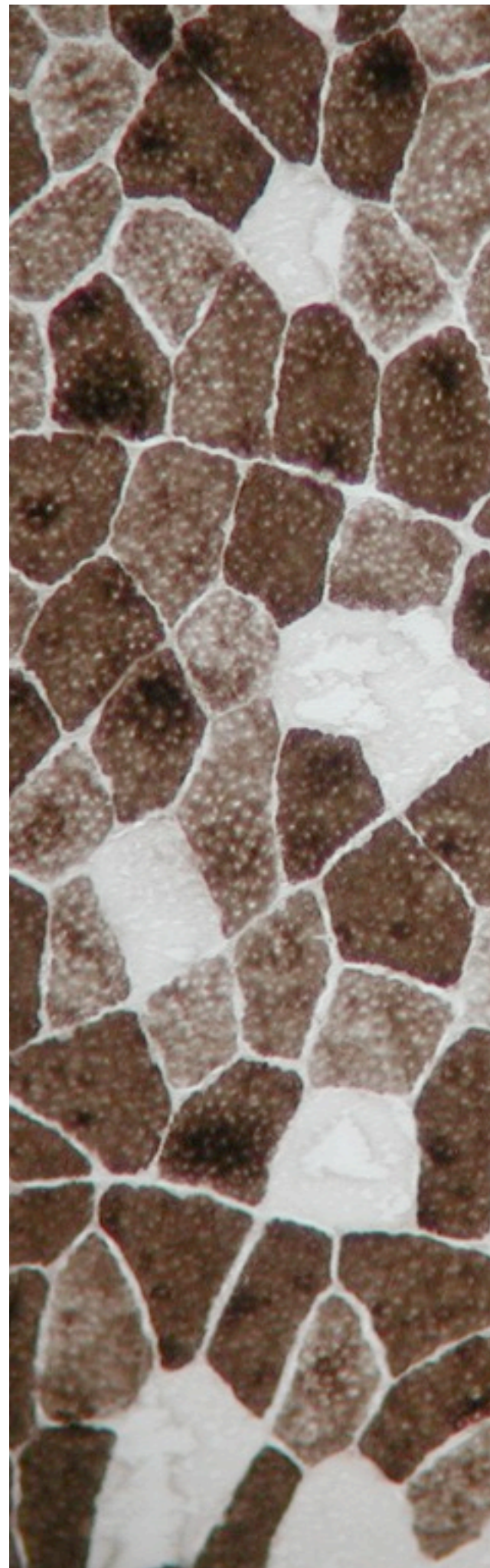


Índice

<i>Introdução</i>	9
<i>Material e Métodos</i>	15
<i>Resultados</i>	19
<i>Discussão</i>	25
<i>Conclusões</i>	29
<i>Bibliografia</i>	31

Orientador: Mestre Dr. Rodrigo Farinha Marques
Co-orientador: Prof. Doutor Silvério Cabrita

Junho de 2013



Agradecimentos

Ao meu orientador Mestre Doutor Rodrigo Farinha Marques, pela constante ajuda, sapiência, disponibilidade e empenho demonstrados para que este trabalho se tornasse uma realidade. Foi, de facto, um privilégio poder ter participado neste projecto consigo.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor Silvério Cabrita, pela colaboração, auxílio, disponibilidade e conhecimentos que me prestou de forma inexcelável durante a realização deste projecto e pela oportunidade que me deu para o poder concretizar.

Ao Doutor Eduardo Costa, pelo auxílio e conhecimentos prestados.

Ao Mestre Eng. Ricardo Cabeças pelo importante auxílio na análise estatística dos dados.

À Dra. Rita Silva e à Técnica Sandra Simões por toda a ajuda e disponibilidade prestadas.

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós, por todo o carinho, pela presença sempre constante e pela paciência demonstrada não só durante o tempo da realização deste trabalho, mas também durante toda uma vida. Espero um dia poder retribuir tudo o que me deram em potência. Aos meus amigos, pelo apoio e pela presença sempre fiel em todos os momentos, maus e bons.



Resumo

O estudo da constituição das células musculares permite-nos compreender com maior rigor as suas funções específicas e o modo como estas têm lugar. De facto, e quando estudados a nível celular, existem diferenças no tipo de fibras musculares que compõem cada músculo, podendo estas relacionar-se com a função que efectua.

Foram utilizados fragmentos criopreservados de músculos mastigadores (masseter e digástrico) e do músculo gastrocnémio de 10 ratos macho da estirpe Wistar, corados para ATPases a pH 9,4 e 4,35. Utilizando uma aplicação informática de morfometria (ImageJ) foram contadas as fibras de cada um dos tipos, segundo a sua classificação histoquímica pelo método Brooke and Kaiser. Foi também medida a área das fibras de cada um dos tipos seleccionadas anteriormente. As fibras foram distribuídas por classes de acordo com a sua área, cujos limites são formados pelos valores médios \pm coeficiente de variação para um intervalo de confiança a 95%.

A distribuição por tipos de fibras para cada um dos músculos é a seguinte: músculo masseter: $6,85 \pm 1,03\%$ de fibras tipo I; $26,03 \pm 2,35\%$ de fibras do tipo IIA e $67,12 \pm 0,77\%$ de fibras tipo IIB. Para o músculo digástrico: $30,95 \pm 0,12\%$ de fibras do tipo IIA e $69,05 \pm 1,78\%$ de fibras do tipo IIB. Para o músculo gastrocnémio: $31,29 \pm 1,28\%$ de fibras do tipo I; $20,67 \pm 0,84\%$ de fibras tipo IIA e $48,04 \pm 3,41\%$ de fibras do tipo IIB.

O presente trabalho permite concluir que existem diferenças significativas quanto à proporção de fibras presentes em cada um dos grupos musculares estudados, quanto à sua caracterização histoquímica.



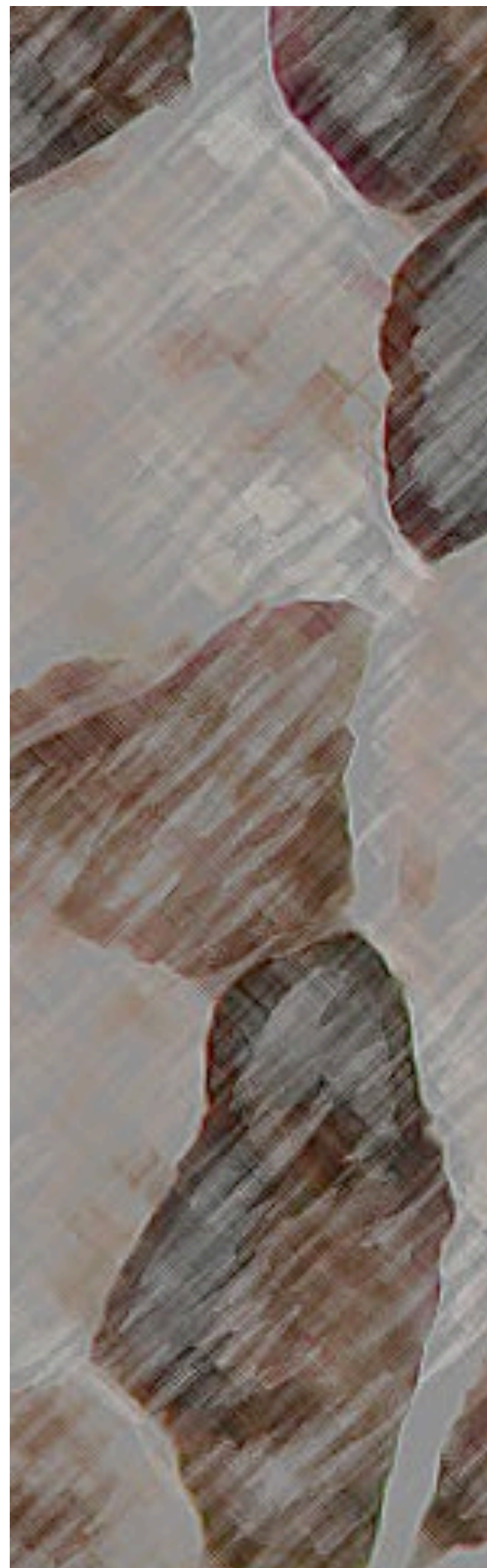
Abstract

The study of the composition of the muscular cells allows us to better understand their specific functions and how they perform it. In fact, and when studied at a cellular level, there are differences in the muscular fibers that compose each muscle, which can relate with its function.

It was used cryopreserved fragments of masticatory muscles (masseter and digastric) and of the gastrocnemius muscle from 10 Wistar male rats, stained for ATPase activity at pH 9,4 and 4,35. The morphometric analysis was performed using the software ImageJ. The fiber types were counted using the Brooke and Kaiser classification for ATPase staining. The muscle fibers areas in transverse cuts was measured for each type of fiber. For a confidence interval of 95% the fibers were grouped in classes made by its average area \pm variation coefficient.

The fibers types distribution was as follows: masseter muscle $6,85 \pm 1,03\%$ of type I fibers; $26,03 \pm 2,35\%$ of type IIA fibers and $67,12 \pm 0,77\%$ of type IIB fibers. For digastric muscle it was observed $30,95 \pm 0,12\%$ of type IIA fibers and $69,05 \pm 1,78\%$ of type IIB fibers;. For muscle gastrocnemius $31,29 \pm 1,28\%$ were type I fibers; $20,67 \pm 0,84\%$ were type IIA fibers and $48,04 \pm 3,41\%$ were type IIB fibers.

The present work allows us to conclude that histochemical staining for ATPase activity shows significant differences between the proportion of fiber types in each one of the studied muscles.



Introdução

O tecido muscular é responsável por funções tão essenciais à sobrevivência como a capacidade de locomoção ou a mastigação de alimentos. Por outro lado, integra a constituição de inúmeros órgãos contribuindo para que exista movimento dos alimentos, sangue ou ar.

Assim, nem todos os músculos apresentam as mesmas funções ou constituição, pelo que existem diferenças dos tipos de tecidos musculares que condicionam duas formas de classificação dos mesmos: segundo a sua constituição morfológica e segundo a sua função(1–4). Do ponto de vista morfológico o tecido muscular diz-se estriado quando apresenta estriações transversais fruto da disposição das proteínas contrácteis; ou liso quando as fibras musculares se dispõem em fascículos ramificados de forma irregular. Quanto à função exercida, e tendo em conta o controlo sobre a contracção, o tecido muscular designa-se de contracção voluntária ou de contracção involuntária(4,5).

Assim, podemos definir três tipos de tecido muscular: tecido muscular esquelético (estriado e de contracção voluntária), tecido muscular cardíaco (estriado e de contracção involuntária) e tecido muscular liso (liso e de contracção involuntária)(5–7).

O tecido muscular liso desempenha contracções rítmicas de baixa força e de longa duração. Constitui a componente muscular das estruturas viscerais, como sejam vasos sanguíneos, tracto gastrointestinal, útero e bexiga. A sua

contração, involuntária, é dependente do sistema nervoso autónomo e do sistema endócrino(5).

O tecido muscular cardíaco constitui o miocárdio. Apresenta uma disposição das proteínas contrácteis que lhe confere uma aparência estriada, produz contrações fortes e que utilizam grande quantidade de energia. Também as suas contrações são contínuas, independentes da vontade e controladas por mecanismos autónomos e hormonais(5).

O tecido muscular esquelético, constituinte de músculos de contração voluntária de curta duração, é aquele que nos propomos estudar. É constituído por feixes de miócitos ou fibras musculares, células cilíndricas multinucleadas não-ramificadas, de diâmetro variável (de 5 a 100 μm), que se apresentam extremamente alongadas (variando a sua extensão de 1 a 2 mm até vários centímetros, percorrendo toda a extensão do músculo que constituem) com numerosos núcleos achatados localizados a intervalos geralmente regulares na periferia do sarcoplasma(5,7). As fibras musculares, dispostas paralelamente e separadas por tecido conjuntivo rico em colagénio, agrupam-se em feixes que adoptam a direcção de acção do músculo que constituem. Contêm, no seu interior miofibrilhas, cuja disposição lhe confere uma aparência estriada ao tecido, derivando deste facto a designação actual deste tipo de músculo(5–7). As miofibrilhas ocupam a maioria do espaço intracelular, condicionando a posição periférica dos núcleos e mitocôndrias (5,7).

Sendo as miofibrilhas um componente importante das fibras musculares, o seu estudo é fundamental para a compreensão do funcionamento muscular. Estas, encontram-

se divididas em pequenas unidades contrácteis denominadas sarcómeros, sendo cada um destes composto por dois tipos diferentes de proteínas contrácteis: a actina e a miosina. A microscopia electrónica, permite a delimitação de cada sarcómero por duas regiões altamente densas, denominadas linhas Z (de *Zwischenscheiben*, ou discos intermediários) a partir das quais se estendem zonas claras, ou bandas I, compostas maioritariamente por filamentos de actina. Imediatamente contígua a esta observa-se uma região onde os filamentos finos de actina se interdigitam com filamentos espessos de miosina, a banda A. Na sua região central é possível observar uma zona mais clara constituída maioritariamente por filamentos de miosina, designada banda H. Observável ainda na banda H encontra-se uma linha de alta densidade, a linha M (de *Mittelscheibe*, ou disco médio)(5,7).

Apesar deste modelo ser aplicável ao tecido muscular esquelético em geral, existem diferenças significativas entre diferentes músculos com diferentes funções. A diferença mais significativa prende-se com o tipo de fibras musculares presentes em cada músculo, dependente da sua composição proteica(8–11).

A actina, proteína contráctil de feixe fino, é caracterizada por um arranjo espacial em dupla-hélice de monómeros de G-actina, com um tipo de proteína filamentosa, a tropomiosina, ligada à sua periferia(8). Contudo, a chave para a compreensão do processo contráctil dos músculos encontra-se no estudo mais aprofundado da miosina. A miosina é uma grande molécula composta por seis cadeias de aminoácidos: duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves(3,12). As cadeias pesadas apresentam funções importantes, nomeadamente estruturais e enzimáticas, podendo hidrolisar

moléculas de ATP e tornando-se essencial na regulação do processo excitatório da fibra muscular. Assim, o tipo de fibra muscular prende-se com a isoforma da cadeia pesada de miosina presente(6,8).

Ranvier começou por diferenciar as fibras musculares em “lentas, vermelhas” e “rápidas, brancas”, hoje denominadas frequentemente como fibras tipo 1 ou fibras tipo 2(6,8,13). O desenvolvimento das colorações histoquímicas que permitem identificar a capacidade oxidativa das fibras musculares, nomeadamente a pigmentação de ATPases presentes nas cadeias de miosina, mostra que existem tipos celulares intermédios(14,15). Rapidamente se compreendeu que em termos de capacidade glicolítica, velocidade de contração e resistência não existiriam apenas dois extremos, mas sim células com capacidades intermédias. Assim, as fibras tipo II foram divididas em dois sub-tipos: fibras vermelhas rápidas, classificadas como tipo IIA e fibras de contração rápida, brancas, classificadas como tipo IIB, por Brooke e Kaiser, classificação ainda hoje utilizada (6,8,9,14,16–20).

Actualmente encontram-se descritas dez isoformas de cadeia pesada de miosina: I, IIA, IIB, IIX, IIM, α , β , extra-oculares, neonatais e embrionárias(5,6,8,12,21,22). As cadeias pesadas neonatais e embrionárias encontram-se normalmente presentes durante o desenvolvimento muscular, podendo ainda ser encontradas após este período em quantidades vestigiais. As cadeias pesadas extra-oculares são componentes de músculos extra-oculares e laríngeos(8). As cadeias pesadas β e I são de contracção lenta, apenas distinguidas pelo músculo que compõem (β encontra-se presente no músculo cardíaco e a I encontra-se em músculos esqueléticos). As cadeias pesadas IIA, IIB e IIX

são isoformas de contracção rápida, bem como a isoforma IIM, expressa em músculo mastigatórios de animais carnívoros e primatas(5,6,8,9,11,23,24). A isoforma α é geralmente expressa no músculo cardíaco, sendo de contracção rápida. Contudo, também foi descrita a sua expressão em músculos mastigatórios de humanos, adquirindo, quando neste tecido, uma menor velocidade de contracção, tendo sido avançadas como possíveis explicações para este facto duas teorias: por um lado a existência de diferenças na disposição das isoformas de cadeia pesada nos filamentos espessos de miosina entre o tecido muscular esquelético e o tecido muscular cardíaco; por outro a existência de pequenas diferenças na sequência proteica da cadeia pesada α entre o tecido muscular esquelético e o tecido muscular cardíaco(8,24).

A identificação do tipo de fibras musculares presente em cada tecido assume uma importância considerável quer do ponto de vista experimental, quer clínico, pelo que os métodos para visualizar a sua diferenciação são múltiplos. Apesar de muitas das alterações morfológicas principais do tecido muscular esquelético poderem ser observadas com recurso à coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina, as técnicas histoquímicas permitem a identificação do tipo de fibras musculares(14,20,25,26). A técnica utilizada neste estudo baseia-se na identificação de adenosina trifosfatases (ATPases) nos tecidos musculares. Este método é utilizado a diversos pH (pH 9,4 e 4,35) resultando na possibilidade de distinguir a presença de fibras musculares do tipo I e fibras musculares do tipo II, conforme descrito por Brooke e Kaiser em 1970. Para além desta distinção, permite também a identificação dos sub-tipos de fibras musculares do tipo II, ou seja, permite o reconhecimento de fibras musculares do tipo

IIA, do tipo IIB e do tipo IIX (fibras com características mistas ou intermédias)(14,18,22,25,27).

Objectivo

O objectivo do presente trabalho é dar um contributo para a caracterização morfológica dos diferentes músculos mastigadores, comparando-os com um músculo da marcha, com recurso à coloração da actividade das ATPases coradas por histoquímica.

Material e Métodos

No estudo foram utilizados 10 ratos da estirpe Wistar com dois meses de idade provenientes dos Laboratórios “Charles River”, submetidos a um período de quarentena de 7 dias durante o qual foram mantidos nas condições padrão do biotério, com temperatura de 25°C e 60-65% de humidade, num regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

Todos os animais foram eutanasiados e necropsiados. A eutanásia foi realizada por sobredosagem da associação anestésica de quetamina e xilasina intraperitoneal.

Na necrópsia foram registados os dados referentes à observação do hábito externo, observação detalhada do hábito interno e fragmentos de tecidos colhidos e respectiva finalidade, em modelo próprio em utilização no Serviço de Patologia Experimental.

Em todos os animais foram colhidos para histopatologia de rotina e para criopreservação fragmentos dos músculos mastigadores masseter, digástrico e do músculo gastrocnémio.

Os fragmentos criopreservados foram cortados em criostato para realização de coloração para ATPases, a pH 9,4 e 4,35 segundo o seguinte protocolo.

Soluções utilizadas:

1. 0,1 M de solução tampão de glicina

A. 0,75g de Glicina

Avaliação Histoquímica dos Músculos Mastigadores

B. 0,585g de NaCl

C. Perfazer com água destilada até 100ml

2. 0,1 M de solução tampão de glicina com 0,75 M de CaCl₂

A. 50ml da solução 1

B. 10ml de 0,75 M CaCl₂ (11,03g de CaCl₂/2H₂O diluídos em 100ml de água destilada)

C. Misturar e depois adicionar aproximadamente 22ml de NaOH até obter pH de 9.4

3. 0,1 M de solução tampão de acetato de veronal a pH 4.2 e a pH 4.6

4. Solução de incubação

A. 5mg de ATP

B. 10ml da solução 2

C. Ajustar até obter pH 9,4 com 0,1 M NaOH ou 0,1 M HCl se necessário

Método (a pH 9,4):

1. Incubar as secções de tecido na solução de incubação a 37°C.

2. Lavar bem em água destilada.

3. Colocar em cloreto de cobalto a 2% durante 5 minutos.

4. Lavar bem em água corrente e, de seguida, em três mudas de água destilada.

5. Colocar em sulfato de amónio diluído (1:10) durante 30 segundos.

6. Lavar bem em água corrente.

7. Corar ligeiramente com hematoxilina.

8. Montar a lamela.

Método (a pH 4,35):

1. Pré-incubar as secções de tecido a 4°C na solução 3 durante 10 minutos.
2. Lavar brevemente em água destilada.
3. Proceder segundo o protocolo para pH 9,4.

Para cada músculo de cada indivíduo, foram realizadas 10 fotografias dos cortes histológicos transversais de cada uma das colorações, utilizando os padrões estereológicos de aleatorização padronizada para aquisição de imagens.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio do programa desenvolvido pelos Institutos Nacionais de Saúde (EUA), Image J 1.42q, que permitiu a contagem do número de fibras do tipo I, IIA e IIB, em corte transversal. Foram ainda medidas as áreas das fibras de cada um dos tipos referidos acima, nas lâminas de coloração de ATPases a pH 9,4.

Assim, a variação do número de fibras de cada um dos tipos descritos anteriormente pode ser descrita utilizando a média e desvio padrão. Para cada um dos músculos foi calculada a proporção de cada um dos tipos de fibras em relação ao número total de fibras contadas em cada fotografia.

A variação da área das fibras de cada um dos tipos, seleccionadas pela técnica de coloração das ATPases, pode ser descrita utilizando a média, desvio padrão e coeficiente de variação para um intervalo de confiança de 95%. Com base nestes dados definem-se para cada um dos músculos, cinco classes de fibras musculares, de acordo com as secções observadas: fibras muito pequenas, fibras

pequenas, fibras médias, fibras grandes e fibras muito grandes. Designamos de fibras médias aquelas cuja área se encontra compreendida no intervalo [média - coeficiente de variação, média + coeficiente de variação]. Designamos fibras grandes, aquelas cujo valor da área se encontra incluído no intervalo [média + coeficiente de variação, média + 2 x coeficiente de variação]. Designamos fibras pequenas, quando o valor da área está incluído no intervalo [média - 2 x coeficiente de variação, média - coeficiente de variação]. Consideramos que as fibras musculares são muito pequenas, quando o valor da sua área se encontra abaixo do considerado para as fibras pequenas, e as fibras são consideradas como muito grandes quando a sua área excede a área das fibras grandes.

Resultados

A observação histopatológica de rotina permite a exclusão de patologia em qualquer dos músculos estudados. A distribuição das fibras musculares é uniforme, com preservação dos diversos feixes. Não se observam alterações da posição dos núcleos ou citoplasmáticas em nenhum dos músculos estudados.

Músculo masseter

No músculo masseter observa-se uma percentagem média de $6,85 \pm 1,03\%$ de fibras tipo I; $26,03 \pm 2,35\%$ de fibras do tipo IIA e $67,12 \pm 0,77\%$ de fibras tipo IIB.

A área média das fibras tipo I varia entre 2155,93px e 3517,67px ($2836,8 \pm 755,55\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 20% de fibras pequenas e 80% de fibras médias.

A área média das fibras tipo IIA varia entre 4409,05px e 5455,48px ($4932,26 \pm 1318,95\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 15,79% de fibras pequenas; 57,89% de fibras médias e 26,32% de fibras grandes.

A área média das fibras tipo IIB varia entre 4344,35px e 4996,88px ($4670,61 \pm 1362,24\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 12,24% de fibras pequenas; 67,35% de

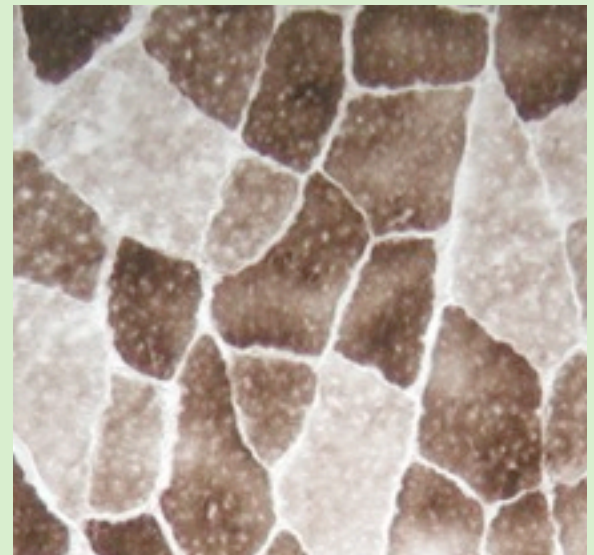


Figura 1. Músculo masseter, ATPases, pH 9,4. A=200x no original.

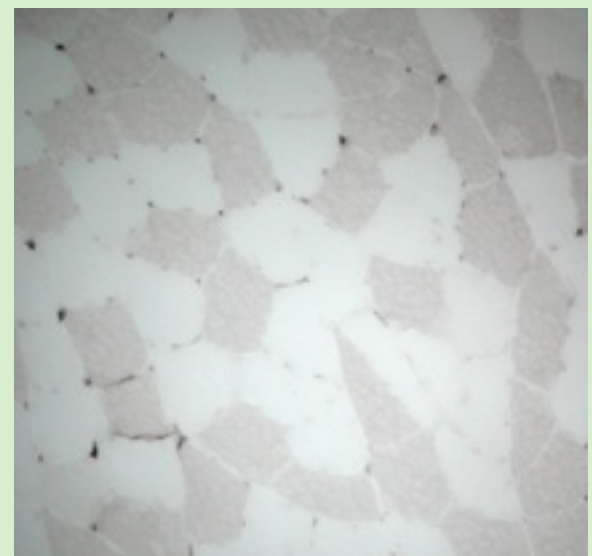


Figura 2. Músculo masseter, ATPases, pH 4,35. A=200x no original.

fibras médias; 18,37% de fibras grandes e 2,04% de fibras muito grandes.

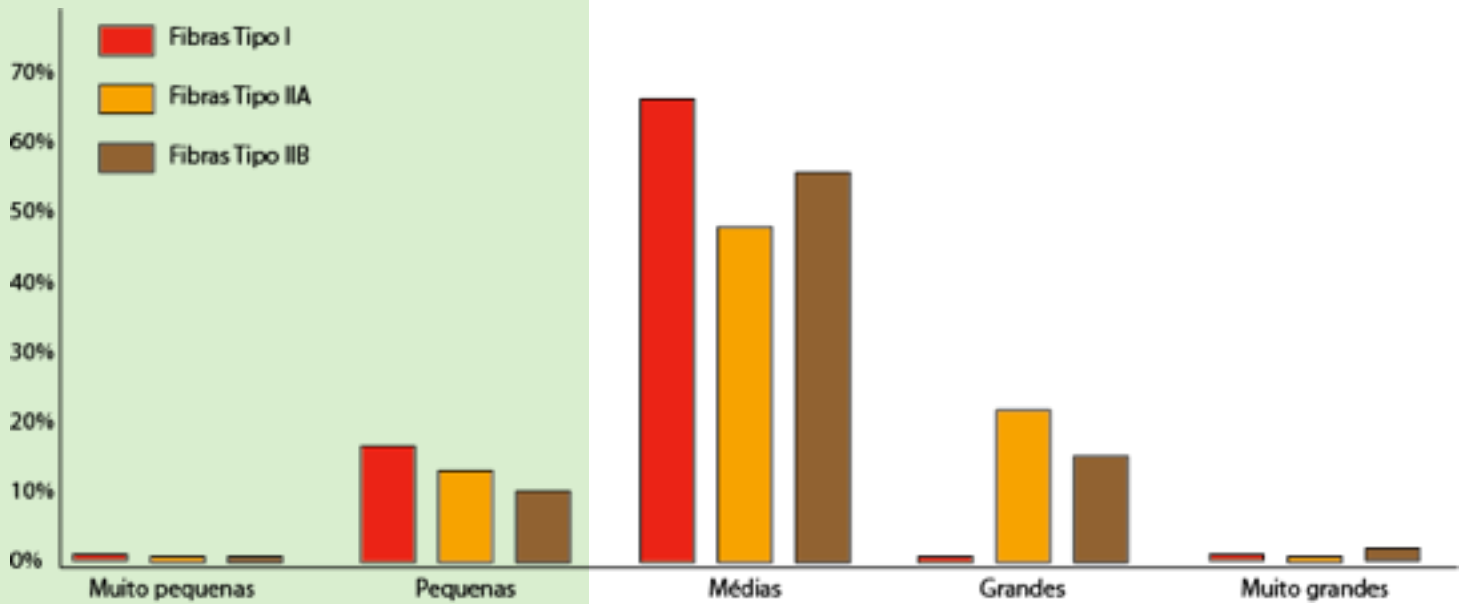


Figura 3. Representação gráfica da distribuição da área das fibras, de acordo com o tipo histoquímico, para o músculo masseter.

Músculo digástrico

No músculo digástrico observa-se uma percentagem média de $30,95 \pm 0,12\%$ de fibras do tipo IIA e $69,05 \pm 1,78\%$ de fibras do tipo IIB. Nos feixes observados, não foram identificadas fibras do tipo I, na coloração em meio alcalino ou ácido.

A área média das fibras tipo IIA varia entre 3785,28px e 4503,33px ($4144,31 \pm 1073,33$ px), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 19,23% de fibras pequenas; 61,54% de fibras médias; 15,38% de fibras grandes e 3,85% de fibras muito grandes.

A área média das fibras tipo IIB varia entre 3171,97px e 3649,52px ($3410,74 \pm 1087,89$ px), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 13,79% de fibras pequenas; 72,41% de fibras médias; 8,62% de fibras grandes e 5,17% de fibras muito grandes.

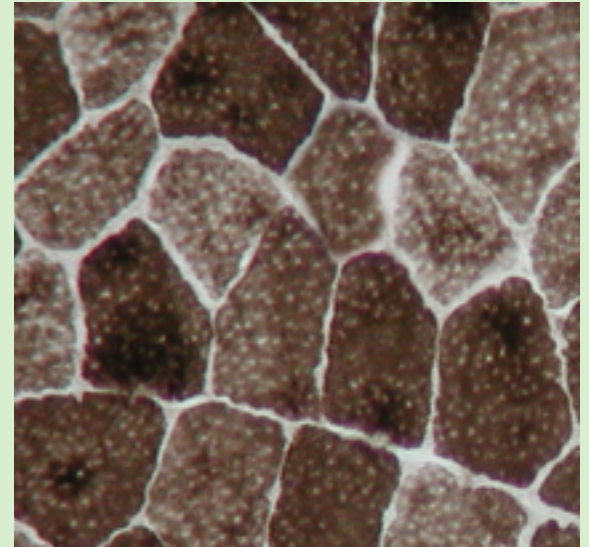


Figura 4. Músculo digástrico, ATPases, pH 9,4. A=200x no original.

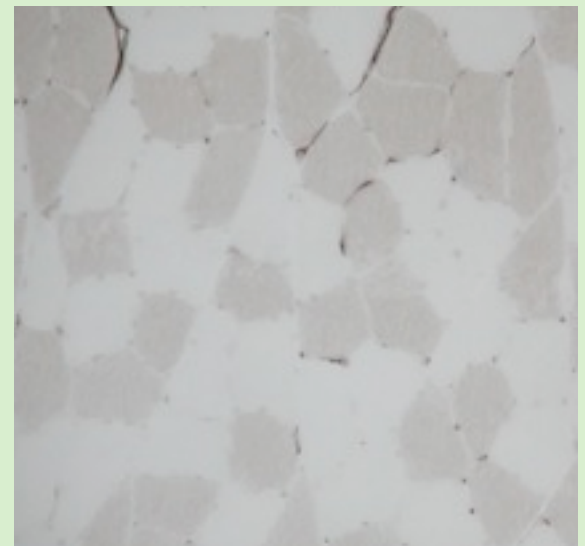


Figura 5. Músculo digástrico, ATPases, pH 4,35. A=200x no original.

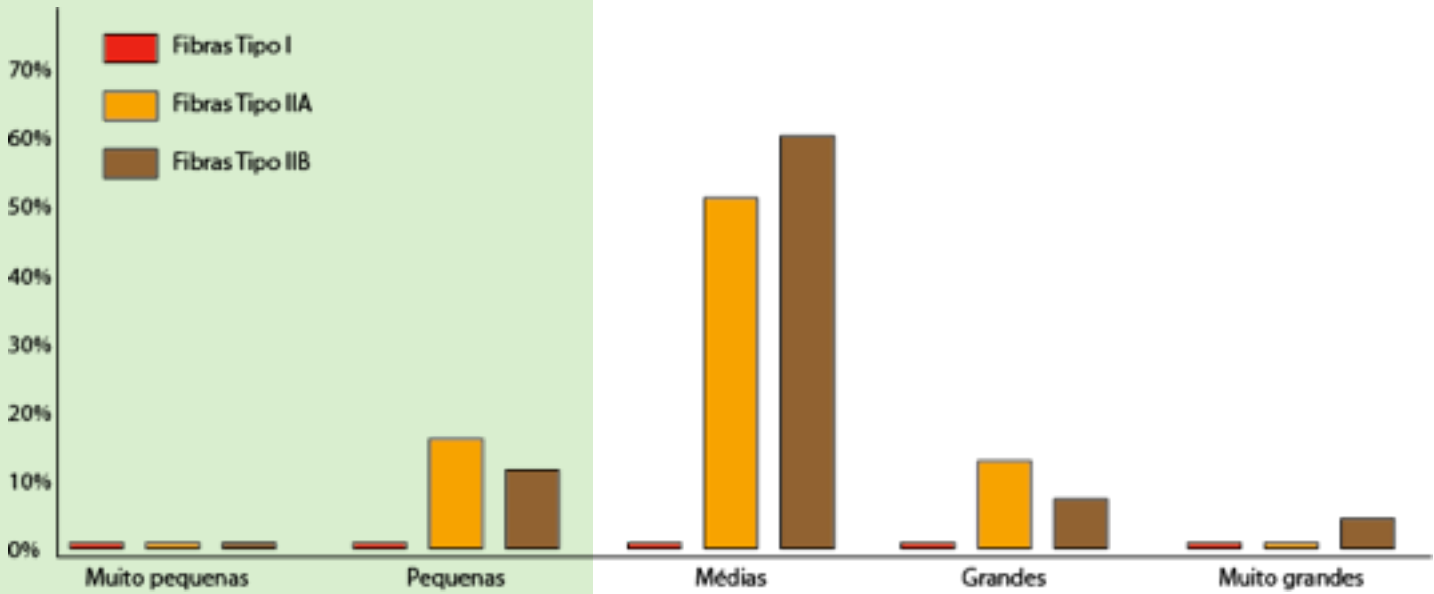


Figura 6. Representação gráfica da distribuição da área das fibras, de acordo com o tipo histoquímico, para o músculo digástrico.

Músculo gastrocnémio

No músculo gastrocnémio observa-se uma percentagem média de $31,29 \pm 1,28\%$ de fibras do tipo I; $20,67 \pm 0,84\%$ de fibras tipo IIA e $48,04 \pm 3,41\%$ de fibras do tipo IIB.

A área média das fibras tipo I varia entre 4212,53px e 4754,04px ($4483,29 \pm 1211,45\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes acima definidas, 14,29% de fibras pequenas; 66,07% de fibras médias; 17,86% de fibras grandes e 1,79% de fibras muito grandes.

A área média das fibras tipo IIA varia entre 4707,38px e 5326,4px ($5016,89 \pm 1115,92\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95%. De acordo com as classes estabelecidas previamente, observam-se 18,92% de fibras pequenas; 64,86% de fibras médias e 16,22% de fibras grandes.

A área média das fibras tipo IIB varia entre 4529,85px e 5037,5px ($4783,67 \pm 1415,63\text{px}$), para um intervalo de confiança a 95%. Observam-se, de acordo com as classes pré-estabelecidas, 12,79% de fibras pequenas; 70,93% de fibras médias; 11,63% de fibras grandes e 4,65% de fibras muito grandes.

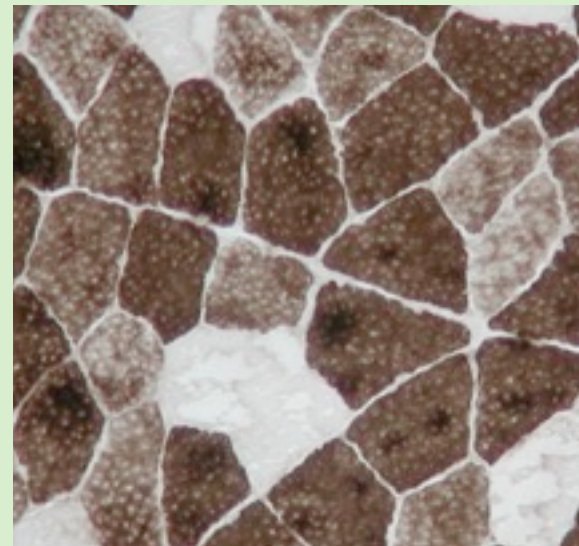


Figura 7. Músculo gastrocnémio, ATPases, pH 9,4. A=200x no original.

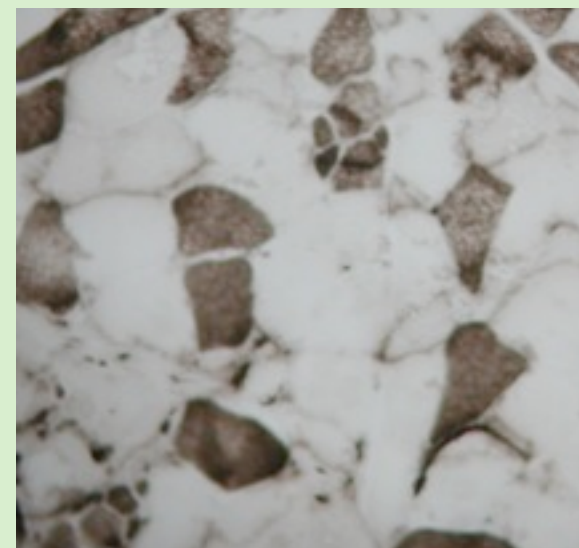


Figura 8. Músculo gastrocnémio, ATPases, pH 4,35. A=200x no original.

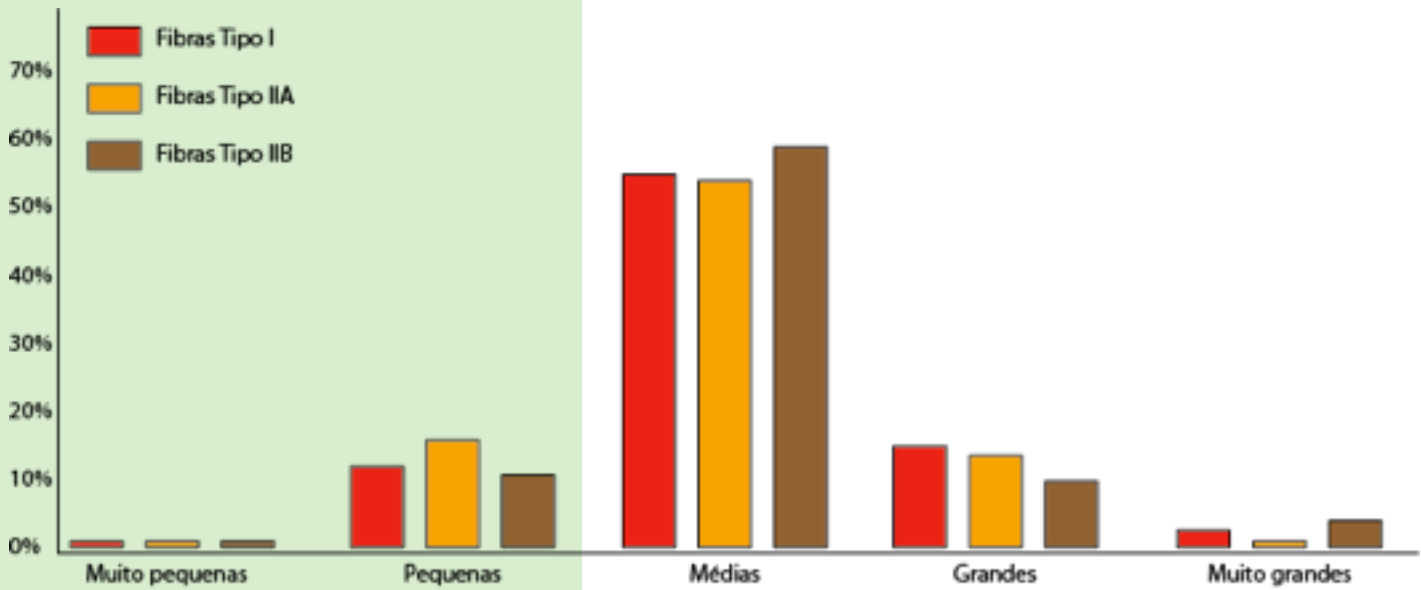


Figura 9. Representação gráfica da distribuição da área das fibras, de acordo com o tipo histoquímico, para o músculo gastrocnêmio.

Discussão

O conhecimento sobre a estrutura e função normais dos tecidos é fundamental para a área da Patologia Experimental, na medida em que constitui a base de todos os trabalhos experimentais permitindo a comparação das alterações observadas na entidade patológica em estudo com a condição não patológica.

O tecido muscular constitui um paradigma dos estudos de Patologia Experimental, já que o mesmo tipo histológico de tecido é composto por células morfológica e fisiologicamente semelhantes, mas com características bioquímicas muito próprias. Estas diferenças subtis a nível celular permitem a diversidade e variabilidade de capacidades funcionais de cada grupo muscular. A velocidade de contracção de um músculo encontra-se intimamente relacionado com a actividade da adenosina trifosfatase miofibrilhar (ATPase), associada às diferentes isoformas de miosina. Os estudos comparativos em músculos normais têm demonstrado que existem variações do normal entre espécies, grupos

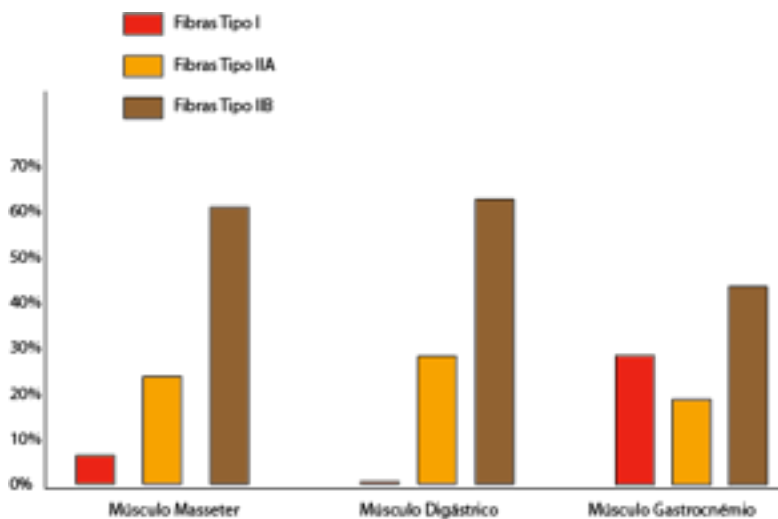


Figura 10. Representação gráfica da distribuição dos tipos de fibras nos músculos estudados.

musculares diferentes e até regiões do mesmo músculo. Existem diversos factores que contribuem para esta diversidade de fibras musculares, desde aspectos neuroquímicos até necessidades energéticas ou níveis de hormonas circulantes.

A histoquímica das ATPases permite a classificação das fibras tipo I e II, permitindo caracterizar e diferenciar os músculos e compreender alguns mecanismos bioquímicos subjacentes à sua adaptação funcional ou a diferentes exigências.

Os músculos da marcha como o músculo gastrocnémio, são habitualmente ricos em fibras tipo I, adaptados a uma activação constante durante o movimento do corpo e, à manutenção da posição deste contra a gravidade.

A observação histológica e a análise morfométrica realizada permite constatar este facto: os músculos mastigadores estudados (masseter e digástrico) apresentam perfis histoquímicos distintos do músculo da marcha seleccionado (gastrocnémio). Mais de 90% das fibras destes músculos mastigadores são fibras do tipo II, enquanto no músculo gastrocnémio as fibras tipo I constituem 30% das células musculares observadas.

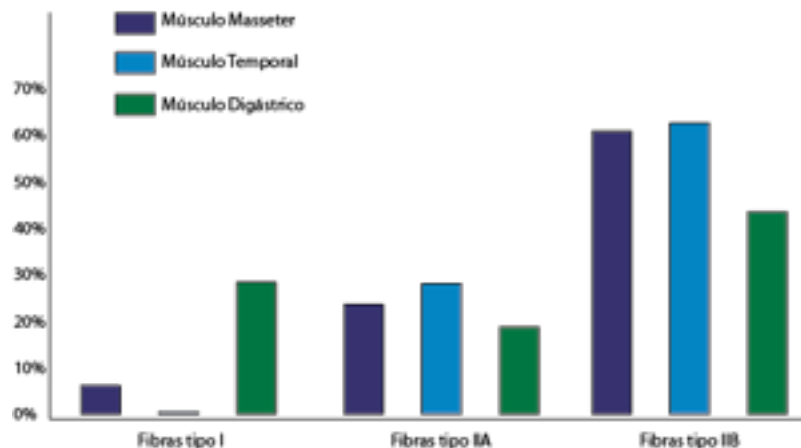


Figura 11. Representação gráfica das diferenças na distribuição dos tipos de fibras nos músculos estudados.

Também a área das fibras em corte transversal apresenta dimensões distintas nos diferentes músculos: enquanto as fibras do tipo I presentes no músculo masseter são significativamente menores quando comparadas com as observadas no músculo gastrocnémio; as fibras do tipo II têm dimensões médias aproximadas em ambos os músculos. Já no músculo digástrico, em que o predomínio das fibras tipo II é particularmente expressivo, as áreas destas se apresentam-se menores do que em qualquer um dos outros músculos estudados.

Quanto à distribuição das fibras por áreas para cada um dos tipos histoquímicos identificados, para cada um dos músculos estudados, não se observam diferenças significativas. De uma forma genérica as fibras musculares, quanto à área, apresentam uma distribuição normal com a maioria das células com dimensões próximas dos valores médios.

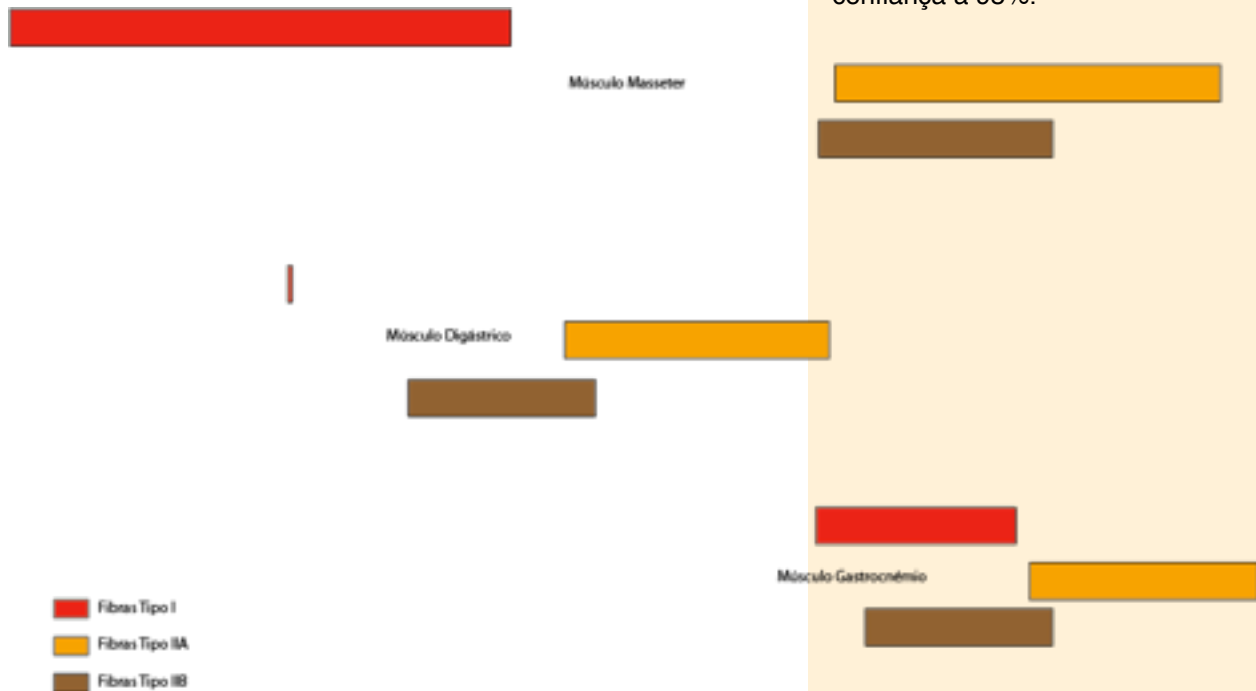


Figura 12. Representação esquemática comparativa dos valores mínimo e máximo da área dos diferentes tipos de fibras musculares, em corte transversal, para cada um dos músculos, com um intervalo de confiança a 95%.

Conclusões

A realização do presente trabalho permite concluir que:

1. Existem diferenças morfológicas entre músculos com funções diferentes, quanto à sua caracterização histoquímica para ATPases.
2. É possível utilizar esta técnica para diferenciar músculos mastigadores com funções diferentes, como os músculos masseter e temporal.
3. É importante a caracterização morfológica e bioquímica dos músculos mastigadores para a compreensão da sua resposta a situações patológicas alvo de estudos no âmbito da Patologia Experimental já que apresentam características que os diferenciam de outros músculos esqueléticos da espécie estudada.

Bibliografia

1. Van Eijden TM, Korfage J a, Brugman P. Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. *The Anatomical record* [Internet]. 1997 Jul;248(3):464–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214565>
2. Sato I, Imura K, Miwa Y, Ide Y, Murata M, Sunohara M. Distribution of slow muscle fiber of muscle spindle in postnatal rat masseter muscle. *Okajimas folia anatomica Japonica* [Internet]. 2007 Nov;84(3):99–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18186222>
3. Miwa Y, Sunohara M, Sato I. Expression of myosin heavy chain isoforms in the postnatal mouse masseter muscle. *Okajimas folia anatomica Japonica* [Internet]. 2009 Nov;86(3):105–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166551>
4. Hannam AG, Mcmillan AS. in *Oral Biology & Medicine Internal Organization in the Human Jaw Muscles*. 1994.
5. Young B. *Wheater Histologia Funcional*. 5ª Edição. Elsevier Inc.; 2007. p. 440.
6. Heinemann B, House L, Hill J, Ox O. *Genetics and Molecular Biology of Muscle Adaptation*. Society [Internet]. Elsevier; 2005;3(3):2007. Available from: <http://www.questia.com/PM.qst?a=o&docId=26347764>
7. Sciote JJ, Morris TJ. Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *Journal of orthodontics* [Internet]. 2000 Mar;27(1):15–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790441>
8. Hämäläinen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* [Internet]. 1993 May 1 [cited 2013 Apr 30]; 41(5):733–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8468455>
9. Miede B, Fanghänel J, Kubein-Meesenburg D, Nägerl H, Schwestka-Polly R. Masticatory musculature under altered occlusal relationships--a model study with

- experimental animals. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* [Internet]. 1999 Jan;181(1): 37–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10081556>
10. Osterlund C, Liu J-X, Thornell L-E, Eriksson P-O. Muscle spindle composition and distribution in human young masseter and biceps brachii muscles reveal early growth and maturation. *Anatomical record* (Hoboken, N.J.: 2007) [Internet]. 2011 Apr [cited 2013 Jun 16];294(4):683–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21370492>
 11. Kawai N, Sano R, Korfage J a M, Nakamura S, Tanaka E, Van Wessel T, et al. Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition. *Journal of anatomy* [Internet]. 2009 Dec [cited 2013 May 30];215(6):656–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 12. Bicer S, Patel RJ, Williams JB, Reiser PJ. Patterns of tropomyosin and troponin-T isoform expression in jaw-closing muscles of mammals and reptiles that express masticatory myosin. *The Journal of experimental biology* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2013 Jun 16]; 214(Pt 7):1077–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389191>
 13. Ausoni S. Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms Slow Rat Muscles. 1990;(January).
 14. Rosser BW, Norris BJ, Nemeth PM. Metabolic capacity of individual muscle fibers from different anatomic locations. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* [Internet]. 1992 Jun 1 [cited 2013 Apr 30]; 40(6):819–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588028>
 15. Schmalbruch H, Kamieniecka Z. Histochemical fiber typing and staining intensity in cat and rat muscles. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 1975 Jun 1 [cited 2013 Apr 30];23(6):395–401. Available from: <http://intl.jhc.org/cgi/content/abstract/23/6/395>
 16. Abe S, Hiroki E, Iwanuma O, Sakiyama K, Shirakura Y, Hirose D, et al. Relationship between function of masticatory muscle in mouse and properties of muscle fibers. *The Bulletin of Tokyo Dental College* [Internet]. 2008 May;49(2):53–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776716>
 17. Kowalski K, Gordon EE, Martinez a., Adamek J. Changes in Enzyme Activities of Various Muscle Fiber

Types in Rat Induced By Different Exercises. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [Internet]. 1969 Sep 1 [cited 2013 Apr 30];17(9):601–7. Available from: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/17.9.601>

18. Lind a, Kernell D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: a “two-dimensional” quantitative approach. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* [Internet]. SAGE Publications; 1991 May 1 [cited 2013 Apr 2];39(5):589–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1826695
19. Spurway NC, Murray MG, Gilmour WH, Montgomery I. Quantitative skeletal muscle histochemistry of four east African ruminants. *Journal of Anatomy* [Internet]. Cambridge Univ Press; 1996;188(Pt 2):455–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1167582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Osterlund C, Thornell L-E, Eriksson P-O. Differences in fibre type composition between human masseter and biceps muscles in young and adults reveal unique masseter fibre type growth pattern. *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)* [Internet]. 2011 Jul [cited 2013 Jun 16];294(7):1158–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21634018>
21. Korfage J a M, Van Wessel T, Langenbach GEJ, Ay F, Van Eijden TMGJ. Postnatal transitions in myosin heavy chain isoforms of the rabbit superficial masseter and digastric muscle. *Journal of anatomy* [Internet]. 2006 Jun;208(6):743–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2100230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Silva Cornachione A, Cação Oliveira Benedini-Elias P, Cristina Polizello J, César Carvalho L, Cláudia Mattiello-Sverzut A. Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats. *Acta Histochemica et Cytochemica* [Internet]. Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry; 2011 Apr 28 [cited 2013 Apr 30];44(2):43–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Sano R, Tanaka E, Korfage J a M, Langenbach GEJ, Kawai N, Van Eijden TMGJ, et al. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *Journal of anatomy* [Internet]. 2007 Oct [cited 2013 May 30];211(4):464–70. Available from: <http://>

- www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
24. Tanaka E, Sano R, Kawai N, Korfage J a M, Nakamura S, Izawa T, et al. Regional differences in fiber characteristics in the rat temporalis muscle. *Journal of anatomy* [Internet]. 2008 Dec [cited 2013 Jun 16]; 213(6):743–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2666143&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 25. Kuzon WM, Rosenblatt JD, Pynn BR, Marchetti PJ, Plyley MJ, McKee NH. A comparative histochemical and morphometric study of canine skeletal muscle. *Canadian journal of veterinary research Revue canadienne de recherche veterinaire* [Internet]. 1989;53(2):125–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1255536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Solomon M, Dunn M. Simultaneous Histochemical Determination of Three Fiber Types in Single Sections of Ovine , Bovine and Porcine Skeletal Muscle M . B . Solomon and M . C . Dunn The online version of this article , along with updated information and services , is located o. *Journal of animal science* [Internet]. 1988 [cited 2013 Apr 30];255–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366712>
 27. Gauthier GF, Lowey S. Polymorphism of myosin among skeletal muscle fiber types. *The Journal of Cell Biology* [Internet]. The Rockefeller University Press; 1977;74(3):760–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2110104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

