem alta atividade glicolítica e baixa capacidade oxidativa.

As diferentes intensidades de coloração da reação de NADH (clara intermediária e escura) revelam a capacidade oxidativa da fibra muscular. Essa reação revelou que a área relativa de fibras escuras nos grupos GM e GME foi maior quando comparada aos demais grupos. Houve aumento significante da área relativa de fibras intermediárias nos animais do grupo GE em relação aos demais grupos experimentais, revelando alteração na capacidade oxidativa do músculo por ação do estresse. Ide e Sato revelaram em 2006, por meio da atividade de NADH, que o estresse causado por uma mudança de dieta leve à dieta dura afeta o metabolismo oxidativo de forma diferente nos feixes superficial e profundo do músculo masseter de ratos. Bazan et al. (2008) verificaram, após exodontia em cobaia, a predominância de fibras claras marcadas por reação de NADH no músculo pterigoideo medial ipslateral, refletindo em uma diminuição da atividade metabólica do músculo, tornando-o menos resistente a fadiga. Ciena et al., (2011) revelaram uma maior proporção de fibras glicolíticas na região da superfície e fibras oxidativas na região profunda do músculo esternocleidomastoideo de ratos, e que o envelhecimento promove o aumento de fibras oxidativas e da capacidade oxidativa muscular e redução na densidade de fibras musculares (atrofia muscular).

A reação da SDH da mesma região analisada também revelou fibras musculares em três intensidades de coloração (claras, intermediárias e escuras), sendo a mais escura a de maior a atividade metabólica. No grupo GE houve aumento a área de fibras escuras e intermediárias em relação aos demais grupos, cujo aumento ocorreu em razão da redução da área relativa das fibras claras, no entanto, a maloclusão associada ou não ao estresse não promoveu alterações

significativas na área relativa das fibras. Kawata et al. em 2001 verificaram diminuição do diâmetro das fibras do ventre anterior do músculo digástrico de camundongos tratados com dieta macia em relação aos animais que receberam dieta rígida. Observaram ainda um aumento significante das fibras com alta atividade de SDH ao longo do período experimental em animais normais velhos. Miehe et al., (1999) observaram que a exodontia bilateral do dentes associado à dieta macia em ratos diminuiu o peso seco do músculo masseter e aumentou o número de fibras glicolíticas, indicando uma menor força mastigatória e redução da capacidade oxidativa. Embora os fatores – exodontia, estresse ou associação de ambas – não tenha alterado a atividade metabólica do músculo, o estresse foi capaz de aumentar essa atividade da região muscular estudada neste experimento.

Apesar do aumento na capacidade oxidativa e atividade metabólica no grupo submetido apenas ao estresse revelar que o músculo está mais ativo, o aumento representado pelas fibras oxidativo-glicolíticas indicam que o músculo não é resistente à fadiga. O aumento significante da área relativa de fibras oxidativas nos grupos GM e GME não representa um aumento na capacidade oxidativa causada pela exodontia isolada ou associada ao estresse, visto que esse tipo de fibra representa menos que 9% do músculo. No entanto, o aumento significante da área relativa de fibras oxidativo-glicolíticas e a tendência à diminuição da área relativa das fibras oxidativas e glicolíticas revela que o estresse isolado altera a capacidade oxidativa do músculo.

Houve uma tendência à diminuição de ROS nos animais do grupo GM. ROS são geradas em presença de O_2 por mitocôndrias, células fagocitárias, peroxissomos e citocromo P450 em condições fisiológicas (WOJCIK, BURZYNSKA-PEDZIWIATR e WOZNIAK, 2010), participando das cascatas de transdução de sinal da célula, ativando fatores de transcrição responsáveis pela expressão dos genes relevantes para o crescimento e diferenciação celular (MELO et al., 2011); podem também ocasionar dano oxidativo ao DNA celular resultando no desenvolvimento de numerosas doenças (MILAEVA, 2011). Segundo Ghaly e Marsh (2010) níveis elevados de ROS no m. tibial anterior de ratos submetidos à isquemia por clampagem da artéria femoral estão diretamente ligados a processos inflamatórios exacerbados, prejudicando o processo de reparação e cicatrização muscular. Talbert et al. (2013) associaram a atrofia dos mm. sóleo e plantar de ratos ao aumento na

liberação de agentes oxidantes pelas mitocôndrias, em músculos inativos por imobilização. Apesar da tendência à diminuição de ROS causada pela inatividade muscular após 23 dias da exodontia, é possível que um protocolo com períodos mais longos ou análise de regiões diferentes do músculo masseter contribuam com outros resultados para uma melhor compreensão do efeito da maloclusão na etiopatogenia de DTM e dores miofaciais.

Na porção anterior músculo masseter profundo houve uma tendência ao aumento na liberação de ROS nos animais de GE. Ali e Sultana (2012) relataram que o estresse por contenção induz a depleção do mecanismo antioxidante, evidenciado pela diminuição acentuada dos níveis de glutationa, agindo assim como potencializador no aumento da carga oxidativa. Li et al. (2011) verificaram que o estresse induzido por meio de choques elétricos nas patas e estresse psicológico observacional resulta em danos oxidativos e alteração na regulação de proteínas antioxidantes no músculo masseter de ratos. Miyake et al. (2005) observaram que o estresse agudo por contenção e alteração oclusal aumentaram a liberação de ROS no encéfalo de ratos, entretanto o aumento na mordida e os movimentos de apertamento e mastigação desencadearam um efeito supressor nos sinais de espécies reativas de oxigênio no hipotálamo dos animais. Devemos salientar que exercícios exaustivos ocasionam a diminuição de agentes antioxidantes, aumento de reagentes oxidantes livres e aumento da peroxidação lipídica, com consequente deterioração de ácidos graxos poli-insaturados de membrana, como observaram Thirumalai et al. (2011) no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos á longos períodos de nado forçado e Liu et al. (2013)/ Musumeci et al. (2013) no músculo quadríceps de camundongos e ratos, respectivamente, submetidos à corrida. É possível que um tempo maior de exposição em relação ao protocolo deste experimento aumentasse o estresse oxidativo do músculo de maneira significante, visto que um efeito potencializador do estresse crônico repetido foi notado pela tendência ao no aumento da carga oxidativa no músculo analisado crônico repetido analisado.

A associação das duas variáveis não alterou quantidades de superóxido no músculo. Apesar de a literatura revelar que tanto a inatividade quanto a hiperatividade aumentam o nível de ROS no tecido, neste modelo experimental apenas o fator estresse exibiu uma ligeira tendência ao aumento na produção/liberação desses reagentes. Mais estudos com protocolos de períodos

mais longos são necessários para contribuir na compreensão da etiopatogenia de dor miofacial e DTM, visto que o estresse revelou tendência ao aumento de ROS.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

7.1. O estresse crônico repetido foi responsável por um menor ganho de peso nos animais deste experimento, entretanto a maloclusão não interferiu no peso;

7.2. No feixe superficial do músculo masseter, a exodontia e o estresse crônico repetido, isolados ou associados:

- não alteraram os níveis de atividade gelatinolítica das metaloproteinases;
- não promoveram infiltração de polimorfonucleares revelados por meio da MPO;

7.3. No feixe profundo anterior do músculo masseter, a exodontia e o estresse crônico repetido, isolados ou associados:

- alteraram em determinadas regiões as características histológicas das fibras reveladas por hematoxilina-eosina;
- alteraram a ultraestrutura das mitocôndrias e do retículo sarcoplasmático das fibras demonstrado por meio da microscopia eletrônica de transmissão;
- a exodontia isolada induziu uma tendência ao aumento da densidade de capilares marcados com a laminina, enquanto os estresses isolado ou associado à exodontia induziram uma tendência à diminuição;
- o lúmen dos capilares marcados com CD31 mostraram mais contraídos pela exodontia isolada, e mais dilatados nos animais submetidos ao estresse crônico isolado ou associado à exodontia.
- o estresse crônico isolado tendeu ao aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênios no músculo, mas a diferença só foi significante quando o grupo estresse foi comparado com o grupo submetido à exodontia.

7.4. No feixe profundo (porção médio posterior) do músculo masseter as reações de histoquímica revelaram que:

- o estresse crônico isolado aumentou a atividade metabólica do músculo, mas a exodontia isolada ou associada ao estresse não foram capazes de alterar essa atividade;
- O estresse isolado aumentou a área relativa de fibras oxidativa glicolíticas; a exodontia isolada ou associada ao estresse aumentou a área relativa de fibras oxidativas, no entanto, a representatividade dessas fibras é muito pequena em relação aos demais tipos.

Podemos concluir que a exodontia e sua associação ao estresse foram responsáveis por discretas alterações morfofisiológicas no músculo masseter de ratos, contudo o estresse crônico repetido causou modificações histológicas, ultraestruturais, hemodinâmicas, metabólicas e oxidativas significantes e tenderam ao aumento dos níveis de ROS no feixe profundo do músculo masseter, sendo responsável também pela alteração no peso dos animais. As alterações histológicas associadas às modificações ultraestruturais de mitocôndrias e do retículo sarcoplasmático, restritas a determinadas regiões do músculo, contribuem na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento dos chamados pontos-gatilhol. No entanto, mais estudos são necessários na tentativa de compreender os efeitos da exodontia associado ao estresse por meio desta metodologia, na tentativa de contribuir na compreensão dos fatores etiopatogênicos da dor miofacial e DTM.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, S.; WATANABE, H.; HIRAYAMA, A.; SHIBAHARA, T; SEKINE, H; IDE, Y. Histological study of the healing process of the attachment site of rat masseter muscle following injury. ***Bull. Tokyo Dent. Coll.***, v.39, n.3, p.217-220, ago, 1998.

2. AFANAS'EV, I. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. ***Aging Dis.***, v.2, n.3, p.219-230, jun, 2011.

3. ALBERTS, B. Biologia molecular da célula. 4.ed. ***Artmed***, 1584p, 2004. p. .

4. ALAMEDDINE, H.S. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? ***Neurobiol. Dis.***, v.48, n.3, p.508-518, dez, 2012.

5. ALI, F.; SULTANA, S. Repeated short-term stress synergizes the ROS signalling through up regulation of NFkB and iNOS expression induced due to combined exposure of trichloroethylene and UVB rays. ***Mol. Cell Biochem.***, v.360, n.1-2, p.133-145, jan, 2012.

6. 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.891-896, nov, 2008.

7. ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. ***Biochemistry (Moscow***), v.69, n.1, p.4-9, jan, 2004.

8. 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.1735-1744, nov, 1999.

9. 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.

10. BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. ***J. Signal Transduct.***, 2012. DOI: 10.1155/2012/982794

11. BARON, D.; MAGOT, A.; RAMSTEIN, G.; STEENMAN, M.; FAYET, G.; CHEVALIER, C.; JOURDON, P.; HOULGATTE, R.; SAVAGNER, F.; PEREON, Y. Immune response and mitochondrial metabolism are commonly deregulated in DMD and aging skeletal muscle. ***PLoS One.***, v.6, n.11, e.26952, 2011.

12. BAZAN, E.; ISSA, J.P.; WATANABE, I.S.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; DEL BEL, E.A.; IYOMASA, M.M. Ultrastructural and biochemical changes of the medial pterygoid muscle induced by unilateral exodontia. ***Micron***, v.39, n.5, p.536-543, jul, 2008.

13. BENOLIEL, R.; SHARAV, Y. Chronic orofacial pain. ***Curr. Pain Headache Rep.***, v.14, n.1, p.33-40, feb, 2010.

14. BERRY, D.C. Facial pain related to muscle dysfunction. ***Br. J. Oral Surg.***, v.4, n.3, p.222-6, mar, 1967.

15. BOGEN, S.; PAK, J.; GARIFALLOU, M.; DENG, X.; MULLER, W.A. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. ***J. Exp. Med.***, v.179, n.3, p.1059-1064, mar, 1994.

16. BOVE, M.; CARNEVALI, L.; CICERO, A.F.; GRANDI, E.; GADDONI, M.; NOERA, G.; GADDI, A.V. Psychosocial factors and metabolic parameters: is there any association in elderly people? The Massa Lombarda Project. ***Aging Ment. Health***, v.14, n.7, p.801-806, set, 2010.

17. BROWN, M.D.; HUDLICKA, O. odulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. ***Angiogenesis***, v.6, n.1, p.1-14, 2003.

18. BUSH, F.M. Occlusal therapy in the management of chronic orofacial pain. ***Anesth. Prog.***, v.31, n.1, p.10-16, Jan-Fev, 1984.

19. BUSH, F.M.; DOLWICK, M.F. Signs and symptoms. In: The temporomandibular joint and related orofacial disorders. ***J B Lippincott Company , Philadelphia***, p. 35 – 36, 1995.

20. CAO, G.; O'BRIEN, C.D.; ZHOU, Z.; SANDERS, S.M.; GREENBAUM, J.N.; MAKRIGIANNAKIS, A.; DELISSER, H.M. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. ***Am. J. Physiol. Cell Physiol.***, v.282, n.5, p.1181-1190, maio, 2002.

21. CARMO-ARAÚJO, E.M.; DAL-PAI-SILVA, M.; DAL-PAI, V.; CECCHINI, R.; ANJOS FERREIRA, A.L. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. ***Int. J. Exp. Pathol.***, v.88, n.3, p.147-154, jun, 2007.

22. 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.31-35, jan-mar, 2008.

23. CEBASEK, V.; KUBÍNOVÁ, L.; JANÁCEK, J.; RIBARIC, S.; ERZEN, I. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. ***Cell Tissue Res.***, v.330, n.2, p.279-289, nov, 2007.

24. CHEN, Y.J.; HUANG, F.; ZHANG, M.; SHANG, H.Y. Psychological stress alters ultrastructure and energy metabolism of masticatory muscle in rats. ***J. Biomed. Biotechnol.***, 2010. DOI: 10.1155/2010/302693.

25. CHIDLOW, J.H.Jr.; SHUKLA, D.; GRISHAM, M.B.; KEVIL, C.G. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. ***Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.***, v.293, n.1, p.5-18, jul, 2007.

26. CIENA, A.P.; DE ALMEIDA, S.R.; ALVES, P.H.; BOLINA-MATOS, R.DE.S.; DIAS, F.J.; ISSA, J.P.; IYOMASA, M.M.; WATANABE, I.S. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged Wistar rats. ***Micron***, v.42, n.8, p.871-6, dez, 2011.

27. COLÓN, A.L.; MADRIGAL, J.L.; MENCHÉN, L.A.; MORO, M.A.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; LEZA, J.C. Stress increases susceptibility to oxidative/nitrosative mucosal damage in an experimental model of colitis in rats. ***Dig. Dis. Sci.***, v.49, n.10,

28. DE MEDEIROS, J.S.; VIEIRA, G.F.; NISHIMURA, P.Y. Laser application effects on the bite strength of the masseter muscle, as an orofacial pain treatment. ***Photomed. Laser Surg.***, v.23, n.4, p.373-376, ago, 2005.

29. DEBY-DUPONT, G.; DEBY, C.; LAMY, M. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. ***Intens und Notfall***, v.36, n.6, p.500-513, 1999.

30. DERIJK, R.H.; SCHAAF, M.; DE KLOET, E.R. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. ***J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***, v.81, n.2, p.103-122, jun, 2002.

31. DISTLER, J.H.; HIRTH, A.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; GAY, R.E.; GAY, S.; DISTLER, O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. ***Q. J. Nucl. Med.***, v.47, n.3, p.149-61, set, 2003.

32. DOHMS, J.E.; METZ, A. Stress--mechanisms of immunosuppression. ***Vet. Immunol. Immunopathol.***, v.30, n.1, p.89-109, nov, 1991.

33. DWORKIN, S.F. The case for incorporating biobehavioral treatment into TMD management. ***J. Am. Dent. Assoc.***, v.127, n.11, p.1607-1610, nov, 1996.

34. EARDLEY, K.S.; COCKWELL, P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. ***Kidney Int.***, v.68, n.2, p.437-455, ago, 2005.

35. FARIAS-NETO, A.; MARTINS, A.P.; RIZZATTI-BARBOSA, C.M. The effect of loss of occlusal support on mandibular morphology in growing rats. ***Angle Orthod.***, v.82, n.2, p.242-246, mar, 2012.

36. FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. ***Microbes Infect.***, v.5, n.14, p.1317-1327, 2003.

37. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. ***Rev. Assoc. Med. Bras.***, v.43, n.1, 1997.

38. FERREIRA-BACCI A. DO V.; CARDOSO, C.L.; DÍAZ-SERRANO, K.V. Behavioral problems and emotional stress in children with bruxism. ***Braz. Dent. J.***, v.23, n.3, p.246-251, 2012.

39. FERRETTI, C.; BLENGIO, M.; GAMALERO, S.R.; GHI, P. 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, 1995.

40. FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. ***FASEB J.***, v.4, n.2, p.587-597, 1990.

41. FONTELLA, F.U.; BRUNO, A.N.; BALK, R.S.; RÜCKER, B.; CREMA, L.M.; CORRÊA, M.D.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; ALEXANDRE NETTO, C.; DALMAZ, C. Repeated stress effects on nociception and on ectonucleotidase activities in spinal cord synaptosomes of female rats. ***Physiol. Behav.***, v.85, n.2, p.213-219, jun, 2005.

42. FRANKS, A.S.T. Masticatory muscle hyperactivity andtemporomandibular joint dysfunction. ***J. Prosthet. Dent.***, v.15, n.6, p.1122-1131, nov-dez, 1965.

43. FUJIWARA, H.; KIKKAWA, Y.; SANZEN, N.; SEKIGUCHI, K. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins. ***J. Biol. Chem.***, v. 276, n.20, p.17550-8, maio, 2001.

44. GAUDY, J.F.; ZOUAOUI, A.; BRAVETTI, P.; CHARRIER, J.L.; GUETTAF, A. Functional organization of the human masseter muscle. ***Surg. Radiol. Anat.***, v.22, n.3-4, p.181-190, 2000.

45. GEDRANGE, T.; KUHN, U.D.; WALTER, B.; HARZER, W.; BAUER, R. Effects of 28-day mechanical and chewing stress on content of bound and diffusible ions in muscles of mastication. ***Exp. Toxicol. Pathol.***, v.53, n.2-3, p.207-223, jun, 2001

46. GHALY, A.; MARSH, D.R. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. ***Int. J. Exp. Pathol.***, v.91, n.3, p.244-255, jun, 2010.

47. 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.451-458, Apr 2005.

48. GUNTER, T.E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.C.; GUNTER, K.K. The Ca2+ transport mechanisms of mitochondria and Ca2+ uptake from physiological-type Ca2+ transients. ***Biochim. Biophys. Acta.***, v.1366, n.1-2, p.5-15, ago, 1998.

49. GUNTER, T.E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G.; ELISEEV, R.; GUNTER, K.K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. ***Cell Calcium***, v.28, n.5-6, p.285-296, nov-dez, 2000.

50. HAEGENS, A.; VERNOOY, J.H.; HEERINGA, P.; MOSSMAN, B.T.; WOUTERS, E.F. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. ***Eur. Respir. J.***, v.31, n.2, p.252-260, fev, 2008.

51. HAO, L.; NISHIMURA, T.; WO, H.; FERNANDEZ-PATRON, C. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. ***Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***, v.26, n.4, p.819-825, abr, 2006.

52. HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. ***J. Histochem. Cytochem.***, v.41, n.5, p.733-743, maio, 1993.

53. HARMSEN, A.G.; TURNEY, T.H. Inhibition of in vivo neutrophil accumulation by stress. Possible role of neutrophil adherence. ***Inflammation***, v.9, n.1, p.9-20, mar, 1985.

54. HENNEBELLE, M.; BALASSE, L.; LATOUR, A.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; DENIS, S.; LAVIALLE, M.; GISQUET-VERRIER, P.; DENIS, I.; VANCASSEL, S. Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress. ***PLoS One.***, v.7, n.7, e.42142, 2012.

55. HIDAKA, O.; YANAGI, M.; TAKADA, K. Mental stress-induced physiological changes in the human masseter muscle. ***J. Dent. Res.***, v.83, n.3, p.227-231, mar, 2004.

56. HODGES, B.L.; HAYASHI, Y.K.; NONAKA, I.; WANG, W.; ARAHATA, K.; KAUFMAN, S.J. Altered expression of the alpha7beta1 integrin in human and murine muscular dystrophies. ***J. Cell Sci.***, v.110, n.pt22, p.2873-2881, nov, 1997.

57. HUANG, F.; ZHANG, M.; CHEN, Y.J.; LI, Q.; WU, A.Z. Psychological stress induces temporary masticatory muscle mechanical sensitivity in rats. ***J. Biomed. Biotechnol.***, 2011. DOI: 10.1155/2011/720603.

58. IDE, Y.; SATO, I. Effect of changes in food consistency on NADH-ubiquinone oxidoreductase activity and levels of mRNA for ND1, 51kDa, 75kDa and myosin heavy chain isoforms in two different portions of rat masseter muscle. ***Okajimas Folia Anat. Jpn.***, v.83, n.2, p.61-71, ago, 2006.

59. IM, J.H.; KIM, S.G.; OH, J.S.; LIM, S.C.; HA, J.M. Influence of unilateral tooth loss in the temporomandibular joint and masseter muscle of rabbits. ***Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.***, v.114, n.1, p.9-16, jul, 2012.

60. ISAEVA, E.V.; SHIROKOVA, N. Metabolic regulation of Ca2+ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. ***J. Physiol.***, v.547, n.Pt2, p.453-462, mar, 2003.

61. ISSA, J.P.M.; IYOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; WATANABE, I.; MANDARIM DE LACERDA, C.A. Morphological alterations in the masseter muscle induced by unilateral extraction of the upper molars in guinea pigs (Cavia porcellus) ***Int. J. Morphol.***, v.22, n.3, p.225-230, 2004.

62. IYOMASA, M.M.; ISSA, J.P.; SIÉSSERE, S.; REGALO, S.C.; WATANABE; I.S. Effect of unilateral extraction of molar teeth on suprahyoid muscles: macroscopic and ultrastructural aspects. ***Micron***, v.39, n.8, p.1111-1118, dez, 2008.

63. IYOMASA, M.M.; ISSA, J.P.; SOSTHINES, M.C.; OLIVEIRA, A.M.; STUANI, M.B.; MOTOYAMA, A.A.; WATANABE, I.S. Ultrastructural characteristics of the gerbil pterygoid medial muscle after experimental occlusal alteration. ***Micron***, v.40, n.2, p.206-211, fev, 2009.

64. JACKSON, M.J.; PYE, D.; PALOMERO, J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. ***J. Appl. Physiol.***, v.102, n.4, p.1664-1670, abr, 2007.

65. KANEHIRA, H.; AGARIGUCHI, A.; KATO, H.; YOSHIMINE, S.; INOUE, H. Association between stress and temporomandibular disorder. ***Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi***, v.52, p.375-380, 2008.

66. JUBANY-MARÍ, T.; MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. ***Plant Physiol. Biochem.***, v.48, n.5, p.351-358, maio, 2010.

67. KARASEK, R.A.; THEORELL, T.; SCHWARTZ, J.E.; SCHNALL, P.L.; PIEPER, C.F.; MICHELA, J.L. Job characteristics in relation to the prevalence of myocardial infarction in the US Health Examination Survey (HES) and the Health and Nutrition Examination Survey (HANES). ***Am. J. Public Health***, v.78, n.8, p.910-918, ago, 1988.

68. KATZ, J.O.; RUGH, J.D.; HATCH, J.P.; LANGLAIS, R.P.; TEREZHALMY, G.T.; BORCHERDING, S.H. 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.

69. 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.

70. KAWATA, T.; FUJITA, T.; TOKIMASA, C.; SUGIYAMA, H.; OZAWA, S.; TANNE, K. Analysis of histochemically and morphometrically in the anterior belly digastric muscle of osteopetrotic (op/op) mice. **Exp Anim.**, v.50, n.2, p.133-138, abr, 2001.

71. KEBEDE, B.; MEGERSA, S. Idiopathic masseter muscle hypertrophy. ***Ethiop. J. Health Sci.***, v.21, n.3, p.209-212, nov, 2011.

72. KHANFER, R.; PHILLIPS, A.C.; CARROLL, D.; LORD, J.M. Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. ***Psychosom. Med.***, v.72, n.7, p.636-640, set, 2010.

73. KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J.G.; VERDIÈRE-SAHUQUÉ, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. ***Dev. Biol.***, v.205, n.1, p.158-170, jan, 1999.

74. KIGHT, M.; GATCHEL, R.J.; WESLEY, L. Temporomandibular disorders: evidence for significant overlap with psychopathology. ***Health Psychol.***, v.18, n.2, p.177-82, mar,1999.

75. .

76. KIVIMÄKI, M.; NYBERG, S.T.; BATTY, G.D.; FRANSSON, E.I.; HEIKKILÄ, K.; ALFREDSSON, L.; BJORNER, J.B.; BORRITZ, M.; BURR, H.; CASINI, A.; CLAYS, E.; DE BACQUER, D.; DRAGANO, N.; FERRIE, J.E.; GEUSKENS, G.A.; GOLDBERG, M.; HAMER, M.; HOOFTMAN, W.E.; HOUTMAN, I.L.; JOENSUU, M.; JOKELA, M.; KITTEL, F.; KNUTSSON, A.; KOSKENVUO, M.; KOSKINEN, A.; KOUVONEN, A.; KUMARI, M.; MADSEN, I.E.; MARMOT, M.G.; NIELSEN, M.L.; NORDIN, M.; OKSANEN, T.; PENTTI, J.; RUGULIES, R.; SALO, P.; SIEGRIST, J.; SINGH-MANOUX, A.; SUOMINEN, S.B.; VÄÄNÄNEN, A.; VAHTERA, J.; VIRTANEN, M.; WESTERHOLM, P.J.; WESTERLUND, H.; ZINS, M.; STEPTOE, A.; THEORELL, T. IPD-Work Consortium. Job strain as a risk factor for coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data. ***Lancet***, v.380, n.9852, p.1491-1497, out, 2012.

77. KLASSER, G.D.; GREENE, C.S. The changing field of temporomandibular disorders: what dentists need to know. ***J. Can. Dent. Assoc.***, v.75, n.1, p.49-53, fev, 2009.

78. KIRVESKARI, P.; JÄMSÄ, T. Health risk from occlusal interferences in females. ***Eur. J. Orthod.***, v.31, n.5, p.490-495, out, 2009.

79. KITAGAWA, Y.; MITERA, K.; OGASAWARA, T.; NOJYO, Y.; MIYAUCHI, K.; SANO, K. Alterations in enzyme histochemical characteristics of the masseter muscle caused by long-term soft diet in growing rabbits. ***Oral Dis.***, v.10, n.5, p.271-276, set, 2004.

80. KORFAGE, J.; VAN EIJDEN, T. Myosin isoform composition of the human medial and lateral pterygoid muscles. ***J. Dent. Res.***, v.79, n.8, p.1618-1625, ago, 2000.

81. KORTHUIS, R.J. Skeletal Muscle Circulation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Chapter 6, Skeletal Muscle Circulation in Disease States and Aging: Protective Effects of Exercise. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57137/

82. KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. ***J. Pharmacol. Toxicol. Methods***, v.61, n.2, p.205-209, mar-abr, 2010.

83. LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. ***J. Physiol.***, v. 589, n.Pt9, p.2119-2127, maio, 2011.

84. LEE, B.; YUN, H.Y.; SHIM, I.; LEE, H.; HAHM, DH. Bupleurum falcatum prevents depression and anxiety-like behaviors in rats exposed to repeated restraint stress. ***J. Microbiol. Biotechnol.***, v.22, n.3, p.422-430, mar, 2012.

85. LEWIS, E.J.; RAMSOOK, A.H.; LOCKE, M.; AMARA, C.E. Mild eccentric exercise increases Hsp72 content in skeletal muscles from adult and late middle-aged rats. ***Cell Stress Chaperones***, v.18, n.5, p.667-673, set, 2013.

86. LEWIS, M.P.; TIPPETT, H.L.; SINANAN, A.C.; MORGAN, M.J.; HUNT, N.P. Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the

migratory phase of human and murine muscle cell cultures. ***J. Muscle Res. Cell Motil.***, v.21, n.3, p.223-233, abr, 2000.

87. LI, Q.; ZHANG, M.; CHEN, Y.J.; WANG, Y.J.; HUANG, F.; LIU, J. Oxidative damage and HSP70 expression in masseter muscle induced by psychological stress in rats. ***Physiol. Behav.***, v.104, n.3, p.365-372, set, 2011.

88. LIU, C.C.; LIN, C.H.; LIN, C.Y.; LEE, C.C.; LIN, M.T.; WEN, H.C. Transgenic overexpression of heat shock protein 72 in mouse muscle protects against exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage. ***J. Formos. Med. Assoc.***, v.112, n.1, p.24-30, jan, 2013.

89. LJUBIMOVA, J.Y.; FUJITA, M.; KHAZENZON, N.M.; LJUBIMOV, A.V.; BLACK, K.L. Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. ***Front. Biosci.***, v.11, p.81-88, jan, 2006.

90. LUIN, E.; GINIATULLIN, R.; SCIANCALEPORE, M. Effects of H(2)O(2) on electrical membrane properties of skeletal myotubes. ***Free Radic. Biol. Med.***, v.50, n.2, p.337-344, jan, 2011.

91. MAEDA, N.; SUWA, T.; ICHIKAWA, M.; MASUDA, T.; KUMEGAWA, M. 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.

92. MALINDA, K.M.; NOMIZU, M.; CHUNG, M.; DELGADO, M.; KURATOMI, Y.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H.K.; PONCE, M.L. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion; tube formation; and aortic sprouting. ***FASEB J.***, v.13, n.1, p.53-62, jan,1999.

93. MANFREDINI, D.; LANDI, N.; ROMAGNOLI, M.; BOSCO, M. Psychic and occlusal factors in bruxers. ***Aust. Dent. J.,*** v.49; n.2, p.84-89; jun, 2004.

94. MANFREDINI, D.; BUCCI, M.B.; NARDINI, L.G. The diagnostic process for temporomandibular disorders. ***Stomatologija***, v.9; n.2; p. 35-39, 2007.

95. MATRISIAN, L.M. The matrix-degrading metalloproteinases. ***Bioessays***, v.14; n.7; p.455-463, jul, 1992.

96. MATSAKAS, A.; YADAV, V.; LORCA, S.; EVANS, R.M.; NARKAR, V.A. Revascularization of ischemic skeletal muscle by estrogen-related receptor-γ. ***Circ. Res.***, v.110, n. 8, p.1087-1096, abr, 2012.

97. MATSUURA, T.; TAKIMURA, R.; YAMAGUCHI, M.; ICHINOSE, M. Estimation of restraint stress in rats using salivary amylase activity. ***J. Physiol. Sci.***, v.62, n.5, p.421-427, set, 2012.

98. MAXWELL, L.C.; CARLSON, D.S.; MCNAMARA, J.A.JR.; FAULKNER, J.A. Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length; with or without surgical detachment. ***Anat. Rec.***, v.200, n.2; p.127-137, jun, 1981.

99. MAXWELL, L.C.; FAULKNER, J.A.; LIEBERMAN, D.A. Histochemical manifestations of age and endurance training in skeletal muscle fibers. ***Am. J. Physiol.***, v.224; n.2; p.356-361, fev, 1973.

100. MAYEVSKY, A.; BARBIRO-MICHAELY, E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. ***Int. J. Biochem. Cell Biol.***, v.41, n.10, p.1977-1988, out, 2009.

101. MCGINLEY, C.; SHAFAT, A.; DONNELLY, A.E. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? ***Sports Med.***, v.39, n.12, p.1011-1032, 2009.

102. MCNEILL, C. Management of temporomandibular disorders: concepts and controversies. ***J. Prosthet. Dent.***, v.77, n.5, p.510-522, maio,1997.

103. MELO, A.; MONTEIRO, L.; LIMA, R.M.; OLIVEIRA, D.M.; CERQUEIRA, M.D.; EL-BACHÁ, R.S. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. ***Oxid. Med. Cell Longev.***, 2011.
104. DOI: 10.1155/2011/467180

105. MERCADO, A.M.; QUAN, N.; PADGETT, D.A.; SHERIDAN, J.F.; MARUCHA, P.T. Restraint stress alters the expression of interleukin-1 and keratinocyte growth factor at the wound site: an in situ hybridization study. ***J. Neuroimmunol.***, v.129, n.1-2, p.74-83, ago, 2002.

106. METTOUCHI, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. ***Cell Adh. Migr.***, v.6, n.6, p.528-534; nov-dez, 2012.

107. MIEHE, B.; FANGHÄNEL, J.; KUBEIN-MEESENBURG, D.; NÄGERL, H.; SCHWESTKA-POLLY, R. Masticatory musculature under altered occlusal

relationships--a model study with experimental animals. ***Ann. Anat.,*** v.181, n.1, p.37-40, jan, 1999.

108. MILAEVA, E.R. Metal-based antioxidants--potential therapeutic candidates for prevention the oxidative stress-related carcinogenesis: mini-review. ***Curr. Top. Med. Chem.***, v.11, n.21, p.2703-2713, 2011.

109. MIYAKE, S.; SASAGURI, K.; HORI, N.; SHOJI, H.; YOSHINO, F.; MIYAZAKI, H.; ANZAI, K.; IKOTA, N.; OZAWA, T.; TOYODA, M.; SATO, S.; LEE, M.C. Biting reduces acute stress-induced oxidative stress in the rat hypothalamus. ***Redox. Rep.***, v.10, n.1, p.19-24, 2005.

110. MOROZOV, V.I.; TSYPLENKOV, P.V.; GOLBERG, N.D.; KALINSKI, M.I. The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. ***Eur. J. Appl. Physiol.***, v.97, n.6, p.716-722, ago, 2006.

111. MOSS, R.A.; GARRETT, J.; CHIODO, J.F. Temporomandibular joint dysfunction and myofascial pain dysfunction syndromes: parameters; etiology; and treatment. ***Psychol. Bull.***, v.92, n.2, p.331-346, set, 1982.

112. MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; MULLER, A.; MARTI-MESTRES, G.; MORNET, D. 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.1017-1024, dez, 2000.

113. MUSUMECI, G.; MARIA TROVATO, F.; IMBESI, R.; CASTROGIOVANNI, P. Effects of dietary extra-virgin olive oil on oxidative stress resulting from exhaustive exercise in rat skeletal muscle: A morphological study. ***Acta Histochem.***, DOI: 10.1016/j.acthis.2013.05.006.

114. NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. ***Cardiovasc. Res.***, v.69,n.3, p.562-573, fev, 2006.

115. NISHIDA, S.; ENDO, N.; YAMAGIWA, H.; TANIZAWA, T.; TAKAHASHI, H.E. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. ***J. Bone Miner. Metab.***, v.17, n.3, p.171-177,1999.

116. NISHIDE, N.; BABA, S.; HORI, N.; NISHIKAWA, H. Histological study of rat masseter muscle following experimental occlusal alteration. ***J. Oral. Rehabil.***, v.28, n.3, p.294-298, mar, 2001.

117. NONAKA, I. Muscle Pathology for Clinicians 2nd edn Japan Medical Journal, Tokyo. 1993

118. OKAMOTO, K.; TASHIRO, A.; CHANG, Z.; THOMPSON, R.; BEREITER, D.A. Temporomandibular joint-evoked responses by spinomedullary neurons and masseter muscle are enhanced after repeated psychophysical stress. ***Eur. J. Neurosci.***, v.36, n.1, p.2025-2034, jul, 2012.

119. PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. ***Endocr. Rev.***, v.22; n.4; p.502-548, ago, 2001.

120. PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. ***Biochemistry***, v.11, n.14, p.2627-2633, jul, 1972.

121. POWERS, S.K.; DUARTE, J.; KAVAZIS, A.N.; TALBERT, E.E. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. ***Exp. Physiol.***, v.95, n.1, p.1-9, jan, 2010.

122. 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.1243-1276, out, 2008.

123. RAO, S.; GLAROS, A. Electromyographic correlates of experimentally induced stress in diurnal bruxists and normals. ***J. Dent. Res.***, v.58, n.9, p.1872-1878, set, 1979.

124. RIBAS, G.C. Neuroanatomical basis of behavior: history and recent contributions. [Article in Portuguese] ***Rev. Bras. Psiquiatr.***, v.29, n.1, p.63-71, mrc, 2007.

125. RISPOLI, D.Z.; CAMARGO, P.M.; PIRES, J.L.JR.; FONSECA, V.R.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A. Benign masseter muscle hypertrophy. ***Braz. J. Otorhinolaryngol.***, v.74, n.5, p.790-793, set-out, 2008.

126. RIVILIS, I.; MILKIEWICZ, M.; BOYD, P.; GOLDSTEIN, J.; BROWN, M.D.; EGGINTON, S.; HANSEN, F.M.; HUDLICKA, O.; HAAS, T.L. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. ***Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.***, v.283, n. 4, p.H1430-1438, out, 2002.

127. ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. ***Arq. Bras. Cardiol.***, v.91, n.1, p.11-19, jul, 2008.

128. RUTTER, J.; WINGE, D.R.; SCHIFFMAN, J.D. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. ***Mitochondrion***, v.10, n.4, p.393-401, jun, 2010.

129. SANO, R.; TANAKA, E.; KORFAGE, J.A.; LANGENBACH, G.E.; KAWAI, N.; VAN EIJDEN, T.M.; TANNE, K. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. ***J. Anat.***, v.211, n.4, p.464-470, out, 2007.

130. SCHMALBRUCH, H.; AL-AMOOD, W.S.; LEWIS, D.M. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. ***J. Physiol.***, v.441, p.233-241, set, 1991.

131. SCHMIDT, J.; CARLSON, C.R. A controlled comparison of emotional reactivity and physiological response in masticatory muscle pain patients. ***J. Orofac. Pain***, v.23, n.3, p.230-242, 2009.

132. SCHNEIDER, B.S.; TIIDUS, P.M. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? ***Sports Med.***, v.37, n.10, p.837-856, 2007.

133. SCHWEINHARDT, P.; SAURO, K.; BUSHNELL, M. Fibromyalgia: a disorder of the brain? ***Neuroscientist***, v.14, n.5, p.415-421, out, 2008.

134. SHEPARD, J.D.; BARRON, K.W.; MYERS, D.A. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. ***Brain Res.***, v.861, n.2, p.288-295, abr, 2000.

135. SIECK, G.C.; SACKSM, R.D.; BLANCO, C.E.; EDGERTON, V.R. SDH activity and cross-sectional area of muscle fibers in cat diaphragm. **J. Appl. Physiol.**, v.60, n.4, p.1284-1292, abr, 1986.

136. SILVEIRA, R.L.; HIRABARA, S.M.; LAMBERTUCCI, R.H.; FIAMONCINI, J.; LEANDRO, C.V.; PINHEIRO, C.H.J.; D'ANGELO, A.C.A.; BASSIT, R.A.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Metabolic Regulation and Production of Oxygen Reactive Species During Muscule Contraction: Effect of Glycogen on Intracellular Redox State. ***Rev. Bras. Med. Esporte***, v.14, n.1, 2008.

137. SIMON-ASSMANN, P.; OREND, G.; MAMMADOVA-BACH, E.; SPENLÉ, C.; LEFEBVRE, O. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. ***Int. J. Dev. Biol.***, v.55, n.4-5, p.455-465, 2011.

138. SIMONIĆ-KOCIJAN, S.; UHAC, I.; TARIBA, P.; FUGOSIĆ, V.; PAVICIĆ, D.K.; LAJNERT, V.; BRAUT, V. 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.651-655, jun, 2012.

139. SIMONS, D.G.; TRAVELL, J. Myofascial trigger points, a possible explanation. ***Pain***,v.10, n.1, p.106-109, fev, 1983.

140. SINK, K.S.; CHUNG, A.; RESSLER, K.J.; DAVIS, M.; WALKER, D.L. Anxiogenic effects of CGRP within the BNST may be mediated by CRF acting at BNST CRFR1 receptors. ***Behav. Brain Res.***, v.243, p.286-293, abr, 2013.

141. SMEITINK, J.A.; VAN DEN HEUVEL, L.W.; KOOPMAN, W.J.; NIJTMAS, L.G.; UGALDE, C.; WILLEMS, P.H. Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxireductase deficiency. ***Curr. Neurovasc. Res.***, v.1, n.1, p.29-40, jan, 2004.

142. SONNESEN, L.; SVENSSON, P. Temporomandibular disorders and psychological status in adult patients with a deep bite. ***Eur. J. Orthod.***, v.30, n.6, p.621-629, dez, 2008.

143. SOROKIN, L.M.; PAUSCH, F.; FRIESER, M.; KRÖGER, S.; OHAGE, E.; DEUTZMANN, R. Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. ***Dev. Biol.***, v.189, n.2, p.285-300, set, 1997.

144. STÅL, P.; ERIKSSON, P.O.; THORNELL, L.E. Differences in capillary supply between human oro-facial; masticatory and limb muscles. ***J. Muscle Res. Cell Motil.***, v.17, n.2, p.183-197, abr, 1996.

145. TALBERT, E.E.; SMUDER, A.J.; MIN, K.; KWON, O.S.; SZETO, H.H.; POWERS, S.K. Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. ***J. Appl. Physiol. (1985).***, v.115, n.4, p.529-538, ago, 2013.

146. THIJSSEN, D.H.; GREEN, D.J.; HOPMAN, M.T. Blood vessel remodeling and physical inactivity in humans. ***J. Appl. Physiol. (1985).***, v.111, n.6, p.1836-1845, dez, 2011.

147. THIRUMALAI, T.; VIVIYAN THERASA, S.; ELUMALAI, E.K.; DAVID, E. Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. ***Asian Pac. J. Trop. Dis.***, v.1, n.1, p.63-66, mar, 2011.

148. THOMAS, L.J.; TIBER, N.; SHIRESON, S. The effects of anxiety and frustration on muscular tension related to the temporomandibular joint syndrome. ***Oral Surg.***, v.36, n.5, p.763-768, nov,1973.

149. THYBOLL, J.; KORTESMAA, J.; CAO, R.; SOININEN, R.; WANG, L.; IIVANAINEN, A.; SOROKIN, L.; RISLING, M.; CAO, Y.; TRYGGVASON, K. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. ***Mol. Cell Biol.***, v.22, n.4, p.1194-1202, fev, 2002.

150. TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. ***Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.***, v.288, n.2, p.R345-353, fev, 2005.

151. TIPPETT, H.L.; DODGSON, L.K.; HUNT, N.P.; LEWIS, M.P. Indices of extracellular matrix turnover in human masseter muscles as markers of craniofacial form--a preliminary study. ***Eur. J. Orthod.***, v.30, n.2, p.217-225, abr, 2008.

152. TRIEPELS, R.H.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; TRIJBELS, J.M.; SMEITINK, J.A. Respiratory chain complex I deficiency. ***Am. J. Med. Genet.***, v.106, n.1, p.37-45, 2001.

153. TSAI, C.M.; CHOU, S.L.; GALE, E.N.; MCCALL, W.D.JR. Human masticatory muscle activity and jaw position under experimental stress. ***J. Oral Rehabil.***, v.29, n.1, p.44-51, jan, 2002.

154. TSAI, C.Y.; LIN, Y.C.; SU, B.; YANG, L.Y.; CHIU, W.C. Masseter muscle fibre changes following reduction of masticatory function. ***Int. J. Oral Maxillofac. Surg.,*** v.41, n.3, p.394-399, mar, 2012.

155. TSAI, C.Y.; YANG, L.Y.; CHEN, K.T.; CHIU, W.C. The influence of masticatory hypofunction on developing rat craniofacial structure. ***Int. J. Oral Maxillofac. Surg.***, v.39, n.6, p.593-598, jun, 2010.

156. TYMEN, S.D.; ROJAS, I.G.; ZHOU, X.; FANG, Z.J.; ZHAO, Y.; MARUCHA, P.T.
157. Restraint stress alters neutrophil and macrophage phenotypes during wound healing. ***Brain Behav. Immun.***, v.28, p.207-217, fev, 2013.

158. ULLOA, J.L.; CASTAÑEDA, P.; BERRÍOS, C.; DÍAZ-VELIZ, G.; MORA, S.; BRAVO, J.A.; ARANEDA, K.; MENARES, C.; MORALES, P.; FIEDLER, J.L. Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration. ***Pharmacol. Biochem. Behav.***, v.97, n.2, p.213-221, dez, 2010.

159. UHAC, I.; KOVAC, Z.; VALENTIĆ-PERUZOVIĆ, M.; JURETIĆ, M.; MORO, L.J.; GRZIĆ, R. The influence of war stress on the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders. ***J. Oral Rehabil.***, v.30, n.2, p.211-217, fev, 2003.

160. VAN DEN STEEN, P.E.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). ***Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.***, v.37, n.6, p.375-536, 2002.

161. VAN SELMS, M.K.; LOBBEZOO, F.; VISSCHER, C.M.; NAEIJE, M. Myofascial temporomandibular disorder pain, parafunctions and psychological stress. ***J. Oral. Rehabil.***, v.35 n.1, p.45-52, jan, 2008.

162. VEDOLIN, GM; LOBATO, VV; CONTI, PC; LAURIS, JR. The impact of stress and anxiety on the pressure pain threshold of myofascial pain patients. ***J. Oral Rehabil.***, 36(5):313-21. , 2009.

163. VENTURA-SILVA, A.P.; MELO, A.; FERREIRA, A.C.; CARVALHO, M.M.; CAMPOS, F.L.; SOUSA, N.; PÊGO, J.M. Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. ***Front. Behav. Neurosci.***, v.7, n.32, abr, 2013.

164. VIEL, E.C.; BENKIRANE, K.; JAVESHGHANI, D.; TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. ***Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.***, v.295, n.1, p.H281-288, jul, 2008.

165. VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure; function; and biochemistry. ***Circ. Res.***, v.92, n. 8, p.827-839, maio, 2003.

166. ZIMOWSKA, M.; OLSZYNSKI, K.H.; SWIERCZYNSKA, M.; STREMINSKA, W.; CIEMERYCH, M.A. Decrease of MMP-9 activity improves soleus muscle regeneration. ***Tissue Eng. Part A.***, v.18, n.11-12, 1183-1192, jun, 2012.

167. ZIMOWSKA, M.; SWIERCZYNSKA, M.; CIEMERYCH, M.A. Nuclear MMP-9 role in the regulation of rat skeletal myoblasts proliferation. ***Biol. Cell.***, v.105, n.8, p.334-344, ago, 2013.

168. YAGI, T.; SEO, B.B.; NAKAMARU-OGISO, E.; MARELLA, M.; BARBER-SINGH, J.; YAMASHITA, T.; KAO, M.C.; MATSUNO-YAGI, A. Can a single subunit yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) remedy diseases caused by respiratory complex I defects? ***Rejuvenation Res.***, v.9, n.2, p.191-197, 2006.

169. YAMAZAKI, K.; WAKABAYASHI, N.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, T. Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats. ***Hippocampus.***, v.18, n.6, p.542-547, 2008.

170. YANG, E.V.; BANE, C.M.; MACCALLUM, R.C.; KIECOLT-GLASER, J.K.; MALARKEY, W.B.; GLASER, R. Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. ***J. Neuroimmunol.***, v.133, n.1-2, p.144-150, dez, 2002.

171. YAP, A.U.; TAN, K.B.; CHUA, E.K.; TAN, H.H. Depression and somatization in patients with temporomandibular disorders. ***J. Prosthet. Dent.***, v.88, n.5, p.479-484, nov, 2002.

172. YEGHIAZARYAN, M.; ŻYBURA-BRODA, K.; CABAJ, A.; WŁODARCZYK, J.; SŁAWIŃSKA, U.; RYLSKI, M.; WILCZYŃSKI, G.M. Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography. ***Histochem. Cell Biol.***, v.138, n.1, p. 75-87, jul, 2012.

173. YEMM, R. Variations in the electrical activity of the human masseter muscle occurring in association with emotional stress. ***Archs. Oral Biol.***, v.14, n.8, p.873-878, ago, 1969a.

174. _____. Masseter muscle activity in stress: adaptation of response to a repeated stimulus in man. ***Archs. Oral Biol.***, v.14, n.12, p.1437-1439, dez,1969b.

175. WALKER, A.E.; SEIBERT, S.M.; DONATO, A.J.; PIERCE, G.L.; SEALS, D.R. Vascular endothelial function is related to white blood cell count and myeloperoxidase among healthy middle-aged and older adults. ***Hypertension***, v.55, n.2, p.363-369, fev, 2010.

176. WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. ***Cell***, v.91, n.4, p.439-442, nov, 1997.

177. WILLIAMS, J.L.; WEICHERT, A.; ZAKRZEWICZ, A.; DA SILVA-AZEVEDO, L.; PRIES, A.R.; BAUM, O.; EGGINTON, S. Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis. ***Clin. Sci. (Lond)***, v.110, n.5, p.587-595, maio, 2006.

178. WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L.A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. ***Curr. Med. Chem.***, v.17, n.28, p.3262-3288, 2010.

179. WOLFE, F. Fibromyalgia. ***Rheum. Dis. Clin. North Am.***, v.16, n.3, p.681-698, ago, 1990.