



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANA HADDAD

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS MÚSCULOS DA
MASTIGAÇÃO DO RATO DA LINHAGEM WISTAR (RATTUS
NORVEGICUS ALBINUS) EM MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA**

*MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MASTICATORY MUSCLES IN
WISTAR RATS (RATTUS NORVEGICUS ALBINUS) BY COMPUTED
MICROTOMOGRAPHY*

Piracicaba

2018

JULIANA HADDAD

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS MÚSCULOS DA
MASTIGAÇÃO DO RATO DA LINHAGEM WISTAR (RATTUS
NORVEGICUS ALBINUS) EM MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA

*MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MASTICATORY MUSCLES IN
WISTAR RATS (RATTUS NORVEGICUS ALBINUS) BY COMPUTED
MICROTOMOGRAPHY*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-dental, na Área de Anatomia.

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Buco-dental Biology, in Anatomy Area.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Freire

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluna Juliana Haddad e orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003033001P3

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

H117c Haddad, Juliana, 1991-
Caracterização da morfologia dos músculos da mastigação do rato da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) em microtomografia computadorizada / Juiana Haddad. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Alexandre Rodrigues Freire.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ratos Wistar. 2. Músculos mastigatórios. 3. Morfologia. 4. Microtomografia por raio-X. I. Freire, Alexandre Rodrigues, 1985-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphological characteristics of masticatory muscles in Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) by computed microtomography

Palavras-chave em inglês:

Rats, Wistar

Masticatory muscles

Morphology

X-ray microtomography

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Alexandre Rodrigues Freire [Orientador]

João Lopes Toledo Neto

Felippe Bevilacqua Prado

Data de defesa: 18-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 18 de Julho de 2018, considerou a candidata JULIANA HADDAD aprovada.

PROF. DR. ALEXANDRE RODRIGUES FREIRE

PROF. DR. JOÃO LOPES TOLEDO NETO

PROF. DR. FELIPPE BEVILACQUA PRADO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Abib e Julia, por terem me ensinado as primeiras letras e por abdicado de suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

Aos meus irmãos João (*in memoriam*) e Abib pelo carinho e incentivo.

À minha avó Maria (*in memoriam*) e Amélia, que desde os meus primeiros passos nunca me desampararam.

Ao meu namorado Leandro por todo amor, incentivo, apoio e compreensão.

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Marcelo Knobel.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Senhor Diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

A Coordenadoria de Pós Graduação, na figura da Senhora Coordenadora Prof. Dr.^a Karina Gonzalez Silvério Ruiz.

À Equipe Técnica da Coordenadoria de Pós-graduação nas pessoas de Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q. Marcondes Cesar, Ana Paula Carone e Leandro Vigano agradeço pela paciência, atenção e disponibilidade em sempre me ajudar.

Aos servidores da biblioteca da FOP-UNICAMP pela valiosa disponibilidade e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro oferecido para realização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Buco-Dental, na figura da coordenadora Prof. Dr.^a Ana Paula de Souza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Freire, grande anatomista e amigo, pelos ensinamentos a mim transmitidos, pelo seu exemplo de ética e dedicação profissional. Por acreditar e valorizar a profissão acadêmica e confiar na minha capacidade, além de toda a paciência. Agradeço pela confiança, incentivo e oportunidades. Meu muito obrigada.

A professora Dr.^a Ana Cláudia Rossi, grande amiga, por ter sido não só companheira na orientação desse trabalho, mas em toda árdua caminhada. Sempre interessada no trabalho, oferecendo sugestões deveras muito importantes e a presença em todas as etapas para chegar até aqui. Jamais esquecerei muito obrigada.

Ao professor Felipe Bevilacqua Prado por toda atenção, conhecimentos compartilhados e pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Dr.^a João Lopes Toledo Neto por gentilmente aceitar o convite de participar da minha banca e por ter me mostrado a Anatomia na graduação e como é linda a carreira docente.

Aos meus pais deixo um agradecimento especial pelo apoio incondicional e por todas as lições de amor, companheirismo, amizade e dedicação. Presentes em todos os momentos da minha vida, sendo meu alicerce desde que cheguei a este mundo, e mesmo quando achei que tudo tivesse acabado foram eles que me levantaram e mostraram que a vida é pra ser vivida mesmo com todos os acontecimentos nessa caminhada, que ainda está só começando. Obrigada por fazerem parte deste momento, sem vocês não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos Abib e João (*in memoriam*) que sempre acreditaram em mim, desde a graduação, embora o João tenha ido embora deste plano, sei que olha por mim e está sempre na torcida para que tudo dê certo na minha vida, e ao Abib meu agradecimento por ser a luz da minha vida, e mostrar que tudo vale a pena.

A minha avó Amélia e a madrinha Oneide por me oferecem o amor e a dedicação sem pedir nada em troca, apenas um sorriso.

Ao meu namorado Leandro, confidente e amigo, pelo incentivo e por permanecer ao meu lado foi muito importante nessa caminhada. Obrigada pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

Aos amigos do mestrado Maria Claudia, Ana Paula, Thaiané, Sarah, Rafael, Larissa, Talita, Yuli (e a pequena Naiara) e Fernanda, pois sem vocês tudo seria mais difícil.

A aqueles que mesmo de forma direta e indireta colaboraram com este estudo.

EPÍGRAFE

“Não desista nunca,
a persistência e a vontade de vencer
leva qualquer um a vitória”.

(Sócrates Di Lima)

RESUMO

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo estudar a morfologia dos músculos da mastigação de ratos da linhagem Wistar. Esta linhagem de roedores é amplamente utilizada como modelo experimental para estudos direcionados ao entendimento dos efeitos das diferentes condições oclusais, de normalidade e patológicas, nos tecidos periodontais de suporte. Ao longo dos anos, foram obtidos dados importantes relacionados à tais efeitos, porém há uma lacuna de conhecimento relacionados à esses dados devido à falta de estudos direcionados ao entendimento da dinâmica mastigatória destes animais. O estudo da anatomia dos músculos mastigatórios, neste caso, torna-se base essencial para entender tal dinâmica. Foi realizado um estudo em que se utilizou 10 ratos machos adultos, da linhagem Wistar, que foram eutanasiados aos 2 meses de idade. As cabeças dos animais foram removidas e dissecadas para exposição dos músculos da mastigação: masseter, temporal, pterigoideos e zigomaticomandibular. Após fixação em formol tamponado, as peças foram lavadas em água destilada e mergulhadas em uma solução de diiodo iodeto de potássio (I₂KI) durante 1 mês. Foram realizadas microtomografias em alta resolução das cabeças, das quais foram obtidas imagens sequenciais que foram transferidas ao software Materialise Mimics v18 para segmentação das imagens. Na segmentação foi utilizada a densidade da estrutura muscular, aumentada pela ação da solução de iodo, para isolar cada musculo e construir uma superfície 3D. A partir da superfície 3D foi realizada a descrição anatômica caracterizando forma, direção das fibras, origem e inserção muscular. Assim, foi possível caracterizar anatomicamente os músculos da mastigação que irá contribuir para estudos futuros envolvendo a dinâmica muscular.

Palavras-chaves: Ratos Wistar, Músculos da mastigação, Morfologia, Microtomografia Computadorizada de Raios-X.

ABSTRACT

This master degree dissertation aimed to study the morphology of masticatory muscles of Wistar rats. This rodent lineage is widely used as an experimental model for studies aimed at understanding the effects of different occlusal conditions, both normal and pathological, on the periodontal tissues. Over the years, important data related to these effects have been obtained, but there is a knowledge gap related to these data due to the lack of studies aimed at understanding the masticatory dynamics in these animals. The anatomical study of the masticatory muscles, in this case, becomes an essential basis for understanding such dynamics. A study was conducted in which 10 adult male Wistar rats were euthanized at 2 months of age. The heads of the animals were removed and dissected for exposure to the chewing muscles: masseter, temporallis, pterygoid and zygomaticomandibularis. After fixation in buffered formaldehyde solution, the pieces were washed in distilled water and immersed in iodine solution (I2KI) during 1 month. High resolution microCT of the heads were obtained, which sequential images were obtained and transferred to the Materialise Mimics v18 software for image segmentation. In the segmentation, the density of the muscular structure, increased by the action of the iodine solution, was used to isolate each muscle and construct a 3D surface. From the 3D surfaces, the anatomical description was carried out, characterizing shape, fiber directions and muscular insertions. Thus, it was possible to anatomically characterize masticatory muscles that will contribute to future studies involving muscle dynamics.

Keywords: Wistar rat, Masticatory Muscles, Morphology, MicroCT

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 ARTIGO: Morphological characteristics of masticatory muscles in Wistar rats (Rattus norvegicus albinus) by computed microtomography.....	13
3 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
ANEXO 1 – Comprovante de envio no Periódico.....	26
ANEXO 2 – Certificação do Comitê de Ética.....	27

1 INTRODUÇÃO

Funcionalmente, o sistema estomatognático envolve em sua dinâmica ações integradas de diversas estruturas, cada qual com suas particularidades, sendo uma delas os músculos que participam ativamente do processo de mastigação. Mesmo que estudos venham considerando diferenças entre as espécies, ainda sim são descritas semelhanças da musculatura mastigatória entre ratos e humanos. Desta forma, estudos funcionais e estruturais realizados em ratos, tem se tornado significativo para comparação com estruturas humanas (Porto et al., 2010).

Em pesquisas relacionadas a mamíferos, ratos são muito utilizados devido a seu fácil manuseio, rápido desenvolvimento e ciclo de vida, além do baixo custo para manutenção e alimentação (James et al., 1998). A Odontologia é uma área que faz uso do modelo animal rato para o entendimento de condições patológicas que podem acometer a morfologia craniofacial, como a fissura labial (Persons et al., 2008), protrusão e retrusão facial (Sá, 2010; Lozanoff et al., 1994), além de trabalhos relacionados ao ligamento periodontal (Kadu et al., 2005), testes a partir da alimentação (Cox et al., 2012), arranjo das fibras musculares (Jeffery et al., 2011), morfologia mastigatória em *Mus musculus* (Baverstock et al., 2013), movimentos mandibulares em ratos albinos (Weijs, 1975).

Em mamíferos os músculos da mastigação possuem duas funções, baseadas em suas características distintas, uma de ação física, a partir do movimento da mandíbula e a outra atividade tônica, baseada na estabilização das articulações mandibulares (McNeill, 2000).

De acordo com Baverstock et al. (2013), baseado em estudo da morfologia muscular mastigatória em *Mus musculus*, foram descritos músculos que atuam neste sistema dinâmico e complexo da mastigação, no qual os músculos trabalham em pares, em contração e relaxamento, sendo estes: masseter superficial, masseter profundo, zigomático anterior, zigomático posterior, zigomático infraorbitário, temporal medial, temporal lateral, pterigoideo externo e pterigoideo interno.

Embora os ratos sejam estruturalmente semelhantes aos humanos, em tamanho significativamente reduzido, apresentam uma série de desafios ao tentarmos analisar características anatômicas. A reconstrução tridimensional a partir da tomografia computadorizada é possível e altamente confiável, pois são métodos não destrutivos. Em laboratórios para estudos com estruturas menores, a microtomografia computadorizada (Micro-CT) é uma das tecnologias que vem sendo aplicada (Dhenain et al., 2001).

Com os avanços da tecnologia dos aparelhos de Micro-CT e aumento da velocidade e memórias dos computadores, a obtenção das imagens de alta resolução tem se tornado mais

rotineiro para espécies de pequeno porte durante as pesquisas. Essa técnica passou a ter maior credibilidade e validação nos estudos a partir de 1989, quando Feldkamp e colaboradores mostraram a eficácia do procedimento para avaliação da microarquitetura óssea e morfológica para camundongos e pequenos animais (Feldkamp et al., 1989). Atualmente, é considerado um poderoso método para avaliação e quantificação em uma gama de estudos.

A Micro-CT consiste em raios-x que são adquiridos em vários ângulos para a representação do objeto de estudo, a partir da densidade do material, onde são produzidas imagens em 2D, que são reconstruídas por programas computacionais formando imagem 3D (Vos, Casselman e Swennen, 2009), sendo uma técnica não destrutiva que reconstrói e modela as amostras em escala micrométrica, obtendo informações como a propriedade do material e sua geometria (Argenta et al., 2013).

Os scanners disponíveis para Micro-CT são altamente eficientes, atingindo o voxel isotrópico de alguns micrômetros, sendo suficientes para investigação de estruturas, principalmente de roedores, que são mais comumente estudados (Martin-Badosa et al., 2003). As imagens obtidas apresentam uma excelente reprodutibilidade e precisão dentro das variáveis estabelecidas em diversos estudos.

Os estudos a partir da Micro-CT envolvem experimentos em ratos relacionados com alterações sistêmicas e craniofaciais, os quais já foram descritos em diversos trabalhos (Hassumi et al., 2018, Yougui et al., 2018, Facerani et al., 2018, Stringetta-Garcia et al., 2016). Ainda que os estudos em tecidos ósseos sejam bastante difundidos, a utilização da técnica de Micro-CT para tecido muscular é escassa para ratos Wistar.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo descrever a anatomia dos músculos da mastigação de ratos Wistar, através do emprego da ferramenta tecnológica Micro-CT, dado que a literatura acerca do tema é escassa quando se trata especificamente da linhagem de Wistar.

2 ARTIGO: Morphological characteristics of masticatory muscles in Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) by computed microtomography

Artigo submetido para análise no periódico: Journal of Applied Oral Science (Anexo 1).

ABSTRACT

The association between microCT and iodine based contrast allows to determine the anatomical characteristics of masticatory muscles in rats. The aim of this study was to evaluate the anatomical characteristics of the masticatory muscles of Wistar rats from microCT images. Three male Wistar rats aged two months were used. After euthanasia of the animals, the heads were fixed in formalin solution 10% and then they were washed by deionized water for dissection, which the masticatory muscles were preserved. The pieces were stored in iodine-based contrast (I2KI) with 10% concentration during 1 month. After the action of the contrast, the microCT scanning were performed and the images were imported into the Materialise Mimics v18 software, which the image segmentation for the masticatory muscle was performed according to the muscular structure density. From the segmentation, the three-dimensional surface of each muscle were constructed for the analysis of form, origin, insertion and muscular volume. The results presented the regions of origin located on the surface of different skull bones involving the maxilla, zygomatic, sphenoid and temporal bone. The insertions were located on the surface of the mandible. From the 3D surface as well as the microCT images, it was also possible to determine the direction of muscular fibers. In conclusion, the anatomical characterization of masticatory muscles in Wistar rats was possible through the iodine based contrast, which changed the muscular structure density.

Keywords: Wistar rat, Masticatory Muscles, Morphology, MicroCT.

INTRODUCTION

Studies have used the Wistar rat (*Rattus norvegicus albinus*) as model to evaluate the effects of dental occlusion, especially in pathological conditions, on the periodontal structures (Nozaki et al., 2010; Goto et al., 2011). However, the data related to muscular function during dental occlusion need to be well described, as well as, the study of muscular morphology is fundamental to understand the function (Cox et al., 2011). The challenge to study the anatomy of muscular system is to substitute a destructive method, as the dissection (Friederich & Brand, 1990; Burkholder et al., 1994), for new non-destructive methods involving the magnetic resonance imaging (MRI) (Heemskerk et al., 2005, 2009; Kim et al., 2005) and computed microtomography (microCT). However, the microCT for soft tissue have not well used once due to the low density. Thus, Metscher (2009) used the microCT to analyze soft tissues in embryos and invertebrates by the utilization of iodine contrast, which resulted in increase of image density. From this idea, Jeffery et al., (2011) used this method to create a protocol study applied to the anatomy of muscular system in rodents. This study presented a three-dimensional (3D) view of masticatory muscles.

The advances in anatomical characterization of muscular system allowed functional studies (Cox et al., 2011), once the muscular activity can be associated to the information about muscular origin and insertion of mandibular elevation during biting in mice (*Mus musculus*) (Baverstock et al., 2013).

Although the rich information about masticatory muscle system in rodents, the Wistar rat (*Rattus norvegicus albinus*), which is widely used as experimental model in research involving dental occlusion, lacks in morphological characterization of masticatory muscles. The anatomical study applied to this specie was conducted by dissection (Weijis et al., 1975). Thus, it was possible to determine the anatomical nomenclature, localization, muscular origin and insertion. The use of microCT associated to the application of contrast for anatomical study of muscle structure, it allows determining the anatomical characterization of masticatory muscles of Wistar rat in three-dimensional aspect, as well as by microCT images.

The aim of this study was to analyze the anatomical features of masticatory muscles in Wistar rat by microCT scanning.

MATERIAL AND METHODS

The Ethical Committee on Animals Use CEUA/UNICAMP (Protocol number 4401-1) approved this study.

Sample characterization

Ten adult male rats (*Rattus norvegicus albinus*), Wistar lineage, 2 months old (weight ranging 200-250 g), from the CEMIB-UNICAMP were used in this study. The animals were kept in collective cages (2 animals per cage) with controlled temperature and light cycle and water and food ad libitum. The animals were euthanized by excessive anesthesia. The heads were disarticulated and fixed in formalin-buffered solution during 24h.

Dissection and iodine staining application

A detailed dissection of the heads were performed using special instruments (small size) to remove the skin without damaging the muscle structure for better action of the iodine contrast. Five heads was also used for total dissection of the muscles for studying the morphology, fiber direction and bone insertions to help during image segmentation of microCT images. The dissected pieces were washed by deionized water and immersed in iodine contrast (I2KI), which presented effective application to increase the image density of muscle tissue (Jeffery et al., 2011). In this presented study we used a concentration of 5% and the heads were kept in the contrast during one month. Before the scanning, the pieces were washed in deionized water.

MicroCT scanning and 3D construction

For microCT scanning, we used a SkyScan 1174 microtomography (Bruker, Belgium) configured with 50 kV voltage and 800 μm amperage. The scanning options was selected to obtain an isotropic voxel with 19.41 μm size, 5200 ms exposition time and aluminum filter with 0.5 mm thickness. After scanning, the images were transferred to the software NRecon (Bruker, Belgium) for image reconstruction, resulting in grey scaled images.

All image dataset were imported into the software Materialise Mimics Academic Research v18 (Materialise, Belgium) to perform the segmentation of muscle structures. The segmentation was based on the different density threshold, which was configured according to the grayscale values interval and the muscular fiber organization. After segmentation the 3D surfaces were constructed, featuring the muscles: masseter, temporalis, internal pterygoid,

external pterygoid and zygomaticomandibularis (Weijis et al., 1975). The 3D surface of bone structure was also constructed to characterize the localization of muscle insertions.

Method for anatomical description

From the 3D surface of each muscle and the morphological features by the dissection, the anatomical description followed the parameters: bone insertions, shape and fiber configuration. In addition, the virtual volumes (mm³) were calculated using the same software of 3D construction.

RESULTS

Table 1 shows the volume (in mm³) and the characteristics of origin and insertion of the chewing muscles evaluated.

Table 1. Anatomical characteristics of chewing muscles containing location of origin, insertion and volume (in mm³).

MÚSCLE	VOLUME	ORIGIN	INSERTION
Masseter – Deep	322,16	Zygomatic bone and whole inferior border of zygomatic arch	Lateral surface of mandible
Masseter – Superficial	195,40	Anterior part of alveolar process (maxilla)	Lateral surface f mandible
Zygomaticcomandibullaris – anterior	74,29	Dorsomedial surface of zygomatic arch	Lateral surface f mandible
Zygomaticcomandibullaris – posterior	31,62	Medial surface of posterior part on zygomatic arch	Lateral surface of superior third of mandibular ramus
Zygomaticcomandibullaris – infraorbital	17,41	Concave surface of maxilla	Lateral surface f mandible
Temporallis – lateral	264,52*	Temporal fossae	Lateral and medial surface of coronoid process/ posterior surface of alveolar process
Temporallis – medial		Temporal fossae	Medial surface of mandibular ramus
External pterygoid	48,29	Skull base	Medial surface of condilar process
Internal pterygoid	95,97	Pterygoid process	Medial surface of mandíbular angle

*Total volume including medial and lateral parts

The following section presented an anatomical description of each muscle:

Masseter: Considered the largest chewing muscle in the Wistar rats, the masseter is subdivided into two parts, the superficial and the deep. The superficial part originates in the anterior part

of the alveolar process of the maxilla, with its tendon inserted in the lateral surface near the zygomatic bone and has an insertion in the lateral surface of the mandible, beginning next to the mental foramen occupy the entire base of the mandible until the angular process. Some of its fibers bypass the base of the mandible and insert in the medial surface still at the level of the base of the mandible, from the level of the third molar to the angular process. Its fibers in the posterior region are horizontal towards the anterior part becoming oblique converting in its tendon of origin giving a triangular aspect.

The deep part of the masseter is located medially to the superficial masseter considering its fibers of the inferior region, in the upper part of this muscle it is not covered by the superficial part of the masseter, being thus visible. It has a larger anteroposterior dimension with respect to the superficial part. Its origin begins in the zygomatic bone and extends throughout the zygomatic arch in the inferior border and its insertion occurs in the lateral surface of the jaw, covering great proportion of this surface. The lower border of this muscle follows from the angular process along the masseteric crest. The anterior border begins at the point of greatest curvature between the angular process and the condylar process. As in the superficial part its fibers are arranged parallel in horizontal direction in the back, already in the previous part the fibers are oblique.

Zygomaticomandibularis: The zygomaticomandibularis muscle consists of three distinct parts, anterior, posterior and infraorbital. The most robust is the anterior part, which originates on the dorsomedial surface of the zygomatic arch, anterior to the point of greatest curvature in the medial face of the zygomatic process of the maxilla. Its insertion located on the lateral surface of the mandible, with fixation in part of the coronoid process. This muscle travels obliquely from the first molar towards the coronoid process from where it continues posteriorly until it ends in the notch of the mandible.

The posterior zygomaticomandibular has its origin in the medial surface of the posterior part of the zygomatic arch and its fibers are inserted in the lateral surface of the superior third of the branch of the mandible, surrounding the developmental region of the inferior incisor. The anterior fibers are parallel and vertical, already in the back the fibers are arranged more horizontally. In front of the three portions of the zygomaticomandibularis muscle, the infraorbital is smaller than the others, and has its origin in the concavity of the maxilla, later to the nasal bone, medially to the zygomatic bone, before the orbit. In its path, its fibers pass posteriorly to the orbitary foramen, descending ventrally the alveolar process of the maxilla to insert in the lateral surface of the mandible. The fibers are parallel and oblique in an anterior slope.

Temporalis: The temporalis is the second largest muscle among the muscles. Its divisions are very visible according to the arrangement of its fibers. It is divided into a lateral part with the previously located fibers and a medial part, with fibers located later. Considering the two parts, all its origin occupies the temporal fossa, located on the lateral surface of the temporal bone. The lateral part is inserted partly on the lateral surface of the coronoid process and on the medial surface, extending to the posterior surface of the alveolar process. Considering the two parts, all its origin occupies the temporal fossa, located on the lateral surface of the temporal bone. The lateral part is inserted partly on the lateral surface of the coronoid process and on the medial surface, extending to the posterior surface of the alveolar process. The medial part is inserted into the medial surface of the branch of the mandible. The distinction between the fibers present in the parts of the temporal (medial and lateral) muscle has presented greater difficulty during the segmentation process of the images, since according to Baverstock et al. (2013) found the same difficulty due to the presence of an aponeurosis or fascia overlapping the medial part of the temporalis muscle. The image allowed to visualize the fibers of the lateral part with obliquely sense and part medial in the horizontal direction.

Pterygoid muscles: Analyzing all the masticatory muscle mass of the rats, only 16% is represented by the pterygoid muscle. This muscle in question is also subdivided into external pterygoid and internal pterygoid, separated by septa. The external pterygoid originates from the base of the skull and its insertion into the medial surface of the condylar process, with its fibers extending laterally from the palatine process to the sphenopalatine suture. The internal pterygoid muscle is larger than the external pterygoid muscle and originates from the pterygoid process. Its insertion occurs on the medial surface of the jaw angle, where it almost meets the insertion of the superficial masseter. In its path, it follows medially by the palatine process until the pterygoid fossa. The fibers are parallel and obey the direction of origin for insertion.

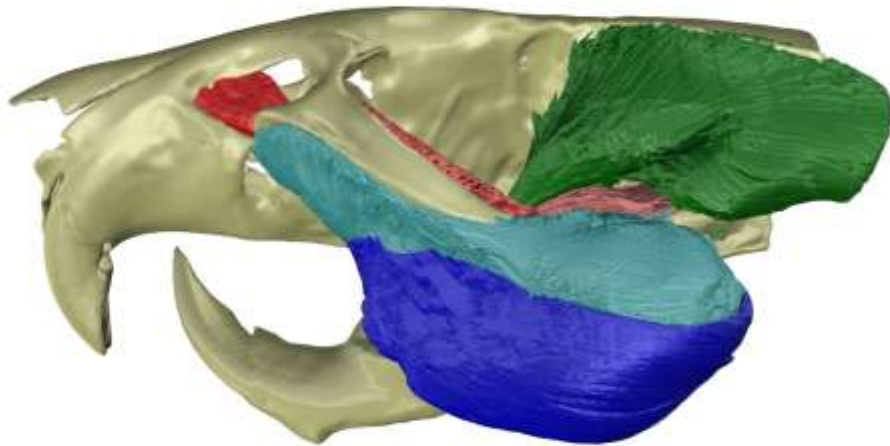


Figure 1. Lateral view of rat skull Wistar lineage with the presence of mastication muscles constructed three-dimensionally from the segmentation of microCT images. Green: Temporallis; Blue: Superficial part (dark) and deep part (light) of masseter muscle; Red: The orbital part (dark), anterior part (middle), posterior part (ligh) of zigmaticomandibularis muscle.

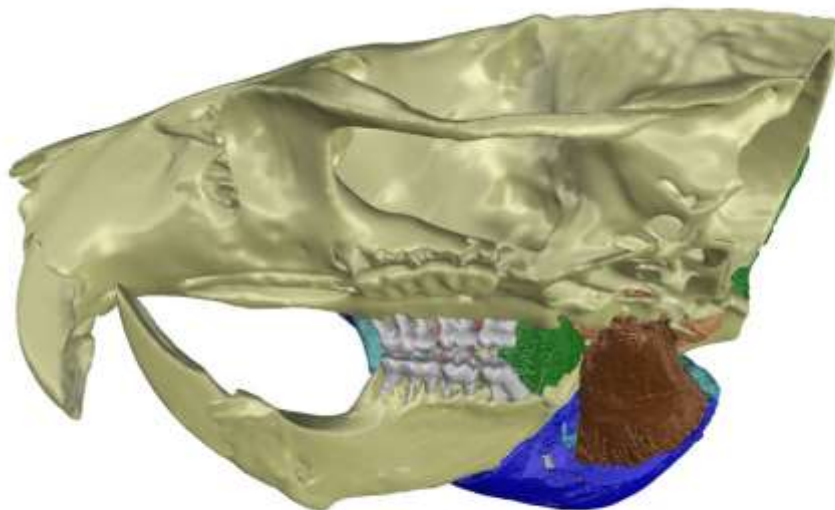


Figure 2. Medial view of rat skull Wistar lineage with the presence of mastication muscles constructed three-dimensionally from the segmentation of microCT images. (Green: m. Temporal; Blue: m. masseter superficial part; Brown: internal pteridoid (dark) and external pterigoid (light)).

DISCUSSION

With the description, it can be verified that the fascia of the temporal muscle made it difficult to visualize the substance of the muscular fibers, both for dissection and for segmentation, fact also observed by Baverstock et al. (2013). We also find that the direction of the fibers in this region is not consistently clear in the contrast evaluation applied in microCT scanning.

The method of altering muscle tissue density by the use of iodine contrast was used effectively in mice through the protocol proposed by Jeffery et al. (2011). These authors demonstrated that the time and concentration factors influence the contrast efficacy, thus concluding an effective protocol characterized by the concentration of 3.75% solution submerged for 7 days. Differently, but with the same efficacy, the protocol used in this study used 10% concentration for 30 days. There is no way to define, with the results obtained in this study, if there is a maximum concentration limit that, once exceeded, compromises the segmentation process of the images. In addition, considering the dimensions of the pieces, the Wistar mouse being larger than the mouse, the higher concentration may be necessary.

We believe that other findings highlighted in this research may provide an interesting comparison with other rodents and mammals. It is also emphasized that this study provides a preliminary basis for a series of experimental applications, mainly in computational simulations. This study will allow the construction of accurate three-dimensional representations in order to allow the exploration of research with questions of biological and functional significance in several experimental situations in the craniofacial region.

CONCLUSION

This study concludes that the anatomical characterization of the muscles involved in the bite of Wistar rats was possible by the use of iodine-based contrast that made it possible to alter the density of the muscular structure and to construct three-dimensional muscles. Thus, it was possible to determine the sites of origin, insertion and muscle volume.

REFERENCES

1. Weijs WA, Dantuma, R. Electromyography and Mechanics of Mastication in the Albino Rat. *J Morphol.* 1975, 146: 1-34.

2. Friederich, JA, Brand, RA. Muscle fiber architecture in the human lower limb. *J Biomech.* 1990, 23: 91-95.
3. Burkholder TJ, Fingado B, Baron S, Lieber RL. Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hind limb. *J Morphol.* 1994, 221: 177-190.
4. Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, Miura H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load – osteopontin induction among periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2005; 40: 59-66.
5. Heemskerk AM, Strijkers GJ, Vilanova A, Drost MR, Nicolay K. Determination of mouse skeletal muscle architecture using three-dimensional diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med.* 2005, 53: 1333-1340.
6. Kim S, Chi-Fishman G, Barnett AS, Pierpaoli C. Dependence on diffusion time of apparent diffusion tensor of ex vivo calf tongue and heart. *Magn Reson Med.* 2005, 54: 1387-1396.
7. Metscher, BD. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiol.* 2009, 9: 11.
8. Nozaki K, Kaku M, Yamashita Y, Yamauchi M, Miura H. Effect of cyclic mechanical loading on osteoclast recruitment in periodontal tissue. *J Periodont Res.* 2010, 45: 8-15.
9. Jeffery NS, Stephenson RS, Gallagher JA, Jarvis JC, Cox PG. Micro-computed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. *J Biomech.* 2011, 44: 189-192.
10. Cox PG, Fagan MJ, Rayfield EJ, Jeffery N. Finite element modeling of squirrel, guinea pig and rat skulls: using geometric morphometrics to assess sensitivity. *J Anat.* 2011, 219: 696-709.

11. Baverstock H, Jeffery NS, Cobb SN. The morphology of the mouse masticatory musculature. *J Anat.* 2013, 223: 46-60.

3 CONCLUSÃO

Este estudo conclui que a caracterização anatômica dos músculos envolvidos na mordida de ratos Wistar foi possível pela utilização do contraste à base de iodo que possibilitou alterar a densidade da estrutura muscular e construir tridimensionalmente os músculos. Assim, foi possível determinar os locais de origem, inserção e o volume muscular.

REFERÊNCIAS*

Argenta, MA.; Buriol, TM; Hecke MB. Metodologia para obtenção de parâmetros físicos e geométricos do osso trabecular função de imagens de micro tomografia. www.grupo.bioengenharia.ufpr.br acessado em 12/03/2018.

Baverstock H, Jeffery NS, Cobb SN. The morphology of the mouse masticatory musculature. *Journal of Anatomy*. 2013;223(1):46-60.

Cox PG, Rayfield EJ, Fagan MJ, et al. (2012) Functional evolution of the feeding system in rodents. *PLoS ONE* 7, e36299.

Dhenain M, Ruffi ns SW, Jacobs RE. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Dev Biol* 2001;232: 458–70.

Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):255-265.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfi tt M, Jesion G, Kleereoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989;14:3–11

Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci*. 2018 Jun 18;26:e20170326.

James J, Hewett T, Robbins J (1998). Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res*. 82:407– 415.

Jeffery N, Stephenson R, Gallagher JA, et al. (2011) Microcomputed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. *J Biomech* 44, 189–192.

Lozanoff S, Jureczek S, Feng T, et al. Morfologia da base craniana anterior em camundongos com retrusão midfacial. *Cleft Palate Craniofac J*. 1994; 31 : 417-428

Martin-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology*. 2003;229:921– 928.

Mc Neill, C. Ciência e prática da oclusão. 1ª ed. Santos, 2015.

Parsons TE, Kristensen E, Hornung L, et al. (2008) Phenotypic variability and craniofacial dysmorphology: increased shape variance in a mouse model for cleft lip. *J Anat* 212, 135–143.

Porto GG, Vasconcelos BCE, Andrade ESS, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. *Acta Cir Bras*. 2010;25(3):290-3.

SÁ, M. P. N. Avaliação da resposta condilar em ratos frente a estímulos de protrusão e retrusão mandibular. Dissertação (Mestrado em Odontologia Integrada) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 2010.

Stringheta-Garcia CT, Singulani MP, Santos LF, Louzada MJ, Nakamune AC, Chaves-Neto AH, Rossi AC, Ervolino E, Dornelles RC. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. *Bone*. 2016 Apr;85:45-54.

Vos, W. D.; Casselman, W. D., Swennwn, G. R. D. Cone beam computadorizes tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: A systematic review of the literature. In. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 38, p. 609-625, 2009.

Weijjs WA, Dantuma R. Electromyography and mechanics of mastication in the albino rat. *J Morphol*. 1975;146(1):1-34.

Yogui FC, Momesso GAC, Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Okamoto R. A SERM Increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. *J Appl Oral Sci*. 2018;26:e20170329.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

ANEXO 1 – Comprovante de submissão no Periódico

ScholarOne Manuscripts™

Alexandre Freire ▾ Instructions & Forms Help Log Out

Journal of Applied Oral Science

Home Author

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- 11 Manuscripts I Have Co-Authored >
- Start New Submission >
- Legacy Instructions >
- 5 Most Recent E-mails >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM Fernal Vakeira	JAOS-2018-0440	Morphological characteristics of masticatory muscles in Wistar rats (Rattus norvegicus albinus) by computed microtomography View Submission	15-Jul-2018	15-Jul-2018
• Awaiting Admin Processing				

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Parents #1 251 767 and #1 263 655

SCHOLARONE™

Clarivate Analytics

ANEXO 2 – Certificado do Comitê de Ética



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto Caracterização da morfologia dos músculos da mastigação do rato da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) em microtomia computadorizada foi desenvolvido no âmbito do projeto ANÁLISE DE ELEMENTOS FINITOS E DE VOLUME ÓSSEO DO OSSO ALVEOLAR MANDIBULAR EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À HIPOFUNÇÃO OCLUSAL (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4401-1), de responsabilidade da Profa. Dra. Ana Cláudia Rossi e Juliana Haddad.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 06/04/2017.

Campinas, 26 de junho de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Fátima-Alonso
Secretária Executiva