

MARCIO VIEIRA LISBOA

**LASERTERAPIA E FARMACOTERAPIA COM
RELAXANTE MUSCULAR EM MASSETER DE RATOS
SUBMETIDOS A DESGASTE OCLUSAL: ANÁLISE
COMPARATIVA ATRAVÉS DE MET E
ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.**



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Área de Concentração:
Laser**

SALVADOR

2008

MARCIO VIEIRA LISBOA

**LASERTERAPIA E FARMACOTERAPIA COM
RELAXANTE MUSCULAR EM MASSETER DE RATOS
SUBMETIDOS A DESGASTE OCLUSAL: ANÁLISE
COMPARATIVA ATRAVÉS DE MET E
ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.**

**Tese apresentada ao Programa
Integrado de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal
da Paraíba e Universidade Federal da
Bahia em cumprimento às exigências
para obtenção do título de Doutor em
Odontologia.**

**Área de concentração:
Laser em Odontologia.**

Orientador: Prof^a. Dr. Jean Nunes dos Santos

Ficha catalográfica

L769 Lisboa, Marcio Vieira
Laserterapia e farmacoterapia com relaxante muscular em masseter de ratos submetidos a desgaste oclusal: análise comparativa através de MET e espectroscopia de Raman / Marcio Vieira Lisboa. – Salvador, 2008.
85 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia / Universidade Federal da Paraíba, 2008.

1. Lasers. 2. Análise Espectral Raman. 3. Oclusão dentária. Músculo Masséter. I. Universidade Federal da Bahia. II. Universidade Federal da Paraíba. III. Santos, Jean Nunes dos. IV. Título.

CDU 616.314-07:621.375.826

FOLHA DE APROVAÇÃO
MARCIO VIEIRA LISBOA

**LASERTERAPIA E FARMACOTERAPIA COM
RELAXANTE MUSCULAR EM MASSETER DE RATOS
SUBMETIDOS A DESGASTE OCLUSAL: ANÁLISE
COMPARATIVA ATRAVÉS DE MET E
ESPECTROSCOPIA DE RAMAM.**

SALVADOR: 18 / 12 / 2008

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. JEAN NUNES DOS SANTOS – UFBA

PROF. DR. MARCIO CAJAZEIRA AGUIAR – UFBA

PROF^a. DR.^a APARECIDA MARIA CORDEIRO MARQUES – UFBA

PROF. DR. ABRAHÃO FONTES BAPTISTA – UFOP

PROF^a. DR.^a LÉLIA BATISTA DE SOUZA – UFRN

DEDICATÓRIA

A Deus por ser o principal veículo de todas as etapas de minha vida.

Aos meus pais pelo companheirismo em todos os momentos. Meu José Augusto Ataíde Lisboa na figura de PAIZÃO, meu maior AMIGO E MESTRE, principalmente na dedicação incansável, no exemplo de homem e profissional.

A Telma Maria Vieira Lisboa pelo carinho e cuidados incessantes e pela paz que ela transmite a todo momento, sendo pra mim A MAIOR FONTE DE PAZ

PARA O ESPIRITO.

A minha irmã, Lívia, pelo carinho e companheirismo sempre transmitidos

com muito calor humano e delicadeza!

A meu irmão Eduardo pelo companheirismo e pela amizade sincera!

A minha vó, Carmelita, pela fiel torcida e pelas rezas fortes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos, muito obrigado pela oportunidade e apoio integral no desenvolvimento deste e de outros trabalhos e principalmente, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro pelos preciosos ensinamentos que dedicou ao aprimoramento da minha formação científica e por todos os conhecimentos que dividiu com tanta generosidade.

A Profa. Dra. Aparecida Cordeiro Marques pelo incentivo, ensinamentos e disponibilidade a toda hora.

A Profa. Dra. Maria Cristina Cangussu pela paciência e generosidade que demonstrou na orientação e correção deste trabalho.

Ao Prof. Prof. Dr. Abrahão Fontes Baptista por acreditar em mim e estar sempre disponível, mesmo que em uma amizade recente.

Aos Profs. das disciplinas do Programa de Pós-Graduação Integrado em Odontologia da Universidade Federal da Bahia e da Universidade Federal da Bahia.

Aos novos - antigos e queridos amigos do curso: Ana Paula, Carol, Cristina, Fernando, Lívia, Marcio, Nicole, Priscila e Sabrina.

Aos funcionários do funcionarios da Faculdade de Odontologia da UFBA pela amizade e disponibilidade em ajudar e realizar todos os procedimentos que solicitava. Especialmente, a Rosinha, pois consolidamos uma amizade forte e sincera, quero agradecer muito a vocês pela ajuda que me deram.

Aos alunos e professores da Faculdade de Odontologia da UFBA.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Gonçalo Muniz, pelas portas abertas e permissão para utilização de suas dependências, em especial aos técnicos ao Prof. Dr. Marco Vanier. A Adriana e ao Claudio pela disponibilidade a toda hora.

Ao Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar pelos ensinamentos e recepção na disciplina de Histologia do ICS-UFBA. A amizade e carinho do amigo Astrão.

A Igor Dourado E Thais Andrade, alunos e amigos, pela fiel companhia e ajuda a todas as horas.

Ao Prof. Dr. Juvenil Ferreira Diniz pela compreensão nas minhas ausências e pela amizade em todas as horas.

A Dra. Cibelle Lopes e Dr. Rick Rocha pela ajuda na aquisição do deslocamento ramam.

A todos os estagiários e alunos do Centro de Laser da UFBA.

A todos meus amigos da UFBA, do COAT e em especial a turma 97.1 que tanto me incentivaram, especialmente a André, Mauro, Tiago e Luciana e o agregado Fabio.

A os alunos de Fisioterapia, Bruno e João pela ajuda sem cobranças.

A todos os meus familiares das famílias Lisboa e Sacramento.

A Bella pelo companheirismo, amizade e ajuda nos últimos meses.

Ao meu amigo de todas as horas, cumpadre, sócio e agora irmão de sangue, Antonio Augusto Cabral, valeu DJOU!

À CAPES pelo BOLSA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – Porcentagem

λ – Comprimento de Onda

< – menor

\pm – mais ou menos

ADP – Adenosine difosfact = Adenosina Difosfato

AMP - Adenosine monofosfact = Adenosina Monoifosfato

AsGaAl – Arseneto de Gálio Alumínio

ATP – Adenosina trifosfato

ATP-CP – Adenosina trifosfato e Creatino fosfato

C – Contínuo

Ca⁺⁺ – Cálcio

CaPi – Fosfato de cálcio

cm – Centímetros

cm² – Centímetros ao quadrado

CPK – Creatina fosfoquinase

CW – Emissão contínua

DE – Densidade de energia

DTM – Disfunção temporomandibular

EMG - Eletromiografia

ER – Espectroscopia raman

EAV – Escala de análise visual

g – Gramas

H⁺ – Hidrogênio

HeNe – Hélio Neônio

Hz – Hertz

IM – Intra-muscular

J/cm² - Joules por centímetros quadrado

Kg – Quilograma

Laser – Light amplification of stimulated energy radiation = Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação.

LBP – Laser de baixa potência

MET – Microscópio eletrônico de transmissão

mg – Miligrama

mg/Kg – Miligrama por quilograma

MIH- Máxima intercuspidação habitual

ml - Mililitro

ml/Kg – Mililitro por quilograma

mW – Miliwatts

nm – Nanômetro

O₂ – Oxigênio

P – Pulsado

Pi – Fosfato inorgânico

PPT – potencial da placa terminal

pH – Potencial hidrogeniônico

RC- Relação Cêntrica

RS – Retículo sarcoplasmático

SNC – Sistema nervoso central

TENS - Transcutaneous electrical nerve stimulation = Neuroestimulação elétrica transcutânea

β – Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 6.1: A – Grupo Controle 30 dias: feixes dispostos longitudinalmente com aspecto de normalidade (H&E, 40 x). B – Grupo Desgaste Oclusal 30 dias: feixes dispostos longitudinalmente com aspecto de normalidade (H&E, 40 x, UFPB-UFBA, 2008).....pág.49

Figura 6.2: A – Grupo Controle 14 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às tríades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000X). B - Grupo Controle 30 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às tríades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000x - UFPB-UFBA, 2008) pág.53

Figura 6.3: Figura 6.3 –. A - Grupo Desgaste Oclusal 14 dias - mitocôndrias com perda de cristas e matriz clara (seta amarela); hiper-contração da banda I, miofibrilas desorganizadas (setas vermelhas) e presença de vacúolos (20.000X). B – Grupo Desgaste Oclusal 30 dias - miofibrilas desorganizadas (setas vermelhas) e presença de vacúolos (30 dias, 12.000 x - UFPB-UFBA, 2008) pág.54

Figura 6.4: A - Grupo Laser 14 dias (12.000 X). B - Grupo Laser 30 dias (4.400 X), ambos com aspecto de normalidade, apenas discreta presença de mitocôndrias com matriz clara (seta amarela) e poucos vacúolos (UFPB-UFBA, 2008) pág.55

Figura 6.5: A - Grupo Relaxante Muscular 14 dias - aspecto de normalidade, apenas com discreta presença de mitocôndrias com matriz clara (seta amarela) e vacúolos (14 dias, 4.4000 X). B - Grupo Relaxante Muscular 30 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às tríades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000 X - UFPB-UFBA, 2008)..... pág.56

Figura 6.6: Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os quatro grupos avaliados (UFPB-UFBA, 2008)..... pág.59

Figura 6.7: Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os grupos avaliados no período experimental de 14 dias (UFPB-UFBA, 2008)..... pág.60

Figura 6.8: Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os quatro grupos avaliados no período experimental de 30 dias (UFPB-UFBA, 2008)..... pág.61

Figura 6.9: Médias gerais do sinal Raman para o fosfato de cálcio nos diferentes períodos de observação (UFPB-UFBA, 2008)..... pág.63

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 5.1: Distribuição dos grupos experimentais (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.39
Quadro 5.2: Escores para lesão muscular por microscopia eletrônica de transmissão (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.45
Tabela 6.1: Escores atribuídos para cada campo observado (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.50
Tabela 6.2: Porcentagens equivalentes a ocorrência de cada escore de injúria muscular (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.51
Tabela 6.3: Médias, desvios padrões, medianas e quartis dos dados semi-quantitativos quanto ao grau de injúria muscular (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.57
Tabela 6.4 - Médias e desvios-padrões da intensidade Raman do fosfato de cálcio intramuscular nos grupos avaliados (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.59
Tabela 6.5 – Médias e os desvios-padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio nos grupos desgaste 30 dias e laser 30 dias (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.61
Tabela 6.6 – Médias e os desvios padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio nos grupos controle 30 dias e laser 30 dias (UFPB-UFBA, 2008).....	pág.62
Tabela 6.7 –Médias e os desvios padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio no grupo laser (UFPB-UFBA, 2008)	pág.63

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	10
1.1 ABSTRACT.....	11
2 INTRODUÇÃO.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4 OBJETIVO.....	37
5 METODOLOGIA.....	38
6 RESULTADOS.....	48
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÃO.....	76
9 REFERÊNCIAS	77
ANEXOS.....	85
ANEXO I – Aprovação comitê de ética.....	85

1 RESUMO

A ação da oclusão sobre as Disfunções Temporomandibulares (DTM) ainda é indefinida, principalmente em relação à função muscular. Por isso, terapêuticas não invasivas e reversíveis, como o laser, são terapias válidas e aceitas na literatura. O objetivo desse estudo é avaliar possíveis alterações no músculo masseter de ratos submetidos à laserterapia após alteração oclusal. Foram utilizados 40 ratos Wistar, divididos aleatoriamente em quatro grupos, sendo 10 para o grupo controle, 10 para o grupo Desgaste Oclusal (DE), 10 para o grupo DE + Laserterapia ($\lambda 830\text{nm}$) com dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e 10 para o grupo DE + Relaxante Muscular (Dantrolene 2,5 mg/Kg). As cúspides superiores e inferiores dos molares esquerdos dos ratos foram desgastadas com broca diamantada sob refrigeração de solução salina. Os ratos do grupo controle não tiveram desgaste oclusal. Metade dos ratos de cada grupo foi sacrificada aos 14 dias e a outra metade 30 dias após o desgaste oclusal. Após o período experimental, o músculo masseter foi removido do lado ipsilateral ao desgaste oclusal em cada animal e, então, processado para microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e mensuração da intensidade Raman para o fosfato de cálcio precipitado nas fibras musculares. Não houve diferença entre os grupos na análise por microscopia de luz, apenas a microscopia de transmissão foi capaz de detectar injúria intracelular nas fibras do grupo DE: mitocôndrias edemaciadas, com perda de cristas e matriz clara; hipercontração da banda I; miofibrilas desorganizadas e presença de numerosos vacúolos. Nos grupos tratados com laser e farmacoterapia, a ultra-morfologia apresentou-se semelhante a do grupo controle. Quanto ao fosfato de cálcio, houve diminuição da intensidade Raman no grupo laser 30 dias. De acordo com os resultados, houve alterações nas fibras musculares do masseter ipsilateral ao desgaste oclusal unilateral em ratos Wistar, no entanto, a laserterapia e a farmacoterapia contribuíram moderadamente como forma de tratamento para o masseter nas condições estudadas.

Palavras chaves: *laser, Análise Espectral Raman, Oclusão Dentária, Músculo Masséter.*

1.1 ABSTRACT

The role of occlusion on Temporomandibular Disorders (TMD) is still unclear, mainly regarding muscular function, therefore non invasive and reversible treatment, as lasertherapy, may be a valuable instrument in this function. The aim of this study was to evaluate the lasertherapy action on masseter muscle submitted to occlusal alteration. Forty Wistar rats were randomly divided in four groups: 10 for control group, 10 for occlusal alteration group (CCO), 10 for CCO + lasertherapy group ($\lambda 830\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$) and 10 for CCO + muscle relaxant group (2,5 mg/Kg Dantrolene). Rats underwent unilateral amputation of the left inferior and superior molar cusps to simulate an occlusal wear situation. The rats of control group had no occlusal wear. Half of the animals of each group was sacrificed in 14 days after the occlusal consuming and half 30 days after the occlusal consuming. The masseter muscles ipsilateral to the amputated molars were excised and processed for light microscopy, electron microscopy, and evaluation of calcium phosphate precipitate by Raman spectroscopy. The light microscopy did not show differences between the groups. The electron microscopy was able to detect a degree of intracellular damage in muscle fibers of CCO group: swollen mitochondria with disrupted cristae and cleared matrix, signs of hypercontraction of I bands and myofibril disorganization. A decrease in Raman intensity for calcium phosphate precipitate was detected in 30 days laser group. Based on the results, there were alterations in muscular fibers of ipsilateral masseter with occlusal unilateral wear in Wistar rats, although the lasertherapy and pharmacotherapy played few action on treatment of masseter muscle in the studied conditions.

Keywords: *laser, Raman Spectrum Analysis, Dental Occlusion, Masseter Muscle.*

2 INTRODUÇÃO

A DTM é considerada uma disfunção músculo - esquelética de etiologia multifatorial que comumente provoca dor na face, crânio e pescoço (DAWSON, 2008). Dentre os agentes etiológicos, a oclusão tem ocupado lugar de destaque, no entanto, ainda existe muito conflito a respeito das alterações oclusais que podem estar significativamente envolvidas como etiologia dessa desordem (MUNDT *et al.*, 2008).

Muitos autores (ASH; RAMFJORD, 1996; BANI; BERGAMINI, 2001; BANI; BERGAMINI, 2002, BAZAN *et al.*, 2008; ; BELL, 1991; IYONOMASA *et al.*, 2008a; IYONOMASA *et al.*, 2008b; OLIVEIRA, 2002; PULLINGER *et al.*, 1988, SANTIWONG *et al.*, 2002), acreditam que a má-oclusão pode contribuir para o mau funcionamento dos músculos da mastigação, gerando sobrecarga e fadiga muscular, bem como para o aparecimento da DTM, a qual pode produzir dores musculares generalizadas e localizadas. Essas dores estão associadas ao desequilíbrio na concentração de cálcio nos músculos mastigatórios e conseqüentemente à hiper-contração muscular com subseqüente vasoconstrição e isquemia tecidual (BANI *et al.*, 1999; SIMONS; TRAVELL, 1981).

No entanto, alguns estudos epidemiológicos (GESH *et al.*, 2005, MAGUNSSON *et al.*, 2005), vêm demonstrando que não há uma relação estatisticamente significativa entre a má oclusão e o surgimento da DTM nos indivíduos, bem como não existe um consenso entre os estudos com eletromiografia, pois estas pesquisas não encontraram concordância quanto

ao papel da oclusão na atividade muscular (ISSA *et al.*, 2006; OKANO *et al.*, 2007; RODRIGUES; FERREIRA, 2003; SUVINEN; KEMPPAINEN, 2007).

Diante desses aspectos e das dificuldades de diagnóstico da DTM e tendo em vista, a grande quantidade de informações inconclusivas a respeito do papel da oclusão sobre as dores musculares, adota-se terapias conservadoras, reversíveis e não invasivas como a fisioterapia (HOU *et al.*, 2002), placa de estabilização oclusal (OLIVEIRA, 2002), a farmacoterapia (BANI; BERGAMINI, 2001) e o laser de baixa potência (VENÂNCIO *et al.*, 2005).

No que se refere ao tratamento farmacológico das disfunções temporomandibulares, os relaxantes musculares são indicados para condições agudas e para dores crônicas. No entanto, devido à possibilidade de tolerância e dependência do uso desses medicamentos, o seu uso deve ser considerado cuidadosamente (HERSH *et al.*, 2008).

Por outro lado, dentre as diversas patologias orofaciais tratadas efetivamente pela laserterapia, as disfunções temporomandibulares têm sido alvo de destaque por promover a redução do uso de medicamentos e ser bem aceita pelos pacientes (FRARE; NICOLAU, 2008).

Nesse contexto, métodos e modelos científicos que ajudem a esclarecer a participação da oclusão na etiologia da DTM são importantes, assim como, comparar a ação dos protocolos de tratamento para as disfunções temporomandibulares (GESH *et al.*, 2004). Estudos clínicos e morfológicos dos tecidos envolvidos na DTM juntamente com resultados de estudos moleculares, biofísicos e bioquímicos são meios científicos que podem contribuir para

elucidar a relação de causa e efeito entre a oclusão e o metabolismo dos músculos envolvidos no sistema mastigatório, (JONH, 2006, SEWRY, 2002).

Considerando-se a falta de estudos conclusivos a respeito do papel da oclusão no desenvolvimento de disfunções musculares do sistema estomatognático, o presente estudo visa avaliar a ação do laser de baixa potência nas disfunções musculares após alteração oclusal e comparar com a farmacoterapia através de estudos morfológicos e de alterações moleculares no músculo masseter de ratos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TECIDO MUSCULAR E FISIOLOGIA MUSCULAR

As fibras musculares são os elementos contráteis do músculo esquelético. Cada fibra se constitui numa célula multinucleada (HERZOG *et al.*, 2008). Uma extensa rede de canais tubulares anastomosados e interconectados, ou retículo sarcoplasmático (RS), fica paralela às miofibrilas e aos túbulos T. A extremidade lateral de cada túbulo termina em uma vesícula que armazena cálcio, os quais ligam a troponina ao filamento de actina (dois íons cálcio ligam-se a locais reguladores específicos da troponina C), sendo responsáveis pelo início do processo de contração muscular (GUYTON, 2006).

Durante esse processo, íons cálcio são liberados pelo RS e se difundem por uma pequena distância, presumivelmente para “ativar” os filamentos de actina. A contração muscular é iniciada quando as pontes cruzadas dos filamentos de miosina são atraídas para os locais ativos sobre os filamentos de actina. Esta ligação do cálcio à troponina provoca uma alteração conformacional no complexo troponina-tropomiosina-actina, removendo a inibição mecânica que impedia a interação entre a actina e a cabeça da miosina (ALLEN *et al.*, 2008a).

Durante o encurtamento, a miosina está fortemente ligada à actina. Esta ligação tem de ser quebrada de forma a permitir que a miosina possa voltar a ligar a um novo monômero de actina para iniciar um novo ciclo. Essa ligação entre a actina e a miosina é quebrada quando um ATP se liga de novo à miosina. Após essa separação, o ATP que se ligou à miosina é hidrolisado e

a energia livre resultante dessa hidrólise é transferida para a miosina, voltando a ativar a miosina, passo fundamental para que se reinicie o ciclo de contração (ROSSI; TIRAPEGUI, 1999).

Esse ciclo continuará a processar-se enquanto o cálcio se mantiver ligado à troponina C, dessa forma os locais ativos da actina permanecem expostos permitindo a interação entre actina e miosina. O relaxamento da fibra só ocorrerá quando cessarem os impulsos do motoneurônio e, conseqüentemente, a liberação de acetilcolina na placa motora. Então o íon cálcio libertar-se-á da troponina e será transportado ativamente pelo gradiente iônico, através da membrana, de volta ao RS. (MCARDLE *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2003).

Tem sido sugerido que áreas de injúrias musculares são locais onde a concentração de íons cálcio encontra-se desequilibrada. A concentração elevada de cálcio pode ser responsável pela hiper-contração das fibras musculares, gerando vasoconstrição local e isquemia. A persistência da hiper-contração pode levar a uma fadiga muscular, gerando desarranjo metabólico e contratura prolongada (TRAVELL; SIMONS, 1983). No entanto, uma menor concentração de cálcio também pode ser responsável por fadiga e perda de potência das fibras musculares (BOHR, 1996; HONG; SIMONS, 1998).

3.2 FADIGA MUSCULAR

A fadiga muscular tem sido definida como o fracasso para manter uma exigida ou esperada produção de trabalho (HAUTIER *et al.*, 1998). Lepers *et al.* (2002) descrevem fadiga neuromuscular como qualquer exercício induzido que reduz a força voluntária máxima.

Existem dois tipos de fadiga: a aguda periférica e a central, as quais geralmente estão muito ligadas entre si, sendo que uma influencia a outra (WEINECK, 2000). Para descrever as causas e os locais de fadiga, normalmente enfocam-se: os sistemas energéticos (ATP-CP, glicólise e oxidação), o acúmulo de subprodutos do metabolismo, o sistema nervoso e a falha do mecanismo contrátil das fibras musculares. Nenhum desses fatores consegue explicar isoladamente todos os aspectos da fadiga (POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

A fadiga periférica seria aquela relacionada ao cansaço ou à incapacidade muscular para realização da tarefa e a fadiga central aquela relacionada ao sistema nervoso central (SNC). Em nível bioquímico, podemos considerar a fadiga periférica como aquela cuja perda de força e potência são independentes da ação neuronal e a fadiga central como uma redução progressiva do direcionamento voluntário dos neurônios motores durante o exercício. Na periférica, ocorrem alterações nos músculos em atividade diversas, tais como: depleção de fosfocreatina; acúmulo de prótons e fosfato. Já na central, os mecanismos relacionados à fadiga seriam a hipoglicemia e alteração plasmática na concentração aminoacídica, principalmente em relação à razão Triptofano e aminoácidos de cadeia ramificada (ROSSI *et al.*, 2004).

A falha periférica pode ser decorrente também de fatores relacionados à disponibilidade de cálcio, ao acúmulo de subprodutos metabólicos que alteram o pH fisiológico e ao aumento da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) na fibra muscular (RASSIER; MACINTOSH, 2000).

A energia para o processo de contração e relaxamento vem do gasto de ATP. Os produtos da hidrólise do ATP (ADP, AMP e Pi), hipoteticamente são inibidores dos processos de contração muscular e podem registrar um aumento considerável durante a fadiga (WILMORE e COSTILL, 2001). Verifica-se uma diminuição da tensão máxima isométrica das fibras musculares isoladas como consequência do aumento das concentrações de Pi. Os resultados de estudos *in vivo* suportam a hipótese de que durante a fadiga, o Pi pode ser um importante moderador endógeno da liberação de cálcio pelos canais do RS no músculo esquelético (ALLEN; WESTERBLAD, 2001, ALLEN et al., 2008a).

O retículo sarcoplasmático atua como um local de armazenamento de cálcio e controle da concentração citoplasmática desse íon. Por sua vez, a concentração de cálcio regula a força das contrações musculares. Existem evidências sugerindo que a fadiga pode ser devido à retenção de cálcio no interior do retículo sarcoplasmático, o que reduziria a quantidade de cálcio disponível para a contração muscular. A diminuição de cálcio pode ser responsável pela redução da força durante a fadiga. Contudo, essas teorias permanecem especulativas. (LEES *et al.*, 2001; LEPPIK et al., 2004).

Em estudos realizados com modelos animais verificou-se que o desenvolvimento da fadiga está associado a alterações funcionais do retículo sarcoplasmático e nas propriedades do aparato contrátil (ALLEN *et al.*, 2008b).

Allen e Westerblad (2001) referem-se à influência da acidose e do Pi na inibição da atividade das bombas de cálcio do RS e das ATPases miofibrilares, às suas conseqüências no aumento do tempo de relaxamento muscular (captação do cálcio pelo RS) e na taxa de dissociação das pontes transversas, respectivamente.

Um aumento na concentração de Pi em associação com uma diminuição do pH reduz a força contrátil e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, o que possivelmente ocorre devido a uma precipitação de fosfato de cálcio (FRYER et al., 1995; WESTERBLAD; ALLEN, 1996).

O fosfato inorgânico (Pi), que aumenta substancialmente durante a fadiga, pode entrar no retículo sarcoplasmático e combinar-se com o cálcio formando um precipitado insolúvel de fosfato de cálcio (CaPi). Esse precipitado reduz a disponibilidade e a liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático e conseqüentemente diminui o desempenho do músculo (ALLEN 2008a; ALLEN; WESTERBLAD, 2001; FRYER *et al.*, 1995).

A fadiga periférica pode ser dividida em três fases: na fase 1, o cálcio durante o tétano está aumentado e permanece na fase 2, onde tem-se a redução da força muscular, porém rapidamente diminui sua concentração no citoplasma na fase 3 e cessa a contração e, conseqüentemente, a força muscular. A redução da força nas fases 1 e 2 envolve os elementos contráteis. No entanto, durante a fase 3 há uma redução da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, o número de pontes cruzadas diminui.

Pesquisas com cafeína, substância que promove liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e causa contratura muscular, corroboram com essa hipótese. A aplicação de cafeína durante a fase 1 e 2 tem pouca

influência no potencial de força do músculo, todavia, na fase 3 a cafeína promove aumento considerável no potencial muscular (ALLEN et al., 1995). Assim sendo, a redução de força muscular nas fases 1 e 2 são causadas pela reduzida capacidade de contração das miofibrilas e a perda adicional de força na fase 3 está relacionada a contração prejudicada pela falta de cálcio (MOREIRA *et al.*, 2008).

Fatores extra-musculares também podem levar à impossibilidade de desempenho. A fadiga pode ocorrer também na junção neuromuscular. Isso pode ser causado por diversos fatores, como: falha na liberação ou síntese de acetilcolina, hipoatividade ou hiperatividade da colinesterase, desenvolvimento de um limiar mais elevado da membrana da fibra muscular e competição de outras substâncias com a acetilcolina (DUARTE et al., 2008). Outro fator que pode levar à fadiga é a interrupção do fluxo sangüíneo pela queda dos níveis de nutrientes e oxigênio que chegam ao músculo envolvido. A função muscular está na dependência de um suprimento sangüíneo adequado que libera um substrato para os músculos e deles remove os metabólitos (DUARTE et al., 2008; SANTOS et al., 2003).

Durante uma contração isométrica, tal como ocorre durante o apertamento dentário, ocorrem efeitos teciduais específicos que incluem a tensão muscular, obstrução do fluxo sanguíneo, saturação do oxigênio, saturação do glicogênio e a remoção deficiente de produtos catabólitos. A presença de radicais livres é constante após exercício induzido em fibras musculares sob fadiga. Trabalho excessivo e contrações excêntricas causam danos e edema às fibras do músculo, que podem durar por até 80 dias. Entretanto, a dor não aparece concomitantemente ao dano, mas está presente

cerca de três a quatro dias após o trauma (GREMILLION, 2006, SAXTON et al., 1994).

3.3 PAPEL DA OCLUSÃO NA DTM

Existem diversas teorias que procuram explicar a etiologia e descrever a patogênese na articulação temporomandibular e sistema muscular. O papel deletério das interferências oclusais sobre o sistema mastigatório e a articulação temporomandibular têm sido objetivo de numerosos estudos em animais e humanos (ASH; RAMJFORD, 1996; MENDONÇA NETO, 2003).

Por definição, as DTM abrangem um determinado número de distúrbios clinicamente distintos que incluem alterações na musculatura mastigatória e nas articulações temporomandibulares ou em ambos, afetando o sistema estomatognático como um todo. Com o intuito de esclarecer e facilitar o entendimento e o diagnóstico em DTM, Bell , em 1991, propôs uma classificação diagnóstica bem definida: 1) disfunções articulares 2) não articulares (dos músculos).

Segundo Pullinger *et al.* (1993), as condições oclusais de relevância na etiologia das DTM são: presença de mordida aberta anterior esquelética, discrepância entre RC e MIH de mais de 2 mm, *overjet* maior do que 4mm (pacientes classe II) e cinco ou mais dentes posteriores perdidos.

Em 1999, Bani *et al.* realizaram estudos histológicos em masseteres de ratos *Wistar*, submetidos a desgaste oclusal unilateral nos dentes posteriores, a fim de simular uma situação clínica de má-oclusão. Os resultados mostraram

que os distúrbios oclusais levaram a constrição de capilares, danos morfológicos nas fibras musculares e ao endotélio de vasos sanguíneos, além da concentração elevada de cálcio nos músculos do lado afetado. As mudanças nos músculos mastigatórios foram relacionadas à fadiga e isquemia durante o período de sobrecarga oclusal.

Em 2001, Bani e Bergamini avaliaram a ação do relaxante muscular Dantrolene sobre músculos masseter de ratos com desgaste oclusal. Os resultados demonstraram significativa influência desse medicamento sobre o grupo desgaste oclusal, apresentando menor alteração degenerativa na estruturas musculares no que diz respeito à constrição de capilares, danos morfológicos nas fibras musculares e ao endotélio de vasos sanguíneos. Quanto ao volume de cálcio, o Dantrolene manteve a concentração deste íon semelhante ao grupo controle. Os autores concluíram que a ação do medicamento foi eficaz em diminuir os danos provocados pela fadiga no músculo masseter

Rodrigues e Ferreira, em 2003, investigaram a atividade do músculo masseter bilateralmente, na sua porção superficial, por meio de avaliação eletromiográfica com eletrodos de superfície em três grupos: grupo normal, grupo classe I, e o grupo classe II divisão I. Foram registrados 15 ciclos da seqüência da mastigação na velocidade habitual. Os resultados mostraram que houve diferença significativa, havendo diminuição da atividade eletromiográfica entre o grupo normal, grupo classe I, e o grupo classe II divisão I sucessivamente. Concluiu-se que a má oclusão contribuiu para que houvesse uma diferenciação da atividade eletromiográfica na mastigação habitual.

Segundo Guedes *et al.* (2003), as desordens funcionais dos músculos da mastigação causadas pela hiperatividade muscular correspondem à 80% da etiologia das DTM. A hiperatividade dos músculos da mastigação é bastante comum em indivíduos ansiosos com bruxismo, onicofagia e que tem posições inadequadas ao dormir, em que há interferência no posicionamento da mandíbula. Segundo o autor, a prática desses hábitos é agravada em situações de estresse emocional.

Carlsson *et al.* (2003) relataram dados coletados em um estudo longitudinal de 20 anos. Faziam parte do estudo, 402 pacientes selecionados aleatoriamente com 7, 11, e 15 anos que foram avaliados quanto ao fator oclusal, parafunção oral, desgaste dentário, e DTM. Vinte anos depois, 320 pacientes foram avaliados para as mesmas variáveis. A regressão logística indicou que a parafunção da infância (bruxismo) é um indício de parafunção oral 20 anos mais tarde. Relataram, também, que a parafunção na infância e má oclusão classe II de Angle é um indício de desgaste dental no adulto.

Gesh *et al.* (2004) relataram em seu trabalho que a falta de correlação a oclusão e os sintomas de DTM se deve, em parte, à falta de trabalhos epidemiológicos com metodologia estatística adequada e por isso salienta a necessidade de mais estudos. No entanto, relata que os poucos trabalhos corretamente delineados não mostram relação altamente positiva entre a oclusão e DTM, o que ficou confirmado na sua pesquisa. O autor fez uma análise regressiva com múltiplas variáveis em 4310 indivíduos e, mesmo assim, encontrou poucos fatores da oclusão funcional que tivessem relevância estatística com sintomas de DTM. Entretanto, observou uma forte associação entre o sexo feminino com sinais e sintomas de DTM.

Em 2005, Gesh *et al.*, utilizando a mesma base de dados anterior acharam forte correlação entre o bruxismo e a DTM.

Magnusson *et al.* (2005), utilizando o banco de dados do estudo de Carlsson, em 2003, relataram que a avaliação dessa mesma população, aos 4, 5, 10, e 20 anos do estudo apresentou correlação altamente significativa entre o bruxismo e os sintomas de DTM, porém, fraca relação entre os tópicos de má oclusão e sintomas de DTM. Contudo, fatores como mordida cruzada posterior unilateral e discrepância lateral durante a excursão da mandíbula entre a relação central (RC) e a máxima intercuspidação (MIH) mereceram ponderação dos autores classificando-as como fator de risco para desenvolver a DTM.

Issa *et al.*, em 2006, analisaram através de eletromiografia computadorizada os músculos masseteres bilateralmente em vinte indivíduos com DTM, divididos em dois grupos: o grupo I que consistiu em dez indivíduos com dentição completa e o grupo II de dez indivíduos com ausências dentais posteriores. Foram comparadas atividades clínicas: descanso antes e após exercícios mandibulares, máxima intercuspidação habitual (MIH), lateralidade direita e esquerda, oclusão cêntrica e protusão mandibular. Através da análise dos resultados, pode-se verificar diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.01$), sendo que o grupo I, apresentou maior atividade eletromiográfica (32.98 microvolts), do que o grupo II (22.31 microvolts), sugerindo que indivíduos do grupo II apresentaram menor atividade muscular. A interação entre os grupos e as atividades clínicas era significativa ($p < 0.01$), bem como entre os grupos, atividades clínicas e músculos ($p < 0.05$). Baseado nos dados desta pesquisa, os autores concluíram que indivíduos com o DTM, dentados ou não,

apresentaram atividade muscular elevada na posição de descanso e que os indivíduos com o DTM dentados, apresentaram atividade eletromiográfica maior do que os indivíduos com DTM e falta dos dentes posteriores.

Okano *et al.* (2007) investigaram a influência da alteração oclusal experimental sobre a atividade dos músculos mastigatórios. Vinte voluntários saudáveis (15 homens e cinco mulheres com idade média de 26 anos) participaram deste estudo. Restaurações metálicas fundidas foram fabricadas para o canino inferior, no segundo molar do mesmo lado e no segundo molar do lado oposto para simular uma oclusão com guia canino, uma oclusão com função em grupo e oclusão balanceada bilateral. As atividades eletromiográficas nos masseteres e nos músculos temporal anterior e posterior foram registradas durante apertamento máximo. O padrão oclusal experimental revelou ter efeitos estatisticamente significativos na atividade eletromiográfica muscular. A atividade eletromiográfica do músculo temporal anterior aumentou significativamente na oclusão com função em grupo e na oclusão balanceada bilateral quando comparada à oclusão com guia canino.

Segundo Van Selms *et al.* (2008) as mudanças na dor crônica dos músculos mastigatórios parecem estar mais relacionadas às mudanças no estresse emocional do que à atividade parafuncional. Os autores relatam ainda, que as dificuldades em realizar estudos longitudinais de longa duração com amostras de *n* expressivo, impossibilitam a aplicação de protocolos rígidos de avaliação e, conseqüentemente, não é possível obter dados conclusivos sobre a real função das diversas etiologias da DTM.

Por outro lado, diversos autores (BANI; BERGAMINI, 2002; BAZAN *et al.*, 2008; IYONOMASA *et al.*, 2008; SANTIWONG *et al.*, 2002) relatam

mudanças ultra-estruturais nos feixes neuromusculares dos músculos da mastigação quando há perda de estabilidade posterior.

Nesse contexto, mesmo que a DTM seja uma desordem comum, ainda não é bem compreendida. A razão provavelmente está relacionada à diversidade de etiologias e na dificuldade em compreender sua história e sintomatologia (MUNDT *et al.*, 2008). Conseqüentemente, diversas terapias conservadoras e reversíveis e outras irreversíveis como cirurgia e reposicionamento mandibular são apresentadas como tratamento para DTM. Devido à dificuldade em determinar a etiologia e a possibilidade de que os sintomas sejam secundários a qualquer outra desordem da articulação temporomandibular, ou mesmo, dos músculos mastigatórios deve-se propor terapias reversíveis no início do tratamento para DTM (NAIKMASUR *et al.*, 2008).

3.4 TRATAMENTO PARA DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

3.4.1 Farmacoterapia

Na presença de dor aguda, seja esta devida a um espasmo muscular ou a uma desordem inflamatória, os medicamentos podem se constituir em auxiliares importantes no tratamento das disfunções, geralmente associados à fisioterapia ou outras medidas terapêuticas (VAN SELMS *et al.*, 2008).

As pesquisas mais recentes reforçam a visão de que o paciente com disfunção sofre de uma alteração músculo-esquelética, apresentando

problemas heterogêneos e com etiologia multifatorial, o que consiste na principal dificuldade de tratamento (FRICTON, 2006). A terapêutica farmacoterápica visa diminuir ansiedade e/ou depressão, através de medicação específica, ansiolítica e antidepressiva, que diminuem o estresse, a tensão e a hiperatividade muscular decorrente. Como consequência, a dor também pode ser eliminada ou trazida a um nível que o paciente possa conviver sem limitações extremas de suas atividades (ALENCAR JÚNIOR *et al.*, 2006).

Como regra, deve-se lançar mão primeiramente de condutas mais simples e com características de reversibilidade (HOU *et al.*, 2002). O valor científico das condutas mais radicais como tratamento inicial é muito duvidoso, face à natureza multifatorial das disfunções e da eficácia de tratamentos reversíveis e não invasivos como a farmacoterapia (HERSH *et al.*, 2008). De maneira geral, o uso de fármacos é recomendado como forma de atenuar quadros agudos de dor e redução da ansiedade. Os analgésicos, relaxantes musculares, antiinflamatórios e ansiolíticos podem ser prescritos nestas situações (BANI; BERGAMINI, 2001, PAIVA *et al.*, 1994).

Os relaxantes musculares podem ser de ação central, periférica ou de atuação direta no músculo. Os relaxantes musculares de ação central são utilizados no tratamento de situações em que há espasmo muscular, qualquer que seja a sua etiologia. Há os que atuam a nível encefálico e os que atuam a nível espinal (embora possam estender a sua ação ao encéfalo). Os relaxantes de ação periférica são fármacos que bloqueiam a transmissão da condução nervosa ao nível da junção neuromuscular. Os relaxantes de ação periférica podem originar esse bloqueio por um mecanismo competitivo, ou por causarem despolarização da placa motora (GUYTON, 2006; HERSH *et al.*, 2008).

O dantrolene é um relaxante muscular que atua diretamente sobre o músculo esquelético e de grande utilidade no tratamento das hipertermias malignas e síndrome maligna dos neurolépticos. O dantrolene sódico, 1-[[[5-(4-nitrofenil)-2-furanil]-metileno]amino]-2-4-imidazolidinodiona, um derivado hidantoínico lipossolúvel, foi sintetizado, em 1967, por Snyder. Pode ser administrado por via oral ou intravenosa (LEITÃO, 1996). O dantrolene sódico é um relaxante muscular que inibe a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático durante o acoplamento excitação-contração, causando redução das concentrações de cálcio intracelular em suínos e em humanos (FRUEN *et al.*, 1997; PEREZ, 1993).

Em neurônios, o dantrolene atua prevenindo a injúria mediada por excesso de estimulação por glutamato, atuando por longo período, o que sugere processo de depressão de estoques de cálcio intracelular (PIRES, 2005; KRAUSE *et al.*, 2004).

No entanto, apesar da ação eficaz da farmacoterapia e dos relaxantes musculares para o tratamento de DTM, alguns pacientes com quadros clínicos crônicos de dor podem ter na sua história clínica, o uso de vários medicamentos por longos períodos, no entanto sem remissão dos sintomas. Esse fato pode dificultar a escolha da medicação adequada. Nesses casos, o ideal no primeiro momento é buscar outras modalidades terapêuticas (HOU *et al.*, 2002).

3.4.2 Laserterapia

A fotobiomodulação laser é uma modalidade de tratamento não invasiva e de baixo custo, que vem sendo amplamente utilizada no controle das mais diversas afecções, dentre as quais as mio-articulares. Frequentemente utilizada na prática clínica fisioterápica para o alívio de dor e regeneração tecidual, esta terapia tem sido atestada como benéfica no tratamento da DTM. Dentre os efeitos terapêuticos encontram-se o antiinflamatório, o analgésico e o modulador da atividade celular, os quais têm sido comprovados em diversos estudos (COSTARDI *et al.*, 2008; FRARE; NICOLAU, 2008, TÚNER; HODE, 2004).

A Laserterapia é usada principalmente para aliviar a dor, reduzir a inflamação e acelerar a cicatrização (KARU, 1987), isto acontece por meio do aumento na produção de colágeno, no número de fibroblastos e da circulação sanguínea dentro do tecido regenerado. O efeito supressivo nas reações imunes também são efeitos alcançados no tratamento com a laserterapia (KOGAWA *et al.*, 2005).

A laserterapia é eficaz na resistência a fadiga muscular, e capaz de inibir a evolução do edema (AMARAL; SALVANI, 2001; LOPES- MARTINS *et al.*, 2006). O emprego dessa terapia atua como coadjuvante no tratamento da disfunção. (GENOVESE, 2007; LEAL JUNIOR *et al.*, 2008a; 2008b). A laserterapia é eficiente sempre que um efeito local seja necessário, estimulando a micro circulação, bem como o tropismo celular local ou quando se necessita de um efeito terapêutico geral, promovendo o alívio da dor de diversas etiologias, inclusive para irradiar pontos gatilho em dor miofacial, agindo na reparação tecidual, na redução do edema e da hiperemia (MAZZETTO *et al.*, 2007; SHINOZAKI *et al.*, 2006).

Em 2005, Kogawa *et al.* avaliaram a efetividade do laser de baixa frequência e do estímulo muscular microelétrico (MENS) no tratamento de pacientes com disfunções temporomandibulares (DTM). Dezenove indivíduos com sinais e sintomas de DTM de origem muscular, foram divididos em dois grupos: I – laser (830nm, 4J/cm² e 110mW) e II – MENS (40 a 160 mW por 20 minutos). A terapia consistiu de 10 sessões, três vezes por semana, durante um mês. Os critérios de avaliação dos pacientes foram: escala análoga visual (EAV), mensuração de abertura máxima bucal e palpação muscular. Estes foram avaliados imediatamente antes e cinco minutos após cada sessão terapêutica, em um estudo do tipo controlado. Os resultados demonstraram aumento da abertura bucal máxima e diminuição na sensibilidade à palpação em ambos os grupos e, em relação à EAV, ambos os grupos demonstraram decréscimo, mas houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, já que o grupo laser apresentou os melhores resultados. Os autores concluíram que as duas terapias foram efetivas como parte do tratamento das DTM. No entanto, sugerem cautela quando analisam os resultados devido ao aspecto auto-limitante das condições músculo-esqueléticas como as DTM.

Shinozaki *et al.*, em 2006, investigaram, a atividade eletromiográfica dos músculos masseter e temporal anterior, comparando diferentes momentos de aplicação do laser. Foram realizados exames clínicos em 13 pacientes com DTM, para definir o lado de maior sintomatologia dolorosa e comprometimento da disfunção temporomandibular, o qual foi tratado com aplicação do laser de diodo (GaAIs), 790 nm (infravermelho), potência de 40 mW, sistema de aplicação do feixe por contato direto com a pele, e área de foco de 0,20 cm². A irradiação ocorreu em quatro pontos na articulação temporomandibular com 1,5

J/cm²; um ponto na região do ouvido externo com 2,5 J/cm²; em três pontos no músculo masseter com 3 J/cm² e três pontos no músculo temporal com 3 J/cm². Os pacientes foram submetidos a uma avaliação subjetiva de dor. Os músculos masseter e temporal, de ambos os lados, foram avaliados eletromiograficamente antes da laserterapia, imediatamente, cinco minutos e vinte minutos após a aplicação do laser. Foram observadas reduções das atividades eletromiográficas em todos os tempos experimentais e em ambos os músculos masseter e temporal, após a aplicação do laser. Conseqüentemente, houve alívio da condição dolorosa. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência da laserterapia na promoção do relaxamento dos músculos avaliados, com conseqüente alívio da sintomatologia dolorosa, proveniente da contratura e da fadiga muscular.

Kato *et al.*, em 2006, realizaram um estudo comparativo entre eletroestimulação transcutânea (TENS) e laserterapia em pacientes com DTM e avaliou, por meio da EAV, redução do quadro doloroso e aumento da abertura bucal máxima em ambos os grupos tratados. Foram selecionados dezoito pacientes com sinais e sintomas de DTM crônica de origem muscular que foram divididos em dois grupos: grupo TENS e laserterapia (830 – 904 nm, 4 Jcm² e 100mW). Os grupos receberam 10 sessões, três por semana, durante um mês. A avaliação foi realizada imediatamente antes e cinco minutos após cada sessão terapêutica. Os resultados demonstraram decréscimo na EAV e aumento da abertura bucal máxima de ambos os grupos. A palpação muscular apresentou diferença significativa para o grupo laser. Concluiu-se que ambas as terapias propostas foram efetivas no tratamento das DTM.

Frare e Nicolau, em 2008, verificaram o nível de dor de pacientes com DTM tratados com laserterapia. Foram estudados 18 pacientes do sexo feminino, com idade média de 27 anos (± 7), com diagnóstico de DTM, os quais foram separados aleatoriamente em dois grupos: Placebo (Controle) e Tratado. O Grupo Tratado (n= 10) recebeu atendimento duas vezes por semana, por quatro semanas consecutivas (totalizando oito aplicações). Utilizou-se o laser de GaAs (904 nm), 6 J/cm², 0,38 mW/cm², área do feixe de 0,039 cm², com modo de emissão contínua. Realizou-se a aplicação do laser em quatro pontos pré-auriculares e um no meato acústico externo. O Grupo Placebo (n= 8) foi manipulado como o tratado, porém com o laser desligado. Para análise do nível de dor dos pacientes, empregou-se a EAV de dor, antes e após a terapia. Observou-se redução significativa do nível de dor do Grupo Tratado.

Por outro lado, Kulekcioglu *et al.* (2003), em estudo clínico placebo-controlado sobre a efetividade da fotobiomodulação laser, observaram significativa redução na dor tanto no grupo tratado quanto no placebo. O efeito placebo foi discutido em estudo de Gam, Thorsen e Lonnberg, em 1993, no qual, por meio de meta-análise, foi verificado o efeito da fotobiomodulação laser em dores músculoesqueléticas, encontrando-se diferenças mínimas entre os Grupos tratado e placebo.

Uma revisão sistemática realizada por McNeely *et al.*, publicada em 2006, examinou a eficácia de diferentes intervenções fisioterápicas, incluindo a fotobiomodulação laser no tratamento das DTM. Baseado nos achados, não foi observada diferença entre os grupos estudados quanto ao alívio da dor. Não foram encontradas evidências sobre o efeito da eletroterapia, incluindo o laser, na redução da dor.

Diversos estudos controlados não mostraram efeitos da laserterapia para a dor orofacial crônica. Um efeito positivo pelo tratamento placebo foi relatado também e assim não se pode excluir a hipótese de que o efeito positivo da laserterapia no alívio da dor seja meramente um efeito placebo (EMSHOFF *et al.*, 2008; GORGEY *et al.*, 2008, TULLBERG *et al.*, 2003).

Diante do exposto acima, ainda faltam dados concretos, que possam esclarecer os mecanismos de ação do laser sobre os eventos fatigante no músculo ou mesmo a ação dessa terapia em disfunções musculares do sistema estomatognático, por isso, novas pesquisas que esclareçam esses pontos fazem-se necessárias.

3.5 MÉTODOS LABORATORIAIS

Diversos estudos que avaliam distúrbios musculares estabelecem relação entre fadiga e os metabólitos presentes na fibra muscular, principalmente o íon cálcio que é um dos principais agentes responsáveis pela contração muscular. O cálcio pode ser aferido por fluorescência, espectroscopia Raman, espectroscopia por absorção atômica entre outros, principalmente quanto a atividade do retículo sarcoplasmático, ou mesmo, da mitocôndria (Allen *et al.*, 2008b).

As principais funções da microscopia eletrônica em músculos são: distinguir fibras normais das anormais; esclarecer e identificar características pouco visíveis ao microscópio de luz. Secções transversais permitem o estudo de um número maior de fibras, mas as secções longitudinais são mais informativas, porque uma área mais larga de estrutura miofibrilar e do

sarcômero em cada fibra pode ser vista. Além das fibras musculares, outros componentes do tecido podem ser observados: capilares, nervos intramusculares, matriz extracelular e celular, e organelas celulares como as mitocôndrias e o retículo sarcoplasmático (ROTH et al., 2000) . Os estudos morfológicos, entretanto, devem estar relacionados à apresentação clínica e aos resultados de estudos moleculares e bioquímicos (SEWRY, 2002).

O retículo sarcoplasmático causa um aumento transitório do cálcio livre no mioplasma, o que é relativamente fácil de medir. Não há nenhuma medida do volume de cálcio na fadiga que possa avaliar de que forma a concentração de cálcio é afetada por mudanças iônicas e metabólicas da fadiga; conseqüentemente, a suposição de que a alteração de cálcio reflete as mudanças na liberação pelo RS pode estar incorreta (ALLEN et al., 2008a).

Técnicas de espectroscopia têm sido utilizadas para análise de tecidos biológicos, apresentando resultados bastante confiáveis, uma vez que seja possível adequar a técnica espectroscópica às informações necessárias para uma análise precisa da amostra. A Espectroscopia Raman usa radiação *laser* com energia próxima à do infravermelho para excitar uma dada amostra e medir a luz transmitida pela mesma.

Esse processo de troca de energia entre molécula, luz espalhada e luz incidente é conhecido como efeito Raman. Do ponto de vista energético, o processo de espalhamento Raman pode ser descrito como a transição de uma molécula do estado fundamental para um estado vibracional excitado, acompanhada por uma absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado. A luz espalhada pode ser coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança

de frequência (deslocamento). Visto que cada amostra molecular possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos, cada um deslocado pela sua frequência vibracional característica daquela molécula, fornecendo assim a identificação para a molécula que está sendo estudada. O deslocamento Raman é freqüentemente medido em comprimento de onda (cm^{-1}), uma unidade conveniente para relacionar a mudança de frequência da luz espalhada em relação à frequência da luz incidente. Essa unidade de medida pode ser chamada de deslocamento ou intensidade Raman. (SOUZA *et al.*, 2003).

Todas as doenças, sem exceção, são causadas por mudanças na bioquímica celular e/ou dos tecidos. O corrente desafio da medicina moderna é o de encontrar uma técnica analítica que investigue essas alterações por métodos não-invasivos e não-destrutivos. As técnicas de espectroscopia estão atualmente emergindo como métodos poderosos para diagnóstico médico, visto que alterações moleculares podem ser detectadas por espectroscopia através dos sinais característicos da doença, resultando em um diagnóstico *in vivo* não invasivo (SILVA, 2005).

Este fato é de grande relevância, pois torna possível comparar a eficiência de diferentes métodos de análise de tecidos em diferentes escalas, partindo-se da microscopia óptica para o nível molecular. É possível, assim comparar as alterações químicas ocorridas, obviamente, no nível molecular, com as alterações morfológicas microscópicas observadas no desenvolvimento da fadiga, resultando no conhecimento mais detalhado deste processo (HANLON *et al.*, 2000).

Diante da literatura pesquisada neste trabalho observou-se que ainda faltam dados que comprovem que a oclusão é um fator etiológico da DTM, e ainda, que faltam dados da efetividade do laser como tratamento para tal disfunção, por isso faz necessário a utilização de modelos experimentais que tragam novas ferramentas capazes de auxiliar a elucidar as incertezas no campo da DTM. Com base nesse contexto, a espectroscopia de Raman pode tornar-se um instrumento capaz de auxiliar a entender as alterações morfológicas em músculos submetidos a esforço ou função alterada, assim como ocorre nos músculos mastigatórios de indivíduos com DTM.

4 OBJETIVO

Avaliar o efeito do laser diodo ($\lambda 830\text{nm}$, 4 J/cm^2) e do fármaco Dantrolene sobre o músculo masseter de ratos submetidos à alteração oclusal, por meio de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia Raman.

5 METODOLOGIA

5.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei nº 6.638/79 (GOLDIM, 1995). Dessa forma, a pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (anexo I).

5.2 POPULAÇÃO E GRUPOS

O modelo animal utilizado foi rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*. Esta população animal era composta por adultos jovens, machos, com idade aproximada de três meses, pesando aproximadamente 300 gramas cada um e provenientes do biotério experimental da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

Os procedimentos cirúrgicos e a manutenção dos animais ocorreram no Laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, assim como os sacrifícios. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas forradas com serragem, com cinco animais em cada gaiola e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. A dieta foi controlada e padronizada (Labina[®], São Paulo, Brasil) com 300g diárias de

ração por gaiola. Os animais foram mantidos em condições normais de temperatura, umidade e luminosidade. No presente estudo foram utilizados 40 ratos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de estudo, com a seguinte organização (Quadro 5.1):

Quadro 5.1 Distribuição dos grupos experimentais (UFPB-UFBA, 2008).

Nome do grupo	Descrição	Animais
Grupo I - Controle (C) - 14d	Controle (sacrifício em 14 dias)	05
Grupo I - Controle (C) - 30d	Controle (sacrifício em 30 dias)	05
Grupo II - Desgaste (DE) -14d	Desgaste oclusal unilateral (sacrifício em 14 dias)	05
Grupo II - Desgaste (DE) -30d	Desgaste oclusal unilateral (sacrifício em 30 dias)	05
Grupo III - Laser (LA) – 14d	DE + laserterapia (sacrifício em 14 dias)	05
Grupo III - Laser (LA) – 30d	DE + laserterapia Sacrifício em 30 dias	05
Grupo IV - Dantrolene (DA) – 14d	DE + Relaxante Muscular (sacrifício em 14 dias)	05
Grupo IV - Dantrolene (DA) – 30d	DE + Relaxante Muscular (sacrifício em 30 dias)	05

5.2.1 Grupo Controle - I

Os animais do grupo I tiveram a mandíbula aberta através de elásticos cirúrgicos posicionados sobre os incisivos centrais superiores e inferiores por

cinco minutos, apenas para reproduzir os procedimentos de desgaste oclusal. Cinco animais foram mortos no décimo quarto dia e outros cinco no trigésimo dia.

5.2.2 Grupo Desgaste Oclusal - II

Da mesma forma, os animais do grupo II tiveram a mandíbula aberta através de elásticos cirúrgicos posicionados sobre os incisivos centrais superiores e inferiores. Foi realizado, então, desgaste nas cúspides dos molares superiores e inferiores esquerdos utilizando-se motor elétrico e uma broca diamantada (1012, KG Sorensen) sob refrigeração de solução salina para evitar o aquecimento do complexo dentina-polpa (NOGUEIRA-FILHO *et al*, 2004). Os animais estiveram sob anestesia geral através da injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de quetamina (0.7 mL/100 g) e xilazina (0.25 mL/100 mg). Cinco animais foram mortos 14 dias após o desgaste oclusal e cinco animais mortos 30 dias após o desgaste oclusal.

5.2.3 Grupo Laserterapia - III

O grupo III sofreu desgaste oclusal com a mesma metodologia do grupo II. No grupo III, os animais foram submetidos à laserterapia (no espectro infravermelho de $\lambda 830\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 40mW , emissão contínua e área da ponteira de $0,03\text{ cm}^2$), sendo a primeira sessão realizada 24 horas após o desgaste oclusal. Os animais foram submetidos a tricotomia na região do masseter esquerdo. A ponteira do aparelho laser foi, então, posicionada

perpendicularmente ao músculo masseter esquerdo dos animais, em dois pontos de aplicação, separados por um cm, sendo aplicado $2\text{J}/\text{cm}^2$ em cada ponto. As aplicações do laser foram realizadas a cada 48h, durante o período experimental de 14 e 30 dias, a depender do grupo.

5.2.4 Grupo Dantrolene - IV

O grupo IV sofreu desgaste oclusal com a mesma metodologia do grupo II e III. No grupo IV, os animais foram submetidos à terapia com relaxante muscular. Foram aplicadas doses intraperitoneais diárias de relaxante muscular ($2,5\text{mg}/\text{kg}$ diluída em 0,5 ml de água – Dantrolene/Cristália, SP), iniciando-se 24 horas após a indução do desgaste de oclusão.

5.3 DOS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO

Para que os animais pudessem ser incluídos na pesquisa, deveriam:

- Ser da raça proposta
- Não apresentar debilidade do estado geral de saúde que pudesse

trazer problemas e desconforto ao animal durante o experimento, tanto no período pós-operatório, quanto no momento do sacrifício.

5.4 APARELHO DE LASER

O aparelho utilizado foi o diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) modelo BioWave (Kondortech, São Carlos, SP), o qual possui duas

ponteiras independentes, que emitem laser em dois comprimentos de onda diferentes respectivamente: $\lambda 660\text{nm}$, espectro vermelho, ajustado na potência (P) de 30mW, modo de emissão contínuo (CW) e área da ponteira de $0,03\text{ cm}^2$ e a outra ponteira emite laser no espectro infravermelho de $\lambda 830\text{nm}$, com potência de até 40mW, modo de emissão contínuo e área da ponteira de $0,03\text{ cm}^2$.

5.5 MORTE ANIMAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Ao término do período experimental para cada subgrupo definido em 14 e 30 dias, os animais foram mortos com *overdose* intraperitoneal de anestésico geral. Depois de constatada a morte através da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea foi realizada a remoção da peça.

Utilizando um bisturi montado em cabo *Bad Parker*, a pele da hemi-face esquerda dos animais foi dissecada através de uma incisão retilínea sub-epitelial com descolamento da pele atingindo o plano muscular e, então, foi feita exeresse do músculo masseter ipsilateral ao desgaste oclusal.

Cada amostra dos músculos removida foi dividida em três segmentos de seções transversais, incluindo o feixe superficial e profundo em cada fragmento.

Os três fragmentos de cada músculo foram então processados separadamente de acordo com o que se segue: um fragmento para microscopia de luz, um fragmento para microscopia eletrônica de transmissão

(MET), um fragmento para análise da intensidade do fosfato de cálcio por espectroscopia Raman.

5.5.1 Microscopia de Luz.

Para a microscopia de luz, os fragmentos foram fixados em Formol a 10%. Após o período de fixação de 24 horas, os espécimes foram processados de acordo com a rotina para inclusão em parafina. Os blocos foram identificados, incluídos e submetidos à microtomia. Cortes de 5 μ m foram destinados à técnica de coloração histológica H&E.

Nessa coloração, os fragmentos tiveram cinco campos escolhidos aleatoriamente, nos quais foram avaliados, com aumento de 40x, os sinais de dano muscular, referentes à formação de vacúolos no citoplasma das células musculares, edema intersticial, fibrose, presença de células inflamatórias e tamanho das fibras musculares. Os espécimes processados foram então avaliados através de análise descritiva comparativa, no Laboratório de Patologia Cirúrgica do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia - FOUFBA.

5.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Para a microscopia eletrônica, o fragmento do masseter foi recortado no sentido longitudinal das fibras musculares com auxílio de um bisturi sobre uma placa de cera dental. Fragmentos pequenos, com cerca de 1 milímetro no

maior diâmetro, foram fixados no glutaraldeído a 2%. Os fragmentos foram, então, lavados três vezes por cinco minutos em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1M) e fixados durante uma hora em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 1,25% em temperatura ambiente. Após a fixação ósmica, foram lavados em água tridestilada, desidratados em concentrações crescentes de etanol/acetona (30, 50, 70, 90 e 100°GL) e embebidos em acetato de uranila aquosa a 1% *overnight*.

Posteriormente, foram lavados duas vezes por 10 minutos em água destilada e incluídos em blocos de resina Polybed. A polimerização foi realizada em estufa por 48 horas a 80°C. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo com navalha de diamante. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh* e contrastados por acetato de uranila aquosa a 1% (por 30 minutos) e citrato de chumbo (por 10 minutos). Esses cortes foram observados e fotomicrografados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss-EM110).

Uma avaliação semi-quantitativa da prevalência e severidade da injúria nas fibras musculares foi adaptada do trabalho de Bani *et al.*(1998): 0= normal, 1= injúria discreta, 2= injúria moderada, 3= injúria severa (Quadro 5.2). Cada fragmento muscular avaliado no microscópio eletrônico teve três campos observados. Em cada campo foram realizadas fotomicrografias em três magnitudes diferentes: 4.400, 12.000 e 20.000 vezes de aumento.

Quadro 5.2- Escores para lesão muscular por microscopia eletrônica de transmissão (UFPB-UFBA, 2008).

ESCORE	GRAU DE INJÚRIA	DESCRIÇÃO
0	Fibra Normal	
1	Leve	<ul style="list-style-type: none"> • Edema mitocondrial • Edema intracelular • Mitocôndrias com perda de cristas
2	Moderada	<ul style="list-style-type: none"> • Edema mitocondrial • Edema intracelular • Mitocôndrias com perda de cristas • Hiper-contração das miofibrilas
3	Severa	<ul style="list-style-type: none"> • Edema mitocondrial • Edema intracelular • Mitocôndrias com perda de cristas • Hiper-contração e desarranjo da miofibrilas • Presença de grânulos densos intra mitocondriais. • Presença de vacúolos intra-fibrilares • Ruptura da Membrana Sarcoplasmática

Adaptado de Bani et al. 1998. Fonte de Dados da Pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

Para cada campo observado, foi atribuído um escore à injúria da fibra muscular. Foram observados três campos por fragmento muscular, sendo que cada grupo experimental tinha cinco animais, sendo, portanto, obtidos 15 escores por grupo.

5.5.3 Espectroscopia Raman

Para a análise da concentração do fosfato de cálcio por espectroscopia de Raman, fragmentos musculares foram inseridos diretamente em nitrogênio líquido e armazenados em botijões apropriados.

No momento da aquisição de dados do Raman, os músculos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. O músculo foi, então, fixado no porta-amostra, permitindo a realização de três aquisições contínuas de 50 segundos em cada fragmento muscular.

Os espectros obtidos com as aquisições no sistema Raman foram filtrados por um filtro digital e implementados com a utilização do programa Excell (*Microsoft*) e Grams/Al®. Os espectros tiveram boa parte dos ruídos excluídos para melhor observação do pico desejado e para que fosse possível medir a intensidade dos picos para o fosfato de cálcio.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise estatística não-paramétrica para os dados semi-quantitativos e avaliação do grau de injúria muscular, devido ao alto desvio padrão e semelhança entre as médias. Aplicou-se os testes Kruskal-Wallis para comparação não pareada entre três ou mais grupos e Mann Whitney para comparação não pareada entre dois grupos.

Para o fosfato de cálcio, através da espectroscopia Raman, aplicou-se os testes *One-way* ANOVA e/ou teste de *Student's t* ($P < 0.05$).

6 RESULTADOS

Os resultados serão descritos de acordo com o tipo de análise: descritiva para a microscopia de luz, semi-quantitativa para a microscopia eletrônica de transmissão, quantitativa para concentração de fosfato de cálcio por espectroscopia Raman.

6.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Sob microscopia de luz, o tecido muscular mostrou-se com aspecto similar em todos os grupos. O músculo masseter mostrou feixes de fibras separadas por septos finos de tecido conjuntivo, ricos em capilares sanguíneos. Apresentaram estrias transversais típicas, formadas pela disposição paralela e regular das miofibrilas no citoplasma. A maioria das fibras apresentou aparência usual. Em cortes longitudinais, observou-se células alongadas, cilíndricas, não ramificadas, multinucleadas, e com estriações transversais que aparecem como linhas escuras e claras intercaladas, características da organização das miofibrilas. Em corte transversal, as mesmas células assumem um formato poliédrico com núcleos periféricos.

Diante do observado nos músculos masseter estudados, parece que o desgaste oclusal nos dentes posteriores de ratos Wistar não foi capaz de causar mudanças teciduais importantes, que possam ser observadas sob aumentos de 40 vezes (Figura 6.1), já que todos os grupos foram semelhantes ao grupo controle.

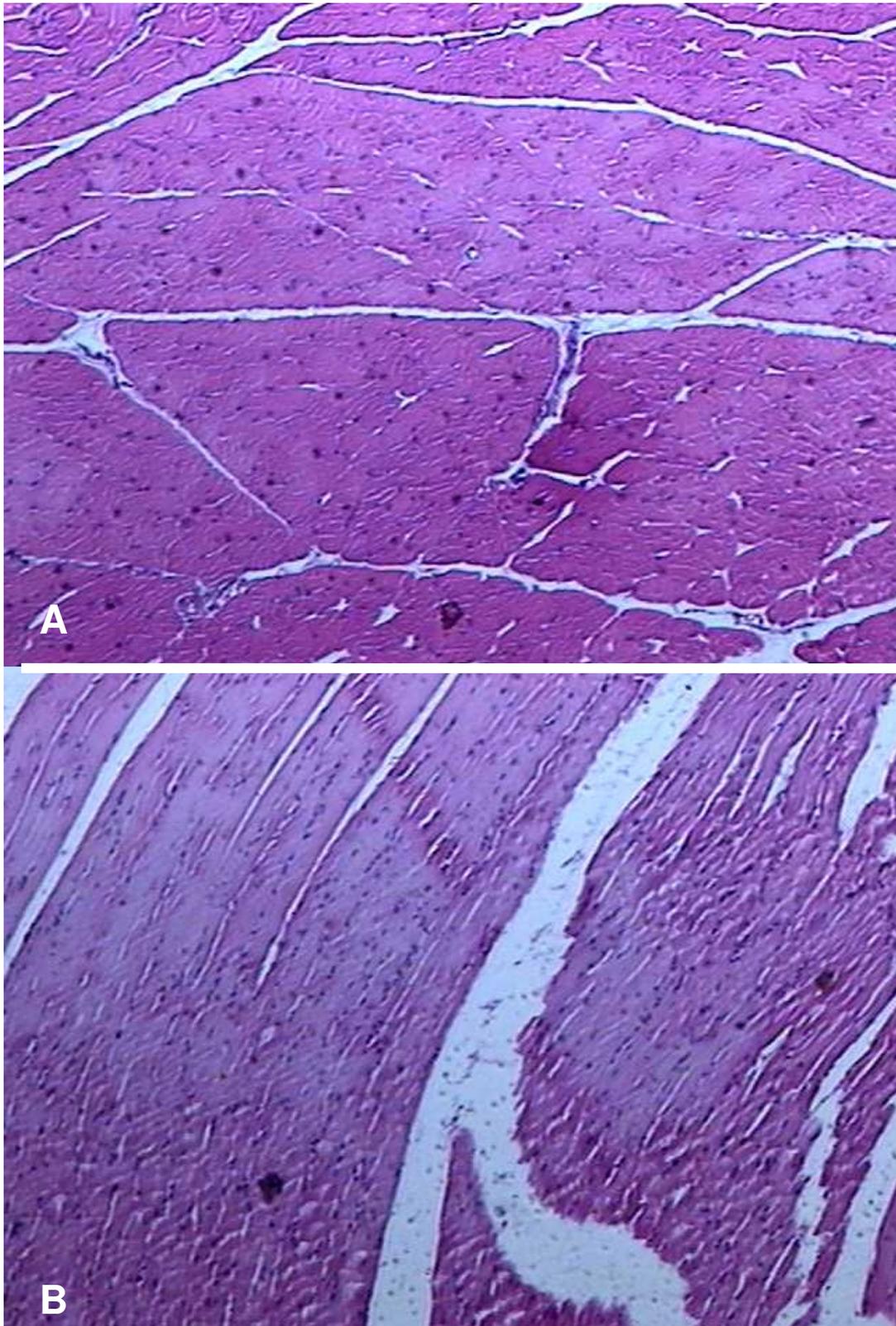


Figura 6.1 – A – Grupo Controle 30 dias: feixes dispostos longitudinalmente com aspecto de normalidade (H&E, 40 x). B – Grupo Desgaste Oclusal 30 dias: feixes dispostos longitudinalmente com aspecto de normalidade (H&E, 40 x, UFPB-UFBA, 2008).

6.2 MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO

Os resultados da microscopia eletrônica avaliaram a ocorrência e a severidade de injúria ou dano miofibrilar. Os resultados estão de acordo com os critérios do quadro 5.2.

Os valores foram atribuídos para cada campo observado, sendo que foram observados três campos por animal, totalizando 15 valores para cada grupo, que estão demonstrados na Tabela 6.1. As porcentagens equivalentes à ocorrência de cada escore estão expressas na tabela 6.2.

Tabela 6.1 – Escores atribuídos para cada campo observado (UFPB-UFBA, 2008).

Control 14d	Desgas 14d	Laser 14d	Dantro 14d	Control 30d	Desgas 30d	Laser 30d	Dantro 30d
1	1	0	1	1	2	0	1
1	1	0	0	1	2	1	0
1	1	0	0	0	0	1	0
2	0	2	1	0	1	0	0
1	2	1	1	0	3	1	1
1	3	1	1	3	0	0	2
0	3	0	1	0	2	1	1
0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	3	3	0	2	0	0
0	0	1	0	0	1	2	0
1	1	1	0	0	0	1	1
0	0	2	1	0	1	1	1
1	1	2	1	1	1	2	0
1	1	0	0	1	0	1	1
1	3	0	0	0	0	0	2

De acordo com quadro 5.2: 0= normal, 1=pequena injuria, 2= injuria moderada, 3= injuria severa.

De acordo com a tabela 6.2, o grupo Controle 14 dias não apresentou injúria ou dano celular, já que não apresentou campos com grau de injuria três, ou severo e 26,7% dos campos não apresentou qualquer sinal de dano. Os danos leves que apareceram nesse grupo estão vinculados ao processamento de tecido muscular para microscopia eletrônica, já que a maioria deles se caracterizava por leve perda de miofibrilas (miofibrilas separadas sem sinal de

contratura ou injúria) (Fig. 6.2 - A). Apenas um dos campos observados apresentou injúria moderada, escore dois.

Tabela 6.2 - Porcentagens equivalentes a ocorrência de cada escore de injúria muscular (UFPB-UFBA, 2008).

	0 (sem alteração)	1 (injúria leve)	2 (injúria moderada)	3 (injúria severa)
Controle 14	26,7%	66,6%	6,7%	
Controle 30	60 %	33,4%	6,7%	
Desgaste 14	20%	53,3%	6,7%	20%
Desgaste 30	40%	26,7%	26,7%	6,6%
Dantrolene 14	40%	53,3%		6,7%
Dantrolene 30	40%	46,7%	13,3%	
Laser 14	40%	33,3%	20%	6,7%
Laser 30	40%	46,7%	13,3%	

Para o grupo controle 30 dias, seguiu-se o mesmo padrão, com pouca injúria, onde 60% dos campos não apresentaram qualquer sinal de dano. Os danos leves presentes neste grupo, representam 33,3% dos campos e estão vinculados ao processamento de tecido muscular para microscopia eletrônica, já que a maioria deles se caracterizava por leve perda de miofibrilas (Fig. 6.2 - B). Apenas um dos campos apresentou dano severo.

O grupo Desgaste Oclusal 14 dias apresentou 20% dos campos com injúria severa; mitocôndrias edemaciadas com perda de cristas e matriz clara; hiper-contração da banda I, miofibrilas desorganizadas e presença de numerosos vacúolos. A porcentagem de campos com injúria moderada foi de 6,7 %, para injúria leve foi de 53,3 % e apenas 20% sem injúria (Figura 6.3 - A).

O grupo Desgaste Oclusal 30 dias apresentou 6,7% dos campos com injúria severa, com mitocôndrias edemaciadas, com perda de cristas e matriz

clara; hiper-contração da banda I, miofibrilas desorganizadas e presença de numerosos vacúolos. A porcentagem de campos com injúria moderada foi de 26,7 %. Para injúria leve foi de 26,7 % e 40 % dos campos apresentou-se sem injúria (Figura 6.3 - B).

O grupo relaxante muscular 14 dias apresentou 6,7 % de campos com injúrias severas, nenhum campo com injúria moderada, 53,3% dos campos com injúrias leves e 40% de campos sem sinais de dano. O grupo relaxante muscular 30 dias não apresentou injúria severa, apenas 13,3 % dos campos com injúria moderada, 46,7% de campos com injúrias leves e 40% de campos sem sinais de dano.

O grupo laser 14 dias apresentou 6,7% de campos com injúrias severas, 20% de campos com injúrias moderadas, 33,3 % de campos com injúrias leves e 40 % dos campos sem sinais de dano. O grupo laser 30 dias não apresentou campos com injúrias severas, apenas 13,3% dos campos com injúrias moderadas, 53,3 % dos campos com injúrias leves e 33,4 % dos campos sem sinais de dano.

Nos grupos laserterapia e relaxante muscular verificou-se que os miofilamentos dos sarcômeros estão bem organizados, além da presença de diversos vacúolos e mitocôndrias com lamelas bem definidas. Não houve sinais de degradação celular como no grupo desgaste oclusal, pois os sinais de injúria severa foram encontrados em poucos campos (Fig. 6.4 e 6.5).

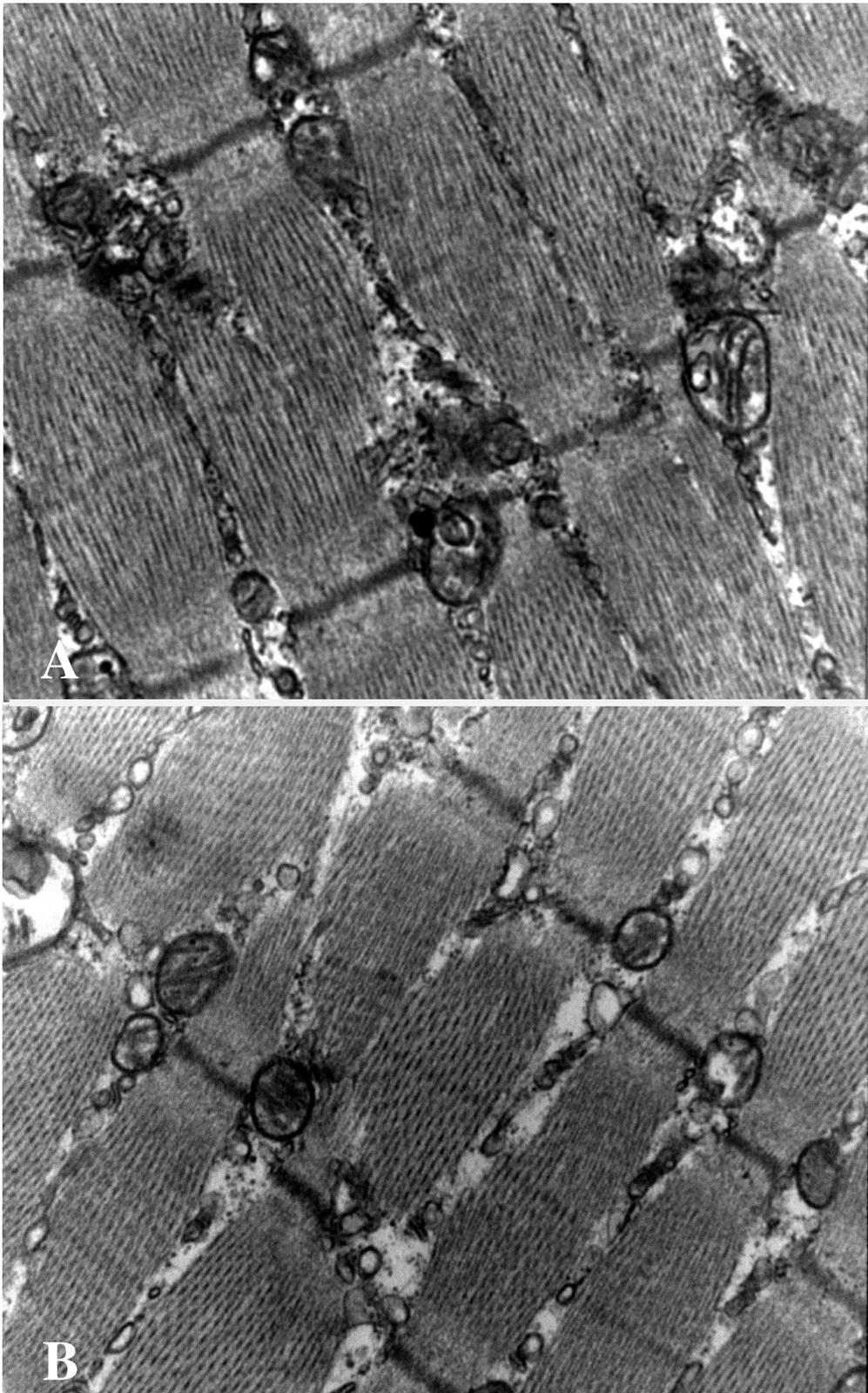


Figura 6.2 – A – Grupo Controle 14 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às triades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000X). B - Grupo Controle 30 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às triades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000x - UFPB-UFBA, 2008).

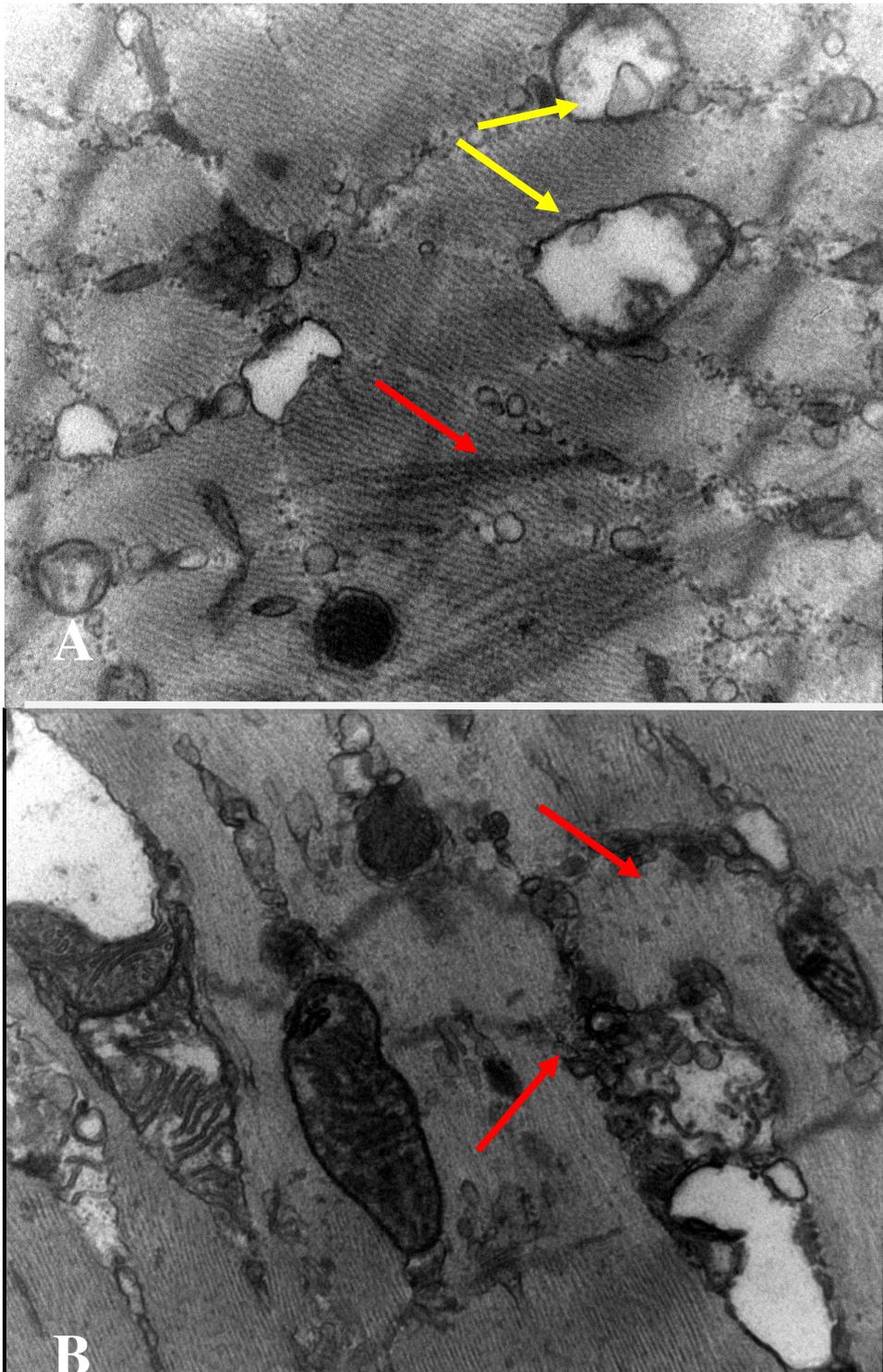


Figura 6.3 – A - Grupo Desgaste Oclusal 14 dias - mitocôndrias com perda de cristas e matriz clara (seta amarela); hiper-contracção da banda I, miofibrilas desorganizadas (setas vermelhas) e presença de vacúolos (20000 X). B – Grupo Desgaste Oclusal 30 dias -miofibrilas desorganizadas (setas vermelhas) e presença de vacúolos (30 dias, 12000 x - UFPB-UFBA, 2008).

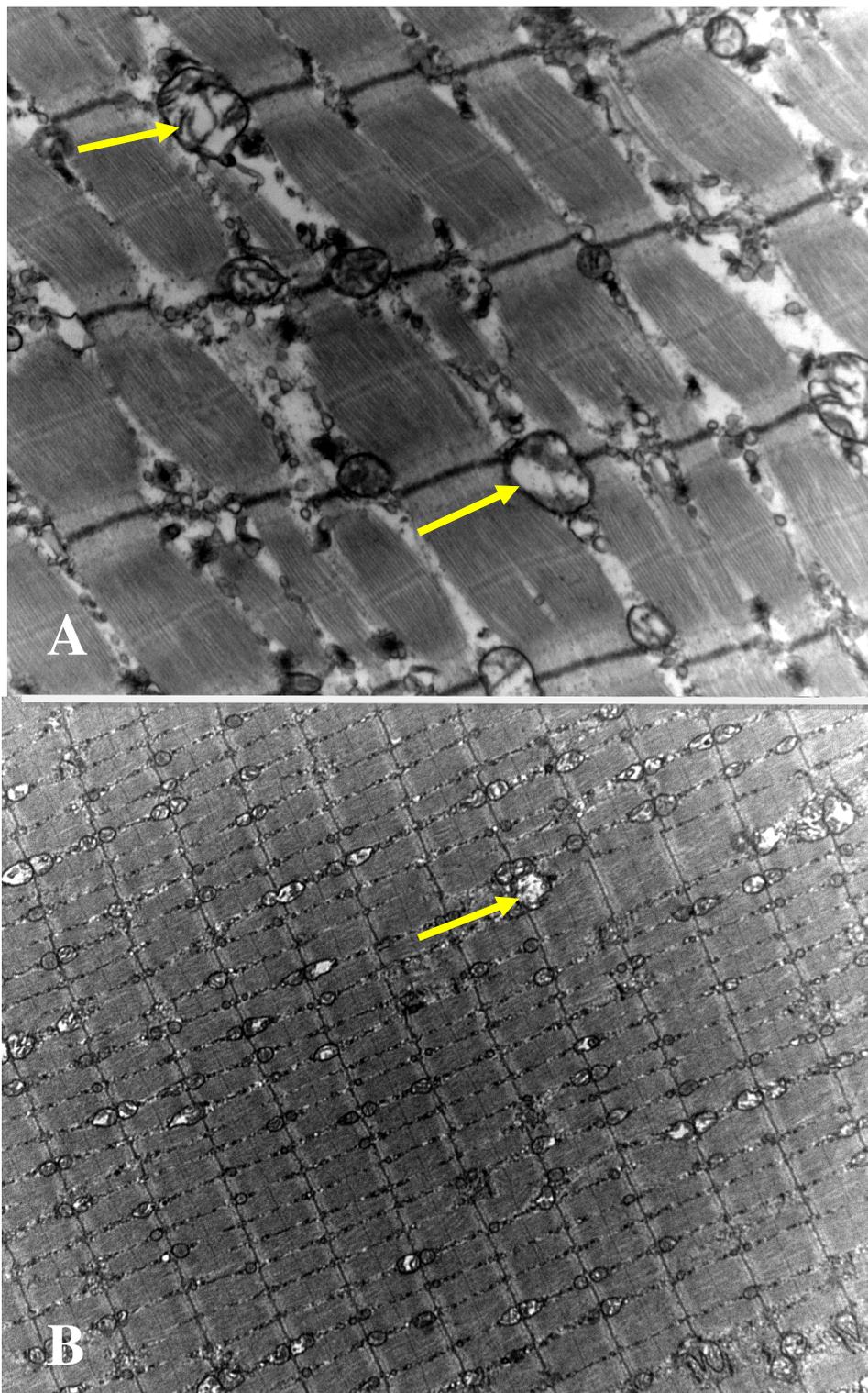


Figura 6.4 – A - Grupo Laser 14 dias (12.000 X). B - Grupo Laser 30 dias (4.400 X), ambos com aspecto de normalidade, apenas discreta presença de mitocôndrias com matriz clara (seta amarela) e poucos vacúolos (UFPB-UFBA, 2008).

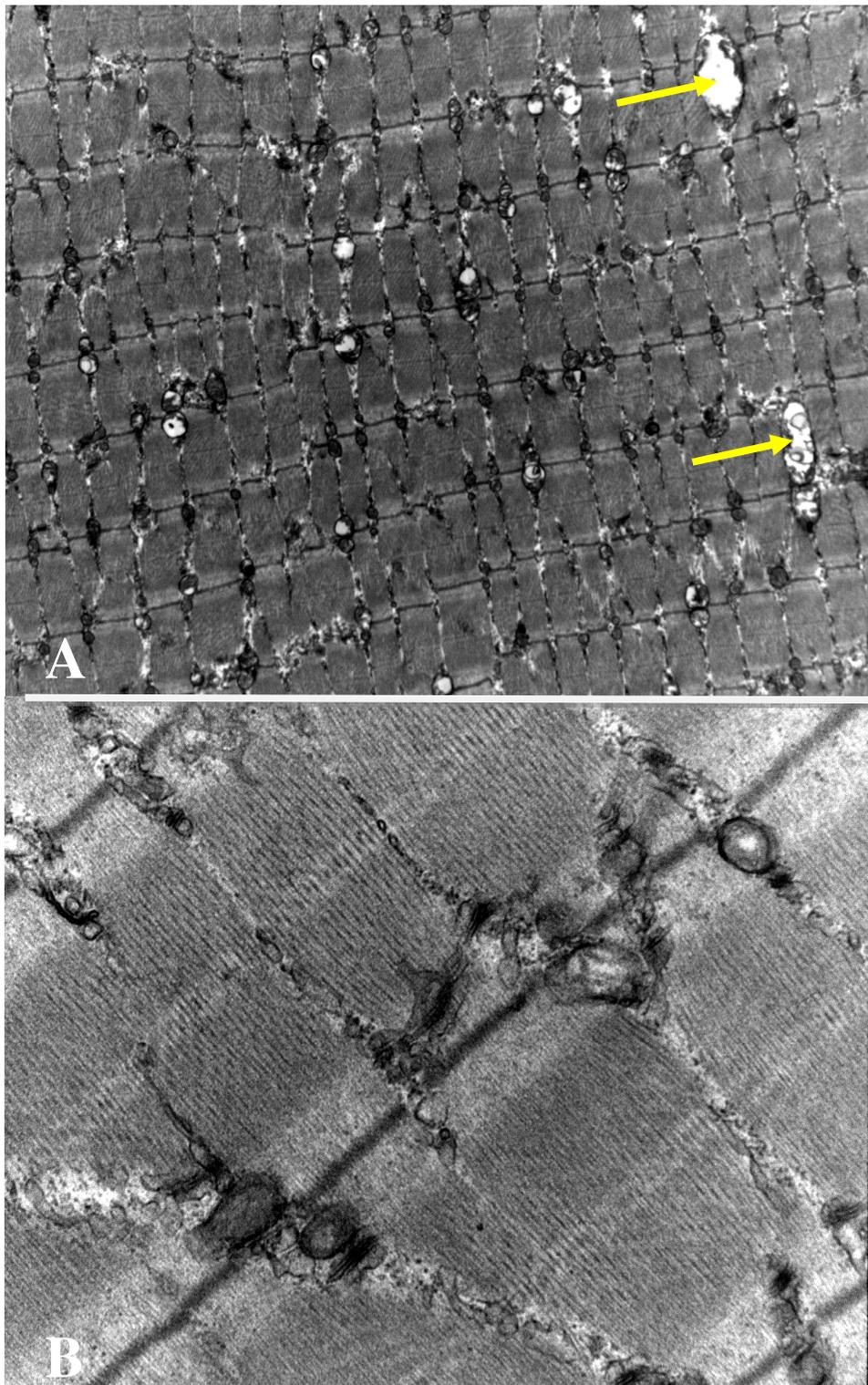


Figura 6.5 – A - Grupo Relaxante Muscular 14 dias - aspecto de normalidade, apenas com discreta presença de mitocôndrias com matriz clara (seta amarela) e vacúolos (14 dias, 4.4000 X). B - Grupo Relaxante Muscular 30 dias - mitocôndrias bem posicionadas, bilaterais às tríades e miofibrilas bem organizadas com aspecto de normalidade (20.000 X - UFPB-UFBA, 2008).

Para análise estatística dos resultados quanto à ocorrência e a severidade de injúria miofibrilar aplicou-se os testes Kruskal-Wallis e Mann Whitney, devido à apresentação não paramétrica dos dados semi-quantitativos (Tabela 6.3).

O teste Kruskal-Wallis demonstrou que a interação entre os grupos não foi significativa ($P= 0,251$). Os grupos estudados não apresentaram diferenças quanto ao grau de injúria intramuscular. Também não houve diferença estatística significativa entre os períodos de 14 e 30 dias de observação ($p=0,279$).

Tabela 6.3 – Médias, desvios padrões, medianas e quartis dos dados semi-quantitativos quanto ao grau de injúria muscular (UFPB-UFBA, 2008).

	n	Q1	Mediana	Q3
Controle 14	15	0,000	1,000	1,000
Desgaste 14	15	1,000	1,000	2,000
Laser 14	15	0,000	1,000	2,000
Dantrolene 14	15	0,000	1,000	1,000
Controle 30	15	0,000	0,000	1,000
Desgaste 30	15	0,000	1,000	2,000
Laser 30	15	0,000	1,000	1,000
Dantrolene 30	15	0,000	1,000	1,000

Entretanto, para um maior entendimento do estudo, os dados de todos os fatores principais e interações serão descritos a seguir. Quando se compara

os tratamentos entre si aos 14 dias observa-se que não houve diferença estatística entre eles ($p= 0,447$). Quando se compara os tratamentos aos 30 dias não houve diferença estatística entre eles ($p= 0,428$).

Quando comparados os períodos de observação dentro de cada grupo, ou seja, quando se compara o mesmo grupo aos 14 e 30 dias utilizando o teste Mann Whitney não há diferença estatisticamente significativa entre os dois períodos de observação em nenhum dos grupos.

6.2 ESPECTROSCOPIA DE RAMAN

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a concentração do fosfato de cálcio intramuscular por espectroscopia de Raman, foi realizada uma Análise de Variância (*One-way ANOVA*). Os resultados estão resumidos na tabela 6.4.

A análise de variância demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos ($P=0,259$).

De modo geral, os grupos estudados não apresentaram diferenças quanto à intensidade Raman do fosfato de cálcio no masseter, pois independente do tratamento, os valores nas condições estudadas são semelhantes entre si (Figura 6.6).

Tabela 6.4 - Médias e desvios-padrões da intensidade Raman do fosfato de cálcio intramuscular nos grupos avaliados (UFPB-UFBA, 2008).

PERÍODO	TRATAMENTO	CÁLCIO
GERAL	Controle (C)	0,35483 ± 0,0857
	Desgaste Oclusal (DE)	0,3827 ± 0,0520
	Laserterapia (L)	0,3433 ± 0,1059
	Relaxante Muscular (DA)	0,3530 ± 0,0634

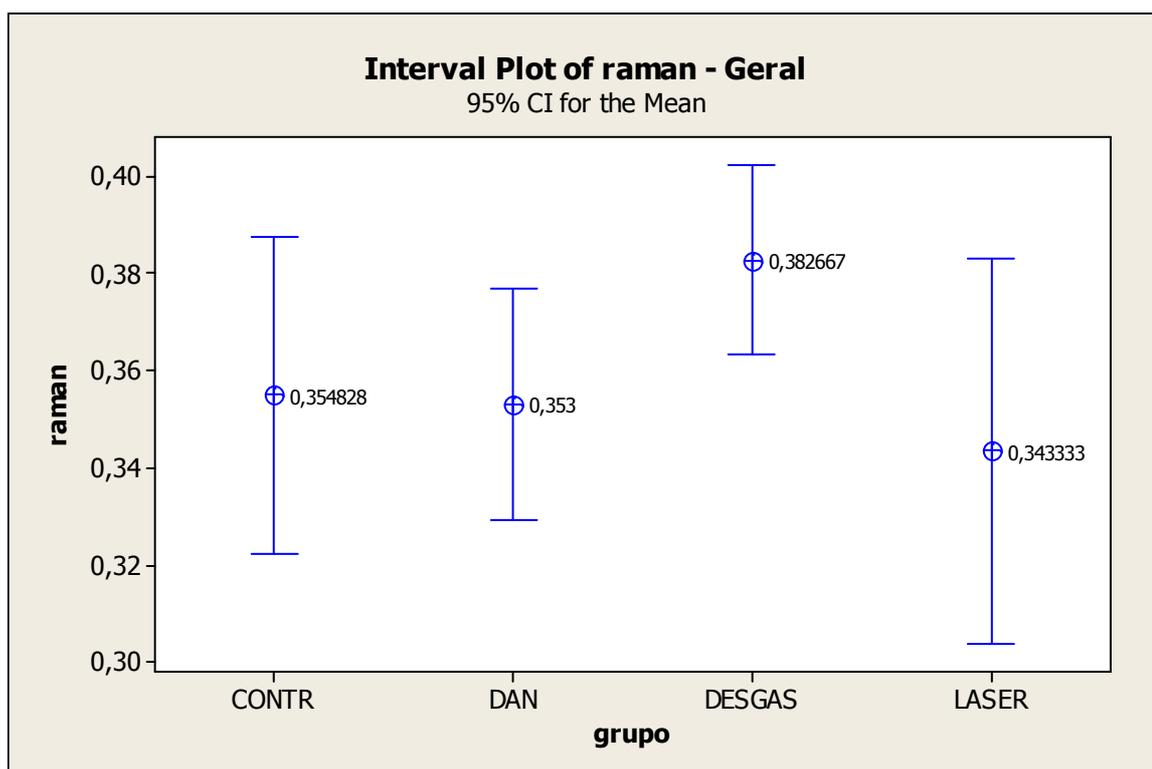


Figura 6.6– Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os quatro grupos avaliados (UFPB-UFBA, 2008).

Não houve diferença estatística significativa entre os períodos de 14 e 30 dias de observação ($p=0,137$). Independente do tratamento, as intensidades

Raman para fosfato de cálcio nas condições estudadas foram semelhantes entre si nos períodos observados.

Quando se compara os grupos entre si aos 14 dias não houve diferença estatística entre eles (Figura 6.7). Houve diferença estatística entre os grupos no período de 30 dias (Figura 6.8).

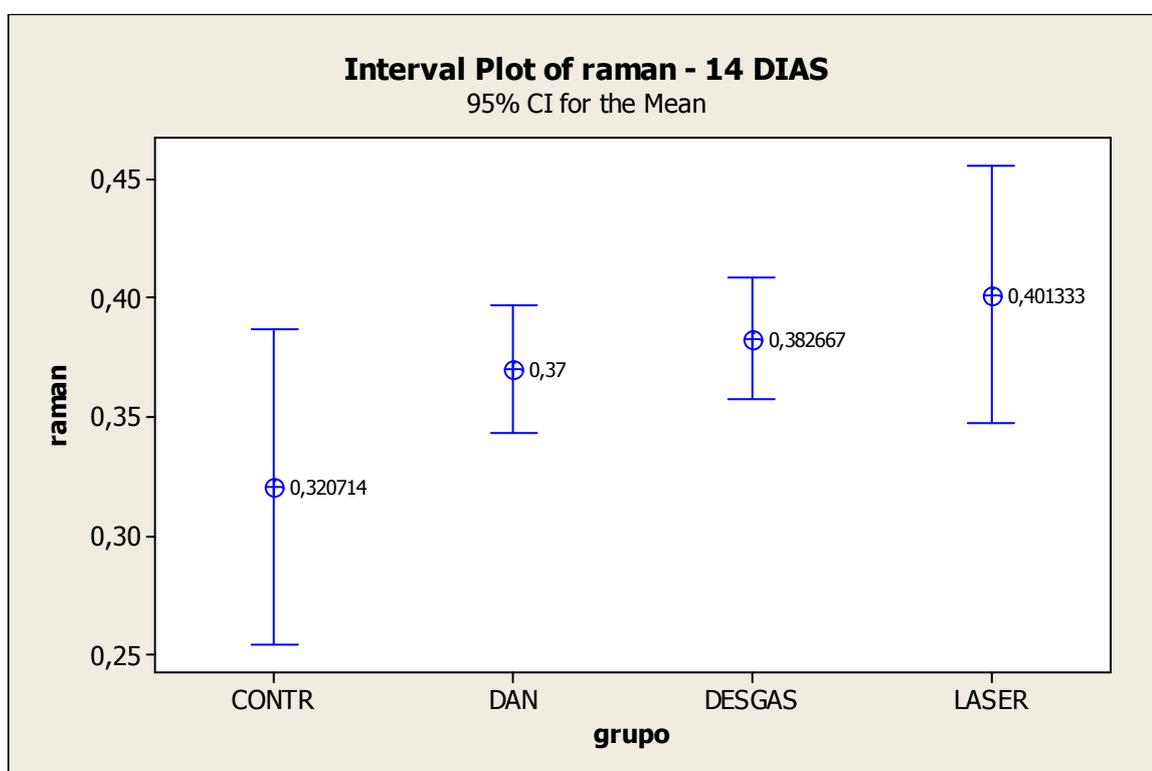


Figura 6.7 – Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os grupos avaliados no período experimental de 14 dias (UFPB-UFBA, 2008).

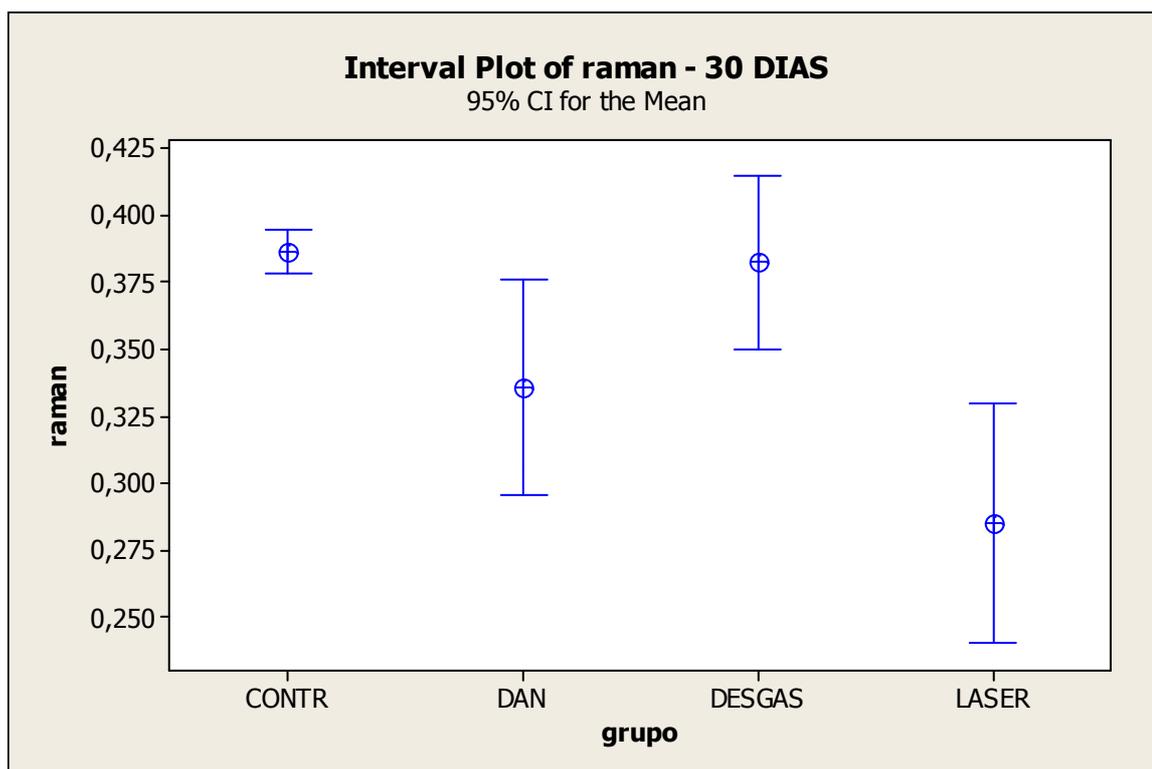


Figura 6.8 – Intensidade Raman do fosfato de cálcio para os quatro grupos avaliados no período experimental de 30 dias (UFPB-UFBA, 2008).

Quando os grupos do período experimental de 30 dias são comparados pelo *T Test*, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo desgaste oclusal 30 dias e laser 30 dias, sendo que nesse último houve menor intensidade do sinal Raman para o fosfato de cálcio presente no músculo (Tabela 6.5).

Tabela 6.5 – Médias e os desvios padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio nos grupos desgaste 30 dias e laser 30 dias (UFPB-UFBA, 2008).

	DESGASTE 30 DIAS	LASER 30 DIAS
Intensidade Raman	0,3827 ± 0,0591b	0,2853 ± 0,0811a

(*) Letras diferentes após as médias indica diferença estatística ($p < 0.05$).

Quando os grupos do período experimental de 30 dias são comparados pelo *T Test*, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle 30 dias e laser 30 dias, sendo que nesse último houve menor intensidade do sinal Raman para o fosfato de cálcio (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Médias e os desvios padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio nos grupos controle 30 dias e laser 30 dias (UFPB-UFBA, 2008).

	CONTROLE 30 DIAS	LASER 30 DIAS
Intensidade Raman	0,3867 ± 0,0150b	0,2853 ± 0,0811a

(*) Letras diferentes após as médias indica diferença estatística ($p < 0.05$).

No âmbito geral, não houve diferença estatística significativa entre os períodos de 14 e 30 dias de observação ($p=0,137$). Independente do grupo, os volumes de cálcio nas condições estudadas foram semelhantes entre si nos dois períodos observados (Figura 6.9).

No entanto, quando comparados os períodos de observação dentro de cada grupo, ou seja, quando se compara o mesmo tratamento aos 14 e 30 dias há diferença estatisticamente significativa no grupo laser, sendo que houve diminuição na intensidade Raman para o fosfato de cálcio no segundo período de observação (Tabela 6.7).

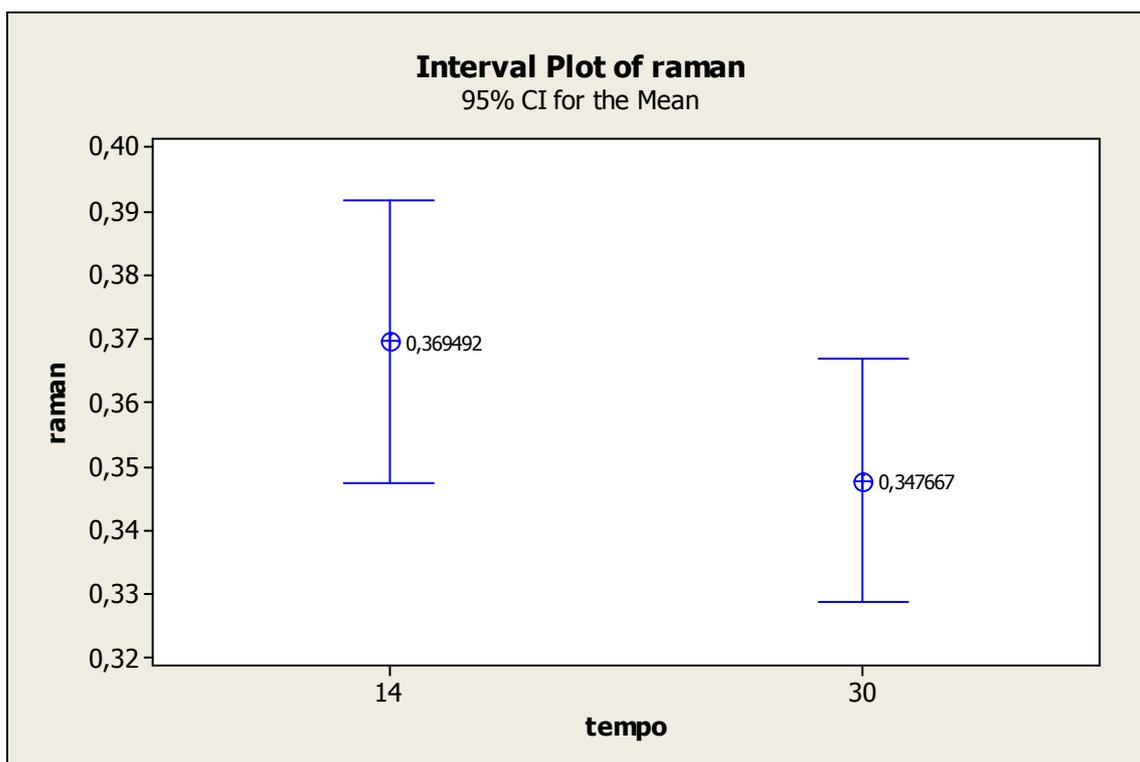


Figura 6.9 – Médias gerais do sinal Raman para o fosfato de cálcio nos diferentes períodos de observação (UFPB-UFBA, 2008).

Para o grupo laser, de acordo com a Tabela 6.7, foram encontradas diferenças estatísticas significante ($p=0,001$) entre os dois períodos de observação, sendo menor no segundo.

Tabela 6.7 – Médias e os desvios padrões para a intensidade Raman do fosfato de cálcio no grupo laser (UFPB-UFBA, 2008).

	14 DIAS	30 DIAS
LASER (L)	0,4013 ± 0,0972 a	0,2853 ± 0,0811b

(*) Letras diferentes após as médias indica diferença estatística ($p<0.05$).

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizou-se um modelo de desgaste dentário apenas em um lado das arcadas a fim de simular um distúrbio oclusal, quando o paciente tem perda ou desgaste unilateral das unidades dentárias posteriores. Desse modo, teríamos perda de estabilidade posterior do lado desgastado e sobrecarga mastigatória do lado contralateral, pois alguns autores (OLIVEIRA, 2002; PULLINGER *et al.*, 1988) afirmam que perda de estabilidade posterior é uma das condições oclusais de relevância na etiologia das DTM. Esse modelo animal já foi previamente utilizado por outros autores (BANI *et al.*, 1999; BANI; BERGAMINI, 2001; IYOMASA *et al.*, 2008b; NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2003) e resultou em um certo grau de modificação da morfologia e fisiologia dos músculos do sistema mastigatório, em particular o masseter.

Devido à dificuldade para determinar uma única etiologia para as DTM, principalmente as musculares, tem-se adotado uma postura conservadora para o tratamento dessa desordem, optando-se inicialmente por tratamentos reversíveis e não invasivos (DAWSON, 2008; MUNDT *et al.*, 2008; NAIKMASUR *et al.*, 2008; VAN SELMS *et al.*, 2008). Opções como fisioterapia (HOU *et al.*, 2002), aparelhos de estabilização oclusal (OLIVEIRA, 2002), farmacoterapia (BANI; BERGAMINI, 2001) e laserterapia (VENÂNCIO *et al.*, 2006; EMSHOFF *et al.*, 2008) surgem como alternativas válidas e eficazes descritas na literatura.

Neste estudo, comparou-se o efeito da farmacoterapia e da laserterapia como opção de tratamento para o músculo masseter sob a condição de perda de estabilidade oclusal posterior unilateral. No que se refere ao tratamento

farmacológico, foi utilizado o relaxante muscular Dantrolene já que esse medicamento é um potente inibidor da contração muscular (PIRES, 2005). No que se refere a laserterapia, o laser utilizado foi infravermelho de 830 nm, com 4 J/cm^2 , a cada 48 hs. Ao final de 14 dias, foram aplicados 28 J e aos 30 dias foram aplicados 56 J. Esse protocolo foi baseado em estudos clínicos (KATO *et al.*, 2006, KOGAWA *et al.*, 2005) que relatam resultados positivos quanto a utilização da laserterapia para tratamento de dor muscular em pacientes com DTM. Alguns autores (TUNER; HODE, 2004, TULLBERG *et al.*, 2003) relatam que doses altas podem levar a inibição dos efeitos fototerápicos, no entanto, a melhor dose para o tratamento da DTM dos músculos mastigatórios ainda não foi estabelecida. Por isso, no presente estudo foi utilizada uma dose que está no intervalo recomendado para tecidos não superficiais, no nosso caso o músculo masseter.

Seguiu-se o protocolo clínico com aplicações fracionadas, pois o efeito do laser é tardio e precisa de algumas sessões de aplicação para obtenção de maior benefício dessa fototerapia sobre tecido muscular. Alguns autores atestam a necessidade de tratamentos com intervalo mínimo de 24 horas entre cada sessão até a remissão da sintomatologia (TUNER; HODE, 2004).

De acordo com esses parâmetros e diante dos resultados encontrados pôde-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, desgates oclusal, laser e relaxante muscular tanto para microscopia eletrônica e espectroscopia Raman, no âmbito geral. Por esse motivo, as conclusões serão feitas a partir dos fatores isolados.

1- MICROSCOPIA ELETRÔNICA TRANSMISSÃO

Há relatos sobre mudanças ultra-estruturais nos feixes neuromusculares, no músculo masseter (BANI; BERGAMINI, 2001; BANI; BERGAMINI, 2002, IYONOMASA *et al.*, 2008b; SANTIWONG *et al.*, 2002;) e pterigóideo (BAZAN *et al.*, 2008; IYONOMASA *et al.*, 2008a) quando da perda de estabilidade posterior. Embora os resultados estatísticos do nosso estudo não puderam confirmar esses dados, o estudo descritivo da ultra-morfologia está de acordo com a literatura, que mostra que as fibras musculares aqui estudadas são sensíveis às cargas mastigatórias alteradas, indicando que os estudos no nível ultra-estrutural podem contribuir para a compreensão do mecanismo com o qual os músculos do sistema mastigatório se adaptam às diferentes cargas.

A análise ultra-estrutural do grupo controle nos dois períodos experimentais mostrou baixa incidência de lesão ultra-estrutural, sendo em sua maioria injúrias leves. Apesar de não ter havido desgaste dentário nesse grupo, a presença de injúrias leves pode ser justificada pelo próprio processo de manejo e manipulação dos animais, que pode induzir a estresse com resposta muscular e até mesmo pelo processamento para microscopia eletrônica, que pode gerar diferença osmótica capaz de ocasionar injúrias musculares leves (ROTH *et al.*, 2000; SEWRY, 2002). A presença de injúria moderada ou severa foi pontual e não representou uma realidade para esse grupo (Fig. 6.2). O aspecto de normalidade foi adotado de acordo com a morfologia do grupo controle.

A análise sub-celular do grupo desgaste oclusal, de um modo geral, mostrou lesão ultra-estrutural nos dois períodos experimentais. Injúria moderada e severa representou uma realidade para esse grupo (Fig. 6.3). Mitocôndrias edemaciadas, com perda de cristas, e matriz clara; hiper-contracção da banda I, miofibrilas desorganizadas e presença de numerosos vacúolos foram os sinais de injúria intramuscular encontrados. O grupo desgaste oclusal foi o grupo experimental que mais apresentou esses sinais de injúria, caracterizando a perda de estabilidade posterior como uma possível etiologia para os danos musculares como sugerem alguns autores (BANI; BERGAMINI, 2002; BAZAN *et al.*, 2008; IYONOMASA *et al.*, 2008b; SANTIWONG *et al.*, 2002).

Quanto há falta de contato oclusal posterior, alguns autores (GREMILLION, 2006; OLIVEIRA, 2002, PULLIGER *et al.*, 1993) acreditam que ocorra um esforço muscular demasiado para equilibrar a posição e inclinação mandibular do lado sem contato dentário, e conseqüentemente fadiga, hiper-contracção e encurtamento das fibras musculares. Esses danos seriam potencializados com o decorrer das funções mastigatórias e com o uso diário dessa musculatura de forma anormal (IYOMASA *et al.*, 2008a).

No entanto, apesar dessas características, nosso trabalho não apresentou diferença significativa entre os grupos de uma forma geral. Inversamente, os trabalhos de Bani *et al.*, em 1999, e Bani e Bergamini, em 2001, encontraram diferença estatística entre o grupo controle e o grupo desgaste em dois períodos de observação, aos 14 e 26 dias, em que houve maior dano muscular no segundo período. Essa diferença entre os resultados dos dois estudos pode ser em decorrência da avaliação semi-quantitativa da

prevalência e severidade da injúria nas fibras musculares, já que no presente trabalho houveram quatro categorias de injúria e nos trabalhos citados apenas três. O maior número de escores possíveis nesse trabalho podem ter diminuído a probabilidade estatística, enquanto nos outros estudos ocorreu situação inversa.

Houve uma tendência geral à diminuição do grau de injúria aos 30 dias de observação, mesmo que não tenha sido estatisticamente significativa, isto pode ser explicado porque o estresse a que o animal é submetido foi maior no início do tratamento, quando foram submetidos ao desgaste oclusal. Possivelmente, com o passar do tempo o estresse diminui e conseqüentemente o grau de injúria e dano muscular. Provavelmente, por isso não houve diferença entre o grupo desgaste oclusal 30 dias e qualquer dos grupos controles.

Outra hipótese é a de que possa ter ocorrido uma adaptação fisiológica dos músculos devido à nova configuração oclusal, o que se denomina emgrama. A expressão Engrama sensorial é freqüentemente empregada na descrição de memória de diferentes experiências sensoriais. O engrama sensorial ativa os componentes motores do cérebro e controla o padrão de atividades estabelecido. O engrama motor descreve um grupo de comandos pré-estruturados que, quando iniciados, resultam na produção de uma seqüência motora coordenada, produzindo-se um movimento mandibular que evitará contatos prematuros, ou novas posições de parada cêntrica, conduzindo a mandíbula por um novo arco de fechamento. (ASH; RAMJFORD, 1996; SULLIVAN; SCHMITZ, 1993).

Para o grupo laser, os dados da avaliação ultra-estrutural apresentaram músculos com discreta alteração morfológica, já que 20% campos obtiveram grau de injúria 2 e 3, representando injúrias moderadas e severas, respectivamente. Também não foi significativa a diferença de escores entre os dois períodos experimentais desse grupo, porém não houve injúria severa aos 30 dias e apenas dois campos tiveram escore dois, enquanto aos 14 dias observou-se um campo com injúria severa e três campos com injúria moderada. Esses dados estão em acordo com a tendência geral nesse estudo de diminuição das injúrias com o passar do tempo. Diante da literatura revisada (AMARAL; SALVINI, 2001; COSTARDI *et al.*, 2008; FARIAS, 2005; FRARE; NICOLAU, 2008; SHINOZAKI *et al.*, 2006) e dos resultados obtidos, sugere-se que a laserterapia tenha apresentado um leve efeito benéfico na morfologia do tecido muscular, quando comparamos com a morfologia do grupo desgaste oclusal.

O grupo relaxante muscular apresentou músculos com discreta alteração morfológica, muito semelhante à característica geral do grupo controle. Apenas 10% dos campos observados obtiveram grau de injúria 2 e 3. A ação do relaxante muscular parece ter sido efetiva em impedir a injúria intramuscular provocada pelo desgaste oclusal, pois 40 % dos campos não apresentou qualquer sinal de injúria, ou escore zero e 50 % dos campos apresentaram injúria discreta.

Na pesquisa de Bani e Bergamini (2001), houve diferença estatística entre o grupo desgaste oclusal e o grupo com relaxante muscular. As características ultra-estruturais das fibras musculares do grupo controle no estudo desses autores foram parecidas com o nosso estudo, em sua maioria,

apresentaram padrão de normalidade das organelas celulares, cristas mitocondriais com aparência normal e miofibrilas com as bandas bem definidas. Apenas, ocasionalmente, encontraram-se mitocôndrias levemente edemaciadas.

Essa diferença de resultados entre os dois estudos pode ser em decorrência da diferença de concentração do dantrolene. No presente estudo utilizou-se a dose clínica inicial recomendada para hipertemia maligna (FREE; JAIMON, 1978; KRAUSE *et al.*, 2004; PIRES, 2005) de 2,5 mg/kg intraperitoneal, enquanto na pesquisa de Bani e Bergamini (2001) foi utilizado 10 mg/kg. Esse medicamento não é usualmente utilizado para DTM, portanto não há uma dose pré estabelecida para essa finalidade. No entanto, as características ultra-estruturais do masseter nesse estudo e na pesquisa de Bani e Bergamini (2001) sugerem que esse medicamento pode ser um novo instrumento nas terapias de DTM.

2- ESPECTOMETRIA DE RAMAN

Tem sido sugerido por diversos autores (BELL, 1991; GUEDES *et al.*, 2003; RODRIGUES; FERREIRA, 2003; OKANO *et al.*, 2007) que a má-oclusão pode contribuir para o mal funcionamento dos músculos da mastigação gerando sobrecarga e fadiga muscular, que estão associadas a homeostasia de cálcio no RS (MOREIRA *et al.*, 2008; TRAVELL; SIMON, 1981). Os métodos tradicionalmente empregados para a análise morfométrica de processos degenerativos teciduais fornecem somente uma visão qualitativa destes processos, não sendo possível quantificar as alterações ultra-estruturais e

moleculares dos tecidos sob análise (HANLON *et al.*, 2000). A espectroscopia de Raman é capaz de revelar detalhes de composição e de estrutura em organismos vivos, visto que alterações moleculares podem ser detectadas (SILVA, 2005; SOUZA *et al.*, 2003). Diante disso, a espectroscopia Raman pode ser um instrumento útil para avaliação e mensuração de metabólitos na fadiga muscular.

Existem evidências sugerindo que a fadiga pode ocorrer devido à retenção de cálcio no interior do retículo sarcoplasmático, o que reduziria a quantidade de cálcio disponível para a contração muscular (MOREIRA *et al.*, 2008). A diminuição da utilização de cálcio pode ser responsável pela dificuldade no relaxamento, bem como, pela redução da força durante a fadiga muscular (LEES *et al.*, 2001; LEPPIK *et al.*, 2004).

A energia para o processo de contração e relaxamento vem do gasto de ATP e creatina fosfato. Os produtos da hidrólise do ATP (ADP, AMP e Pi) e da creatina fosfato (creatina + Pi), hipoteticamente são inibidores dos processos de contração muscular e podem registrar um aumento considerável durante a fadiga (POWERS; HOWLEY, 2000; RASSIER; MACINTOSH, 2000; ROSSI *et al.*, 2004; WILMORE e COSTILL, 2001).

O fosfato inorgânico (Pi), que aumenta substancialmente durante a fadiga, pode entrar no retículo sarcoplasmático e combinar-se com o cálcio formando um precipitado insolúvel de fosfato de cálcio (CaPi). Esse precipitado reduz a disponibilidade e a liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático e conseqüentemente diminui o desempenho do músculo (ALLEN; WESTERBLAD, 2001; FRYER *et al.*, 1995).

A solubilidade do fosfato de cálcio é de 6 mM, portanto se o volume de CaPi atingir essa concentração, provavelmente irá precipitar. (ALLEN *et al.*, 2008; FRYER *et al.*, 1995). Para mensurar e comparar tais diferenças de concentração em animais que foram submetidos a condições experimentais se faz necessário um método capaz de detectar com precisão qualquer diferença de concentração desse composto. Nesse estudo, a variação da intensidade Raman para CaPi foi utilizada para mensurar indiretamente o grau de fadiga muscular.

Os resultados do nosso estudo, não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados no âmbito geral, nem mesmo entre os grupos aos 14 dias, contudo aos trinta dias de observação houve diferença significativa entre os grupos.

O grupo laser 30 dias mostrou menor intensidade Raman do que os grupos controle 30 dias e desgaste oclusal 30 dias. O grupo laser mostrou, ainda, diferenças entre o período experimental de 14 e 30 dias, sendo menor a intensidade Raman no segundo período experimental. Aparentemente, o tratamento com laser diminui a precipitação de fosfato de cálcio apenas no segundo período, o que sugere que esse tratamento foi capaz de gerar algum tipo de ação protetora na fibra muscular, no entanto, foram necessárias várias sessões de laserterapia para se atingir uma dose terapêutica.

Os grupos controle e desgaste oclusal tiveram resultados semelhantes quanto a intensidade Raman, o que pode sugerir que não houve relação entre o desgaste oclusal unilateral e fadiga muscular como etiologia das disfunções musculares, ou pelo menos no acúmulo de fosfato de cálcio no retículo sarcoplasmático.

Quanto ao grupo relaxante muscular, apresentou características semelhantes ao grupo controle, porém essas características não foram estatisticamente diferentes dos outros grupos, principalmente do grupo desgaste oclusal, o qual representou nesse estudo o controle negativo. Assim, não pudemos concluir a real função do relaxante muscular sobre o músculo masseter em ratos submetidos a desgaste oclusal unilateral.

De acordo com a ação do dantrolene, as fibras musculares têm menos contração e, portanto, menor gasto de ATP e creatina fosfato. No entanto, o dantrolene sódico é um relaxante muscular que inibe a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático durante o acoplamento excitação-contração, mantendo alta concentração desse íon nessa organela (FRUEN *et al.*, 1997; PEREZ, 1993). Desse modo, poder-se-ia pensar que a maior concentração do cálcio aumentaria a possibilidade de união ao fosfato inorgânico para formação do fosfato de cálcio. Entretanto, não é a concentração de cálcio que facilita a essa união, mas a concentração de Pi, pois para haver formação desse precipitado tem que haver uma concentração maior que 6mM de Pi (ALLEN; WESTERBLAD, 2001, FRYER *et al.*, 1995).

Mesmo que não tenha sido estatisticamente significativo, esse fato explicaria porque houve diminuição do deslocamento Raman aos 30 dias no grupo relaxante muscular, pois apesar de aumentar o volume de cálcio no RS, deve ter havido menor gasto de energia e menor disponibilidade de Pi.

Não há relatos na literatura que descrevam a ação do laser de baixa potência sobre o acúmulo de fosfato de cálcio em músculos esqueléticos, nem mesmo a sua mensuração por espectroscopia de Raman. Por isso, os resultados desse estudo foram relacionados a artigos que discutam e

apresentem dados sobre a aplicação do laser sobre a fadiga muscular de uma forma geral.

Alguns autores (COSTARDI *et al.*, 2008; FARIAS, 2005; LOPES-MARTINS, 2006) relataram efeitos benéficos do laser sobre a fadiga e sobre os mecanismos de injúria muscular. Dentre os efeitos esperados da laserterapia encontram-se o relaxamento das fibras musculares, determinado pelo aumento da microcirculação local, restabelecimento do equilíbrio iônico Na-K das células e combate à dor por produção de maior quantidade de β -endorfina (GENOVESE, 2007).

O tratamento com laser de GaAIs (630-680 nm), GaAs (830, 904,790) parece diminuir o processo de fadiga muscular, após contração tetânica em músculos estimulados eletricamente (LEAL JUNIOR, *et al.*, 2008a, LEAL JUNIOR, *et al.*, 2008b).

Leal Junior *et al.*, em 2008a, sugerem claramente que mais estudos sobre dose e comprimento de onda necessitam ser desenvolvidos, pois os resultados de seu estudo com laser infravermelho (830 nm) são ligeiramente mais pobres do que os resultados observados em seu estudo precedente (2008b) com laser vermelho (655nm). No entanto, os mesmos autores apresentam vários estudos (SHINOZAKI *et al.*, 2006; KATO *et al.*, 2006, KOGAWA *et al.*, 2005) com laser infravermelho aplicado em humanos e que atestam a eficácia do laser para tratamento de injúrias em tecido muscular.

Por outro lado, diversos autores não conseguiram mostrar mudanças morfológicas significativas no músculo fatigado (AMARAL *et al.* 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1999); no início da fadiga muscular, quando avaliada em testes com exercício físico (GORGEY *et al.*, 2008); nem mesmo na micro-

circulação vascular em masseteres de pacientes com DTM (Tullberg et al., 2003).

No nosso estudo houve ação efetiva do laser em diminuir a concentração de fosfato de cálcio com o uso prolongado. No entanto não foi possível concluir que o laser demonstrou ação terapêutica, já que no âmbito geral, o grupo laser foi semelhante ao grupo desgaste oclusal e este foi semelhante ao grupo controle.

Por fim, os resultados do presente estudo sugerem que não há uma relação de causa e efeito, entre desgaste oclusal unilateral e o aparecimento de alterações morfológicas nas fibras musculares (CARLSSON *et al.*, 2003; GESH *et al.*, 2004; GESH *et al.*, 2005, ISSA *et al.*, 2006; MAGNUSSON *et al.*, 2005). Em relação à laserterapia e a farmacoterapia, os resultados desse estudo foram discretamente eficazes como terapia para o músculo masseter nos parâmetros utilizados (EMSHOFF *et al.*, 2008; KULEKCIOGLU *et al.*, 2003; MAZZETTO *et al.*, 2007; MCNEELY *et al.*, 2006; TULLBERG *et al.*, 2003).

Estudos mais amplos e profundos serão necessários para esclarecer o comportamento muscular do sistema mastigatório frente a alterações oclusais, para tanto se pode utilizar a espectroscopia Raman para avaliação de outras substâncias que possam aferir a fadiga, tais como ATP, creatina fosfato, e outras. Não obstante em nosso trabalho, observamos que houve ação moderada do laser e do dantrolene como agentes terapêuticos. Sem embargo, necessitamos uma maior amostragem e mais estudos, a fim de esclarecer a eficácia dessas terapias sobre o tecido muscular.

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Quanto ao grau de injúria muscular, verificou-se ausência de significancia estatística entre os grupos experimentais, embora os grupos controle, laser e relaxante muscular apresentaram menos ocorrência de injúria muscular do que o grupo desgaste oclusal.
- Quanto à intensidade raman para o precipitado de fosfato de cálcio, não houve diferença estatística significativa entre os grupo experimentais, após 14 dias.
- Quanto à intensidade raman para o precipitado de fosfato de cálcio, houve diferença estatística significativa entre os grupo experimentais, após 30 dias.
- O grupo laser 30 dias mostrou menor intensidade Raman do que os grupos controle 30 dias e desgaste oclusal 30 dias.
- O grupo laser 30 dias mostrou menor intensidade Raman do que o grupo laser 14 dias.

9 REFERÊNCIAS

ALENCAR JUNIOR, F.G.P.; RIBEIRO, C., GUIMARÃES, M.R. Avaliação longitudinal de pacientes com disfunções têmporomandibulares tratados com placa oclusais, aconselhamento e farmacoterapia. **Robrac**, v.15, n.40, p.63-9, 2006.

ALLEN, D.; LÄNNERGREN, J.; WESTERBLAD, H. Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. **Experim Physiol** v.80, p.497-527, 1995.

ALLEN, D.G.; LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Impaired calcium release during fatigue. **J Appl Physiol**, v.104, p.296-305, 2008a.

ALLEN, D.G.; LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. **Physiol Rev**, v.8, p. 287–332, 2008b.

ALLEN, D.G.; WESTERBLAD, J. A. L. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. **J Physiol** v.536, p.657-65, 2001.

AMARAL, A.C.; SALVINI, T. Dose-dependency of low energy HeNe laser effect in regeneration on skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**, v.16, p.44-51, 2001.

ASH, M .M; RAMFJORD, S. **Oclusão**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 472p, 1996.

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, p.1735-1744, 1999.

BANI, D.; BERGAMINI, L. Dantrolene counteracts the masseter muscle damage induced by artificial occlusal wear: studies in rat model. **J Dent Res**, v. 80, n.11, p.1990-1994, 2001.

BANI, D., BERGAMINI, M., Ultrastructural abnormalities of muscle spindles in the rat masseter muscle with malocclusion-induced damage. **Histol Histopathol**, v.17, p.45–54, 2002.

BANI, D.; MASINI, E.; BELLO, M.G.; BIGAZZI, M.; SACCHI, T.B. Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. **Am J Pathol**, v.152, n.5, p.1367-76, 1998.

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, p.536–543, 2008.

BELL, W.E. **Dores Orofaciais:** classificação, diagnóstico, tratamento. Tradução por Wilma Simões Gomes. Rio de Janeiro: Quintessence Books, 230p, 1991.

BOHR, T. Problems with myofascial pain syndrome and fibromyalgia syndrome. **Neurology**, v.46, p.593-597, 1996.

CARLSSON, G.E.; EGERMARK, I.; MAGNUSSON, T. Predictors of bruxism, other oral parafunctions and tooth wear over a 20-year follow-up period. **J Orofac Pain**, v.17, n.1, p.50-57, 2003.

COSTARDI, C.H.Z; TAMACHIRO, C.; ESTEVES JÚNIOR, I.; GOMES, A.C. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. **Fisioter Mov**, v.21, n.2, p.21-30, 2008.

DAWSON, P.E. **Oclusão Funcional** : da ATM ao desenho do sorriso. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos, 208, 650 p, 2008.

DUARTE, V.I; DIAS, D.D.; MELO H.C.S. Mecanismos moleculares da fadiga. **Braz J of Biomotricity**, v. 2, p. 3-38, mar. 2008.

EMSHOFF, R.; BÖSCH, R.; PÜMPPEL, E.; SCHÖNING, H.; STROBL, H. Low-level laser therapy for treatment of temporomandibular joint pain: a double-blind and placebo-controlled trial. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.105, p.452-456, 2008.

FARIAS, V.H.A. **Análise da ação do Laser de Baixa Potência em pacientes com Dor Muscular portadores de Desordens Temporomandibulares empregando a Eletromiografia.** 2005. 167F. Dissertação de Mestrado. Universidade Valse do Paraíba, São José dos Campos, 200pi5.

FRARE, J.C.; NICOLAU, R.A. Análise clínica do efeito da fotobiomodulação laser (GaAs – 904 nm) sobre a disfunção temporomandibular. **Rev Bras Fisioter**, v.12, n.1, p.37-42, jan/fev. 2008.

FREE CW, JAIMON MPC. Pre-anaesthetic administration of dantrolene sodium to a patient at risk from malignant hyperthermia: case report. **N Zeal Med J**, v. 88, p. 493-494, 1978.

FRICTON, J. Current evidence providing clarity in management of temporomandibular disorders: summary of a systematic review of randomized clinical trials for intra-oral appliances and occlusal therapies. **J Evid Base Dent Pract**, v.6, p.48-52, 2006

FRUEN, B.R.; MICKELSON, JR.; LOUIS, C.F. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. **J Biol Chemistry**, v. 271, p.26965- 26971, 1997.

FRYER, M. W.; OWEN, V. J.; LAMB, G. D.; STEPHENSON, D. G. Effects of creatine phosphate and P(i) on Ca²⁺ movements and tension development in ratskinned skeletal muscle fibres. **J Physiol**. v. 482, n. 1, p. 123-140, 1995.

GAM, A.N.; THORSEN, H.; LONNBERG, F. The effect of low-level laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. **Pain**. v.52, n.1, p.63-66, 1993.

GENOVESE, W.J., **Aplicações clínicas: laser de baixa intensidade (LBI)**. Laser de baixa intensidade - Aplicações terapêuticas em odontologia, São Paulo:Livraria Santos Editora LTDA, cap.7, p.85 e 86, 2007.

GESH, D.; BERNHARDT, O.; MACK, F.; JOHN, U.; KOCHER, T.; ALTE, D. Association of Malocclusion and Functional Occlusion with Subjective Symptoms of TMD in Adults: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Angle Orthod**, v.75, p.183–190, 2005.

GESH, D.; BERNHARDT, O.; MACK, F.; JOHN, U.; KOCHER, T.; HENSEL, E.; ALTE, D. Association of Malocclusion and Functional Occlusion With Signs of Temporomandibular Disorders in Adults: Results of the Population-based Study of Health in Pomerania. **Angle Orthod**, v.74, p. 512–520, 2004.

GORGEY, A.S.; WADEE, A.N.; SOBHI, N.N. The effect of low-level therapy on electrically induced muscle fatigue: a pilot study. **Photomed Laser Surg**, v.26, n.5, p.501-6, 2008.

GREMILLION, H.A. The Relationship Between Occlusion and TMD: An Evidence-Based Discussion. **J Evid Base Dent Pract**, v.6, p.43-47, 2006.

GUEDES, Z.C.F.; YI, L.C.; VIEIRA, M.M. Relação da postura corporal com a disfunção temporomandibular: hiperatividade dos músculos da mastigação. **Fisioterapia Brasil**, v.4, n.5, p.341-347, set/out. 2003.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2006, 1115 p.

HANLON, E. B.; MANOHARAN, R.; KOO, T-W.; SHAFER, K. E.; MOTZ, J. T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J. R.; ITZAKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Topical Review: Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, n. 45, p. R1-R59, 2000.

HAUTIER, C. A.; BELLI, A.; LACOUR, J-R A method for assessing muscle fatigue during sprint exercise in humans using a friction-loaded cycle ergometer. **Eur J Appl Physiol**, n.12, p. 231-235, 1998.

HERSH, E.V., BALASUBRAMANIAM, R., PINTO, A. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v.20, n.2, p.197-210, may. 2008.

HERZOG, W.; LEONARD, T. R.; JOUMAA, V.; MEHTA, A. Mysteries of Muscle Contraction. **Journal of Applied Biomechanics**, v.28, p.1-3, 2008.

HONG, C.Z.; SIMONS, D.G. Pathophysiologic and electrophysiologic mechanisms of myofascial trigger points. **Arch Phys Med Rehabil**, v.79, p.863-72, 1998.

HOU, C.R.; TSAI, L.C.; CHENG, K.F.; CHUNG, K.C.; HONG, C.Z. Immediate effects of various physical therapeutic modalities on cervical myofascial pain and trigger-point sensitivity. **Arch Phys Med Rehabil**, v.83, p. 1406-14, 2002.

ISSA, J.P., VITTI, M., DA SILVA, A.M., SEMPRINI, M., REGALO, S.C. Electromyographical analysis of the masseter muscle in dentulous and partially toothless patients with temporomandibular joint disorders. **Electromyogr Clin Neurophysiol**, v.46, n. 5, p.263-8, 2006.

IYOMASA, M.M., ISSA, J.P., OLIVEIRA, F., STUANI, M.B., DE OLIVEIRA, A.M., WATANABE, I. Morphological and histological effects on the medial pterygoid muscle after unilateral exodontia in gerbils. **Micron**, v.39, p.785–790, 2008.

IYOMASA, M.M.; ISSA, J.P.M.; SIÉSSERE, S.; REGALO, S.C.H; WATANABE, I. Effect of unilateral extraction of molar teeth on suprahyoid muscles: Macroscopic and ultrastructural aspects. **Micron**, v.39, p.1111-18, 2008.

JOHN, M.T. Temporomandibular Disorders -Still Controversies? **J Evid Base Dent Pract**, v.6, p. 42, 2006.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low level laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics**, QE-23, v.10, p.1703-17, 1987.

KATO, M.Y.; KOGAWA, E.M.; SANTOS, C.N.; CONTI, P.C.R. Tens and low-level laser therapy in the Management of temporomandibular disorders. **J Appl Oral Sci**, v.14, n.2, p.130-5, 2006.

KOGAWA, E.M.; KATO, M.Y.; SANTOS, C.N.; CONTI, P.C.R.. Evaluation of the efficacy of low-level laser therapy (lllt) and the microelectric neurostimulation (mens) in the treatment of myogenic temporomandibular disorders: a randomized clinical trial. **J Appl Oral Sci**, v.13, p. 280-5, 2005.

KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M. U.; FIEGE, M.; WEIBHORN, R.; WAPPLER, F. Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. **Anaesthesia**, v. 59, p. 364–373, 2004.

KULEKCIOGLU, S.; SIVRIOGLU, K.; OZCAN, O.; PARLAK, M. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. **Scand J Rheumatol**, v.32, p.114-8, 2003.

LEAL JUNIOR, E.C., LOPES-MARTINS, R.A., DALAN, F., FERRARI, M., SBABO, F.M., GENEROSI, R.A., BARONI, B.M., PENNA, S.C., IVERSEN, V.V., BJORDAL, J.M., Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 5, p. 419-24, oct. 2008.

LEAL JUNIOR, E.C., LOPES-MARTINS, R.A., VANIN, A.A., BARONI, B.M., GROSSELLI, D., DE MARCHI, T., IVERSEN, V.V., BJORDAL, J.M. Effect of 830nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Laser Med Sci**, jul. 2008.

LEES, S.J. et al. Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. **J. Appl. Physiol.**, v.9, p.1638-1644, 2001.

LEITÃO, F.B.P.; CANÇADO, T.O.B. Hipertermia maligna. **Rev Bras Anesthesiol**, v.46, n.4, p. 302-312, 1996.

LEPERS, R.; MAFFIULETTI, N. A.; ROCHETTE, L.; BRUGNIAUX, J.; MILLET, G. Y. Neuromuscular fatigue during a long-duration cycling exercise. **J Appl Physiol**, n.92, p.1487-1493, 2002.

LEPPIK, J. A.; AUGHEY, R. J.; MEDVED, I.; FAIRWEATHER, I.; CAREY, M. F.; MCKENNA, M. J. Prolonged exercise to fatigue in humans impairs skeletal muscle Na⁺-K⁺-ATPase activity, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release, and Ca²⁺ uptake. **Appl Physiol**. v. 97, n. 4, p. 1414-23, 2004.

LOPES-MARTINS, R.A.B.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANT JR, A.C.; MUSCARA M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol**, v.101, p.283–288, 2006.

MAGNUSSON, T., EGERMARK, I., CARLSSON, G.E. A prospective investigation over two decades on signs and symptoms of temporomandibular disorders and associated variables. A final summary. **Acta Odontol Scand**, v. 63, n.2, p.99-109, 2005.

MAZZETTO, M. O., CARRASCO, T. G., BIDINELO, E. F., PIZZO, R. C. A., MAZZETTO, R. G. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: A phase I double-blind study. **J Craniomand Pratic**, v. 25, n.3, p.186-192, jul. 2007.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

MCNEELY M.L.; OLIVO S.A.; MAGEE D.J. A systematic review of the effectiveness of physical therapy interventions for temporomandibular disorders. **Phys Ther**, v.86, n.5, p.710-25, 2006.

MENDONÇA NETO, T. Avaliação da magnitude das interferências oclusais e sua relação com os sinais clínicos de trauma oclusal e sinais e sintomas de distúrbios temporomandibulares. 2003. 94 f. Dissertação. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

MOREIRA, P.V.S.; TEODORO B.G.; MAGALHÃES NETO A.M. bases neurais e metabólicas da fadiga durante o exercício. **Biosci J**, v.24, n.1, p.81-90, jan/mar. 2008.

MUNDT, T.; MACK, F.; SCHWAHN, C.; BERNHARDT, O.; KOCHER, T.; BIFFAR R. Association between socio demographic, behavioral and medical conditions and signs of temporomandibular disorders across gender: results of the study of health in Pomerania. **Int J Prosthodont**, v.21, n.2, p. 141-8, 2008.

NAIKMASUR, V., BHARGAVA, P., GUTTAL, K., BURDE, K. Soft occlusal splint therapy in the management of myofascial pain dysfunction syndrome: A follow-up study. **Indian J Dent Res**, v.19, n.3, 2008.

NOGUEIRA-FILHO, G.R.; FRÓES NETO, E.B.; CASATI, M.Z.; REIS, S.R.; TUNES, R.S.; TUNES, U.R.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. JR; SALLUM, A.W. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. **J Periodontol**, v.75, p.348-52, 2004.

OKANO, N.; BABA, K.; IGARASHI, Y. Influence of altered occlusal guidance on masticatory muscle activity during clenching. **J of Oral Rehab** v. 34, p. 679–684, 2007

OLIVEIRA, W. **Distúrbios Temporomandibulares**; 1ª ed. artes médicas; p.1-447, 2002.

PAIVA, H.J.; QUEIROZ, A.C.G.; VIEIRA, A.M.F. Estudo comparativo do tratamento da disfunção craniomandibular. **RGO**, v.42, n.1, p.51-4, jan/fev. 1994.

PIRES, O. Aspectos farmacológicos do Dantrolene Sódico. **Rev Neurociências**, v.13, n.3 (supl-versão eletrônica), p.79-87, jul/set. 2005.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício** – Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3 ed. Barueri: Manole, 2000.

PULLINGER, A.G.; SELIGMAN, D.A.; GORNBEIN, J.A. A multiple logistic regression analysis of the risk and relative odds of temporomandibular disorders as a function of common occlusal features. **J Dent Res**, v.72, n.6, p.968-79, 1993.

RASSIER, D.E.; MACINTOSH, B.R. Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.5, p.499-508, 2000.

RODRIGUES, K. A.; FERREIRA, L.P. Eletromiografia dos músculos masseteres na mastigação habitual em indivíduos com e sem má oclusão. *Rev Dent Press Ortodon Ortoped Facial*, v. 8, n.6, p.107-114, nov/dez. 2003.

ROSSI, L.; TIRAPGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. *Rev. Paul. Educ. Fís*, v.13, n.1, p. 67-82, jan./jun. 1999.

ROSSI, L.; TIRAPGUI, J., Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.48, n.2, abr. 2004.

ROTH, S.M.; MARTEL, G.F.; ROGERS, M.A. Muscle biopsy and muscle fiber hypercontraction: a brief review. *Eur J Appl Physiol*, v.83, p.239-45, 2000.

SANTIWONG, P., MURAMOTO, T., SOMA, K., TAKANO, Y. Growth-associated protein-43 immunohistochemical and ultrastructural changes in jaw muscle spindles of the rat following loss of occlusion. *Arch. Oral. Biol*, v.47, p.227–237, 2002.

SANTOS, M.G.; DEZAN, V.L.; SARRAF, T. A. Bases metabólicas da fadiga muscular aguda. *Rev Bras Ciên e Mov*, v.11, n.1, p.07-12, jan. 2003.

SAXTON, J.M.; DONNELLY, A.E.; ROPER, H.P. Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Euro J Appl Physiol Occup Physiol*; v.8, n.3, p.189-93, 1994.

SEWRY; C.A. Electron microscopy of human skeletal muscle: role in diagnosis. *Current Diagn Pathol*, v.8, p.225-31, 2002.

SHINOZAKI, E.B.; PAIVA, G.; ZANIN, F.A.A.; BRUGNERA JUNIOR, A. Avaliação eletromiográfica de pacientes com DTM após a laserterapia. *RGO*, v.54, p.334-339, out/dez. 2006.

SILVA, E.J. **Raman spectroscopy and classical histology to evaluation a collagenase-induced model of tendinitis in Wistar rats.** 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de França, França, 2005.

SOUZA, F.B.; PACHECO, M.T.T.; VILAVERDE, A.B.; SILVEIRA JR., L.; MARCOS, R.L.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. *Rev Bras Med Esporte*, v. 9, n. 6, 2003.

SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento.** São Paulo: Manole, 775p, 1993.

SUVINEN, T. I.; KEMPPAINEN P. Review of clinical EMG studies related to muscle and occlusal factors in healthy and TMD subjects. *Journal of Oral Rehabilitation*, v.34, p.631–644, 2007.

TRAVELL, J.G.; SIMONS, D.G. **Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual**, ed. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, 1983.

TRAVELL, J., SIMONS, D.G. **Myofascial trigger points**, a possible explanation, v.10, p.106-109, 1981.

TULLBERG, M.; ALSTERGREN, P.J.; ERNBERG, M.M. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. **Pain**, v.105, p. 89–96, 2003.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background**. Sweden: Prima, 2002.

VAN SELMS, M.K.A; LOBBEZOO, F.; VISSCHER, C.M.; NAEIJE, M.. Myofascial temporomandibular disorder pain, parafunctions and psychological stress. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.35, p. 45–52, 2008.

VENANCIO, R. A., CAMPARIS, C.M., LIZARELLI, R.F. Low intensity laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders: a double-blind study. **J Oral Rehab**, v. 32, p. 800–807, 2005.

WEINECK, J. **Biologia do Esporte**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2000.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D.G. The effects of intracellular injections of phosphate on intracellular calcium and force in single fibres of mouse skeletal muscle. **Pflugers Arch**. v. 431, p. 964-970, 1996.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

ANEXOS I

