

## Aspectos histológicos e ultraestruturais da língua em ratos desnutridos

## Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats

Marilda Aparecida Milanez Morgado de Abreu<sup>1</sup>,  
Luc Louis Maurice Weckx<sup>2</sup>, Cleonice Hitomi  
Watasbi Hirata<sup>3</sup>

Palavras-chave: desnutrição protéico-calórica, histologia, língua, microscopia eletrônica de varredura.  
Keywords: protein-energy malnutrition, histology, tongue, scanning electron microscopy.

### Resumo / Summary

Poucos estudos sobre os efeitos da desnutrição protéico-calórica na mucosa oral são encontrados na literatura. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho é verificar os efeitos da desnutrição protéico-calórica na mucosa da língua de ratos adultos, envolvendo microscopia óptica e eletrônica de varredura. **Materiais e Métodos:** Um estudo experimental foi realizado em trinta ratos Wistar, 15 controles e 15 com desnutrição protéico-calórica. O último grupo recebeu ração em pequena quantidade, com menor conteúdo de caseína, durante 45 dias. Os ratos foram pesados a cada 3 dias, do primeiro (90 dias de vida) ao último dia (45 dias de dieta), quando foram sacrificados. Foi realizada eletroforese de proteínas plasmáticas e as línguas foram preparadas para microscopia óptica comum e eletrônica. Para análise estatística utilizou-se análise de variância e teste T de Student. **Resultados:** Foi observada uma significativa diminuição no peso e nas proteínas plasmáticas dos ratos com desnutrição protéico-calórica em relação ao grupo controle. A análise histológica não mostrou diferenças entre os dois grupos, e os resultados, com respeito à contagem das papilas filiformes da mucosa lingual pela microscopia eletrônica, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. **Conclusão:** A desnutrição protéico-calórica não causa alterações na mucosa da língua de ratos adultos.

There are few published studies on the effects of protein-caloric undernourishment on the oral mucosa. **Objectives:** The objective of this study is to verify the histological and ultrastructural aspects of the tongue mucosa in protein-caloric undernourished adult rats. **Material and Methods:** A clinical experimental study was done in thirty Wistar rats, 15 controls and 15 with protein-caloric undernourishment. The last group received ration in small amounts, with a reduced casein content, during 45 days. Rats were weighed every 3 days, from the first (90 days of life) to the last day of a 45-day dietary period, when they were sacrificed. Plasma was used for protein electrophoresis and their tongues were prepared for light and scanning electron microscopy. Analysis of variance and Student's t-test were used for statistical analysis. **Results:** A significant decrease in weight and in plasma proteins was found in protein-caloric undernourished rats compared to the control group. Histological findings revealed no differences between the two groups and there were no statistically significant differences in the filiform papilla count under the scanning electron microscopy. **Conclusion:** Protein-caloric undernourishment does not cause alterations in the tongue mucosa of adult rats.

<sup>1</sup> Mestre, Pós-graduanda, Setor de Estomatologia, Departamento de Otorrinolaringologia e Distúrbios da Comunicação Humana e Departamento de Dermatologia; Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.

<sup>2</sup> Livre-Docente, Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia Pediátrica e Distúrbios da Comunicação Humana e Chefe do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia da Cabeça e Pescoço, Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.

<sup>3</sup> Mestre, Doutora, Chefe do Setor de Estomatologia, Departamento de Otorrinolaringologia e Distúrbios da Comunicação Humana e Departamento de Dermatologia; Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.

Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

Endereço para correspondência: Marilda Aparecida Milanez Morgado de Abreu - Rua Brasil 1599 Centro Dracena SP 17900-000

Tel: (0xx18) 3821-4630 - Fax: (0xx18) 3821-2276 - E-mail: lfmabreu@uol.com.br

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 17 de outubro de 2005.

Artigo aceito em 5 de maio de 2006.

## INTRODUÇÃO

Embora muitas manifestações clínicas na boca, tais como atrofia da mucosa lingual, perda de papilas e queilite angular, sejam frequentemente relacionadas à etiologia nutricional, há poucos estudos sobre os efeitos da desnutrição protéico-calórica na mucosa oral, particularmente na língua<sup>1-4</sup>.

Winkler e Nakamoto, em 1982<sup>5</sup>, estudaram os efeitos da desnutrição pré-natal no desenvolvimento tecidual da cavidade oral em ratos recém-nascidos. Descreveram nos animais desnutridos alterações histológicas na língua, demonstrando que as células eram em número menor, mas maiores em tamanho. A desnutrição também afetou germes dentais dos dentes incisivo e molar. Os resultados indicaram que uma ingestão adequada de proteína é extremamente importante para o desenvolvimento saudável dos dentes e da língua.

Aldred et al., em 1989<sup>6</sup>, relataram o aumento de leveduras na boca de crianças desnutridas sem outras alterações clínicas evidentes.

O objetivo deste trabalho é o estudo dos efeitos da desnutrição protéico-calórica na mucosa da língua de ratos adultos, envolvendo microscopia óptica e eletrônica de varredura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental em trinta ratos variedade "WISTAR", com 90 dias de idade, pesando de 180 a 220 gramas. Os animais foram colocados em gaiolas individuais de tamanho 40 x 20 x 13 cm contendo serragem e água sem restrições.

Os animais foram randomizadamente divididos em dois grupos de 15 ratos cada. O primeiro grupo (controle) recebeu ração composta de caseína (18%), milho (4%), sal (4%), polivitaminas (1%), benzoato (0.1%), óleo (8%), açúcar (10%), amido de milho q.s.q. (100%). O segundo grupo (com desnutrição protéico-calórica) recebeu uma ração similar, mas com alterações na composição relativas ao conteúdo de caseína, de 18% no grupo controle e de 1% no grupo do estudo, dadas na quantidade de 6 gramas/dia.

Os ratos eram pesados a cada 3 dias, do primeiro dia (90 dias de vida) ao último dia do período de 45 dias de dieta. Nessa data, os animais, após terem sido pesados, eram sacrificados por decapitação usando uma guilhotina. Após coleta de sangue, o plasma obtido pela centrifugação foi usado para a realização de eletroforese de proteínas.

A língua foi cortada e completamente removida. A porção anterior foi dividida em fragmentos para microscopia óptica comum e eletrônica.

Os fragmentos foram incluídos em parafina e os cortes obtidos, usando micrótomo, foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram

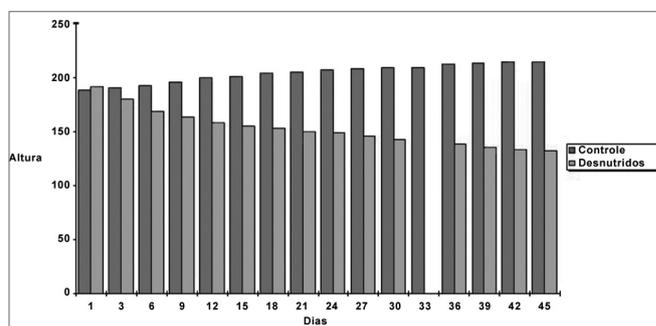
estudadas sob um microscópio óptico comum com um aumento de 50 a 400 vezes, considerando os seguintes parâmetros: presença ou ausência de uniformidade nas camadas epiteliais; presença ou ausência de infiltrado inflamatório na lâmina própria; presença ou ausência de áreas com perda de papilas (papilas filiformes e fungiformes) na metade anterior da língua. No primeiro caso, presença ou ausência de uniformidade nas camadas epiteliais, uniformidade foi considerada como a distribuição regular das camadas com maturação celular similar.

Com relação à microscopia eletrônica, foram estudados 7 casos do grupo controle e 7 casos do grupo de ratos com desnutrição protéico-calórica. O número de papilas filiformes da língua foi considerado como um parâmetro neste estudo e sua contagem foi feita por fotos obtidas do material proveniente da microscopia eletrônica, usando um filme branco e preto VP 120. Os critérios de inclusão foram os seguintes: contagem do número de papilas filiformes íntegras (com uma base e uma projeção cônica), contadas nas fotos ampliadas em 100 vezes no tamanho de 9X9 cm usando uma área de 2.3 cm<sup>2</sup> de tamanho, e em cada caso contando 5 a 10 áreas; papilas tangenciais às bordas esquerda e inferior dessas áreas eram incluídas; papilas tangenciais às bordas direita e superior eram excluídas; áreas com papilas fungiformes eram excluídas<sup>7</sup>.

Para a análise estatística dos resultados, foi usada análise de variância para comparar a média dos pesos dos animais, a eletroforese de proteínas e a contagem do número de papilas. Para estudar as diferenças entre as duas amostras foi usado o teste T de Student para amostras independentes<sup>8</sup> com nível de significância de 0.05 ou 0.5%.

## RESULTADOS

Em relação ao peso corpóreo dos dois grupos, foi observado um aumento no peso dos animais controle durante o período de 45 dias e uma diminuição nos animais com desnutrição protéico-calórica. A análise estatística revelou uma diferença significativa entre as amostras no 45º dia, como pode ser visto no Gráfico 1.



**Gráfico 1.** Histograma das médias do peso corporal dos ratos dos grupos controle e com desnutrição protéico-calórica durante o período de 45 dias.

Os resultados com respeito ao perfil da eletroforese das proteínas plasmáticas no 45º dia revelaram uma diminuição significativa nas proteínas plasmáticas total no grupo com desnutrição protéico-calórica quando comparado ao grupo controle (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Resultados da eletroforese das proteínas plasmáticas dos ratos, nos grupos controle e com desnutrição protéico-calórica, no 45º dia (medidas de proteínas totais em unidades densitométricas).

Caso	Grupo controle	Grupo com desnutrição protéico-calórica
1	280	210
2	310	200
3	310	215
4	270	200
5	300	230
6	270	205
7	320	200
8	288	215
9	276	220
10	337	230
11	327	200
12	300	220
13	317	259
14	280	260
15	326	250
Média	301	221
Desvio padrão	22	20

**Tabela 2.** Análise de variância dos resultados de densitometria da eletroforese total dos ratos nos grupos controle e com desnutrição protéico-calórica.

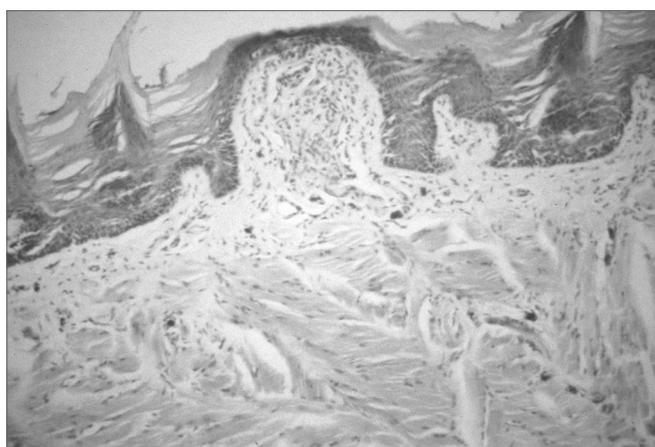
Fontes de variações	Graus de liberdade	Teste	
		T calc	T crit.
Ratos com desnutrição protéico-calórica	14	10,04	(*) 2,05
Ratos do grupo controle	14		
	28		

Em relação à microscopia óptica comum, a análise dos achados histológicos não mostrou diferenças entre os grupos controle e com desnutrição protéico-calórica, com respeito aos parâmetros considerados (Figuras 1 e 2).

Os resultados referentes ao estudo histológico, à microscopia óptica comum, da mucosa lingual nos ratos dos grupos controle e nos ratos com desnutrição protéico-



**Figura 1.** Fotomicrografia de secção sagital de papila filiforme. Epitélio estratificado de mucosa lingual normal dos ratos do grupo controle - Ampliação 100X.



**Figura 2.** Fotomicrografia de secção sagital de papila filiforme. Epitélio estratificado de mucosa lingual normal dos ratos com desnutrição protéico - calórica - Ampliação 100X.

calórica demonstraram presença de epitélio estratificado com camadas uniformes em 15 casos de ambos os grupos. Nenhum dos dois grupos apresentou infiltrado inflamatório ou áreas com perdas de papilas. Observou-se ceratinização da face ventral da língua em 2 casos do grupo controle, o que não ocorreu em nenhum caso do grupo com desnutrição protéico-calórica, sendo que a camada de ceratina estava espessada em 1 caso do grupo controle, alteração esta também não observada no grupo com desnutrição protéico-calórica.

Os resultados referentes à contagem das papilas filiformes na mucosa lingual dos ratos dos grupos controle (7 casos) e dos com desnutrição protéico-calórica (7 casos) pela microscopia eletrônica não revelou diferenças estatisticamente significante entre os dois grupos, como pode ser observado nas Tabelas 3, 4 e 5 (Figuras 3 e 4).

**Tabela 3.** Contagem das papilas filiformes da metade anterior da língua por unidade de área de 2.3 cm<sup>2</sup>. Ampliação 100x; grupo controle (eletromicroscopia).

Grupo controle	Número de papilas por área considerada					
	C1	11	13	9	11	9
C2	15	14	17	15	16	
C3	18	17	17	17	17	
C4	17	20	20	17	17	
C5	10	10	8	9	10	11
C6	11	13	11	13		
C7	12	11	13	12	12	
Média	13,44					
Desvio padrão	3,3					
Soma	484					
Soma dos quadrados	6900					

**Tabela 4.** Contagem das papilas filiformes da metade anterior da língua por unidade de área de 2.3 cm<sup>2</sup>. Ampliação 100x; grupo com desnutrição protéico-calórica (eletromicroscopia).

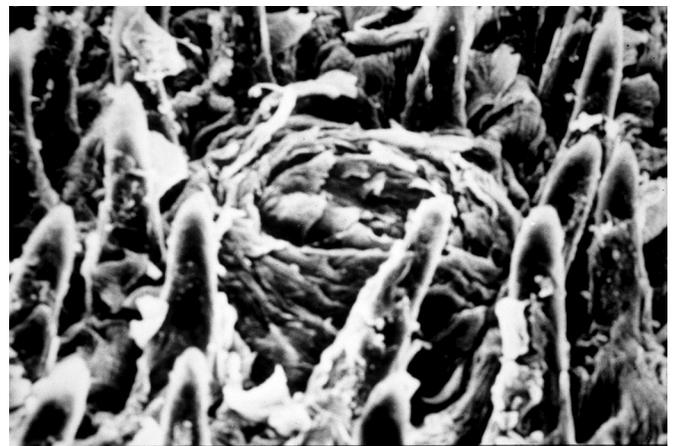
Grupo com desnutrição protéico-calórica	Número de papilas por área considerada					
	D1	17	18	15	19	15
D2	16	14	10	12		
D3	11	12	14	11		
D4	14	14	15			
D5	13	12	10	11	15	10
D6	11	11	11	14		
D7	11	11	11	12		
Média	13					
Desvio padrão	2,41					
Soma	390					
Soma dos quadrados	5244					

**Tabela 5.** Análise de variância do número de papilas filiformes da metade anterior da língua por unidade de área.

	Graus de liberdade	Teste	
		Tcalc	Tcrit
No de papilas nos ratos com desnutrição protéico-calórica	30	0.60	2.00
No de papilas nos ratos do grupo controle	36		
Total	66		



**Figura 3.** Fotomicrografia da metade anterior da superfície dorsal da língua de rato adulto. Papilas filiforme e fungiforme com papila gustatória sobre o seu topo. Grupo controle. Ampliação original de 200X.



**Figura 4.** Fotomicrografia da metade anterior da superfície dorsal da língua de rato adulto evidenciando papila que inclinou na direção ântero-posterior. Grupo com desnutrição protéico-calórica. Ampliação original de 200X.

## DISCUSSÃO

A desnutrição é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, sendo a protéico-calórica uma das formas mais graves de desnutrição. Afeta especialmente crianças dos países mais pobres, onde apresenta uma alta prevalência, estimada em cerca de 1/3 na faixa etária de zero a cinco anos<sup>9</sup>.

A Organização Mundial da Saúde define desnutrição protéico-calórica como “a gama de condições patológicas que aparecem por deficiências de aporte, transporte ou utilização de nutrientes por células do organismo, associadas quase sempre às infecções, ocorrendo com maior frequência em lactentes e pré-escolares”<sup>10</sup>.

A desnutrição protéico-calórica é causa de várias manifestações clínicas, e as alterações mais aparentes são aquelas que se verificam nas medidas e no peso, tanto

do corpo como um todo quanto dos diversos órgãos. Ela ocorre numa seqüência que varia desde a deficiência protéica exclusiva (Kwashiorkor) até a deficiência protéica e calórica (Marasmo)<sup>11</sup>. No homem, a deficiência nutricional nunca é exclusivamente calórica ou protéica, ocorrendo sempre a associação de ambas.

Na medicina há uma forte associação entre desnutrição protéico-calórica e hipovitaminose com quadros clínicos de glossite e mesmo estomatites em geral<sup>14</sup>. Neste estudo, a dieta hipoprotéica e hipocalórica durante 45 dias produziu uma desnutrição efetiva aos 90-dias de idade nos ratos, como mostrado pelas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com desnutrição protéico-calórica e controle, com relação tanto à perda de peso quanto à diminuição nas proteínas totais. Entretanto, o estudo histológico do epitélio da língua dos ratos submetidos à desnutrição protéico-calórica, tanto sob a microscopia óptica comum, quanto sob a microscopia eletrônica, não revelou alterações como glossite ou perda das papilas filiformes da língua.

Na revisão da literatura não há trabalhos sobre os efeitos da desnutrição protéico-calórica especificamente sobre a mucosa lingual ou oral. Um único trabalho descreve alterações na desnutrição pré-natal<sup>5</sup>. Em contraste, há vários relatos sobre as alterações clínicas, histológicas ou ultraestruturais da mucosa lingual na anemia por deficiência de ferro, sobretudo durante a gravidez e puerpério<sup>1-4,12</sup>, e para a deficiência de vitamina, particularmente deficiência de vitamina B<sup>12,13</sup>, que descrevem na mucosa lingual alterações tais como lobulações, fissuras, edema e perda de papilas. Esses estudos estão em concordância com a nossa prática clínica diária, na qual são observados quadros de glossite ou perda de papilas lingual em pacientes com anemia por deficiência de ferro, enquanto que na desnutrição protéico-calórica, freqüente em nosso meio, não se observa alterações clínicas evidentes na mucosa lingual.

Certo limite ocorrido na metodologia empregada nos impede de afirmar que não há qualquer alteração na mucosa lingual nos animais submetidos à desnutrição protéico-calórica, já que estudamos animais somente na fase adulta. Se também tivéssemos estudado animais na fase de crescimento ou ainda na fase pré-natal, onde a desnutrição os afeta com maior intensidade, talvez tivéssemos encontrado alguma alteração evidente. Um outro aspecto a considerar seria o do tempo de desnutrição. Uma desnutrição crônica, como descrevem alguns autores<sup>11,14</sup>, talvez poderia levar a alterações. Portanto, esse estudo abre campo para novos grupos e novos métodos.

A busca do entendimento do que ocorre na mucosa da língua na desnutrição protéico-calórica, usando outra espécie animal, traz a difícil tarefa da extrapolação dos resultados obtidos nesses animais para os seres humanos. Apesar de não termos encontrado na literatura estudos comparando a mucosa da língua entre as distintas espécies, sabe-se que o rato tem similaridades biológicas que o aproximam dos seres humanos, sendo o animal mais

utilizado em estudos experimentais<sup>15</sup>.

Finalizando, para nós, o fato de considerarmos o conceito de glossite ligado à desnutrição ou hipovitaminose em geral, não significa que estejamos excluindo a possibilidade de novas revisões sobre o assunto, pois a busca de outras causas deverá constituir sempre objeto de pesquisa. Novos estudos, usando um tempo mais prolongado de desnutrição crônica protéico-calórica, ou realizados em animais nas fases de desenvolvimento, ou mesmo na fase pré-natal, poderia adicionar outros elementos para elucidar essa questão.

## CONCLUSÃO

Do estudo histológico e ultra-estrutural da mucosa da metade anterior da língua de ratos com 90 dias de vida, submetidos à desnutrição protéico-calórica por 45 dias, pode-se concluir que:

- A desnutrição protéico-calórica não causa alterações na mucosa da língua de ratos adultos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steele B, Sofaer JA, Southam JC. Short communication lingual epithelial thickness in mice with inherited iron-deficiency anaemia (sla). *Arch Oral Biol* 1981;26:343-4.
2. Rennie JS, MacDonald DG. Cell kinetics of hamster ventral tongue epithelium in iron deficiency. *Arch Oral Biol* 1984;29(3):195-9.
3. Rennie JS, MacDonald DG. Quantitative histological analysis of the epithelium of the ventral surface of hamster tongue in experimental iron deficiency. *Arch Oral Biol* 1982;27:393-7.
4. Scott J, Valentine JA, Hill CA et al. Morphometric analysis of atrophic changes in human lingual epithelium in iron deficiency anaemia. *J Clin Path* 1985;38:1025-9.
5. Winkler MM, Nakamoto T. Effects of prenatal malnutrition on development of oral tissue in neonatal rats. *Ann Nutr Metab* 1982;26:248-53.
6. Aldred MJ, Arendorf TM, Wade WG et al. Frequency and density of yeasts in the mouths of malnourished children. *Comm Dent Oral Epid* 1989;17(3):136-8.
7. Loud AV, Anversa P. Biology of disease. Morphometric analysis of biologic processes. *Lab Invest* 1984;50:250-61.
8. Siegel S. Estatística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. 2ª ed., Editorial Trillas: México, 1975; p.346.
9. Onis M, Habicht J. Anthropometric reference data for international use: recommendations from a World Health Organization Expert Committee. *Am J Clin Nutr* 1996;64(4):650-8.
10. SISVAN. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília: SISVAN-INAN 1991: [Boletim Nacional nº1].
11. Alves DC. Desnutrição. In: Augusto ALP, Alves DC, Mannarino IC, Gerude M, organizadores. *Terapia nutricional*. São Paulo: Atheneu; 1995. p.220.
12. Hjorting-Hansen E, Bertram V. Oral aspect of pernicious anaemia. *Brit Dent J* 1968;125(6):266-70.
13. Pindborg JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa, 4th., Saunders: Copenhagen, 1985; p.130-49.
14. Batista Filho M. Prevalência e estágios da desnutrição protéico-calórica em crianças da cidade de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1976.
15. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente / Animal disease model: choice s criteria and current animals specimens. *Acta Cir Bras* 2004;19(1):59-65.