
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA LÍNGUA DE
CAMUNDONGOS *MDX***

ANDRÉ NERI TOMIATE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA LÍNGUA DE
CAMUNDONGOS *MDX***

ANDRÉ NERI TOMIATE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

T657c Tomiate, André Neri
Características estruturais e ultraestruturais da língua de
camundongos mdx / André Neri Tomiate. -- Rio Claro, 2022
64 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Morfologia. 2. Distrofia Muscular de Duchenne. 3. Língua. 4.
Papilas Linguais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRAESTRUTURAIS DA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS MDX

AUTOR: ANDRÉ NERI TOMIATE

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Adriano Polican Ciena:

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)

Departamento de Educação Física / UNESP Instituto de Biociências de Rio Claro

Prof. Dr. BRUNO CESAR SCHIMMING (Participação Virtual)

Departamento de Anatomia / Unesp - Instituto de Biociências de Botucatu



Prof. Dr. AMILTON CESAR DOS SANTOS (Participação Virtual)

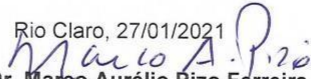
Departamento de Ciências Morfológicas / Centro Universitário Função de Ensino Octávio Bastos



Rio Claro, 26 de maio de 2022

DECISÃO CEUA Nº 03/2021

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 24.09.2020	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Repercussão da Distrofia Muscular de Duchenne nas papilas gustativas frente ao processo degenerativo miofibrilar: características estruturais, ultraestruturais e moleculares na língua de camundongos mdx", protocolo nº 2381, sob responsabilidade de André Neri Tomiate (Pesquisador Responsável) e Adriano Polican Ciena (Orientador), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	
Colaboradores:	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 44ª reunião ordinária , realizada em 27.01.2021 :	
☒ (x)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Não Aprovou.
☐ ()	Retirou , devido à permanência das pendências.
Vigência da autorização: 01/12/2020 a 01/06/22 Finalidade: ☐ () Ensino ☒ (x) Pesquisa Científica Espécie/linhagem/raça: camundongo heterogênico- Número de animais: 25- Peso: 25 g Idade: 6 meses Sexo: M Espécie/linhagem/raça: camundongo isogênico- Número de animais: 25- Peso: 25 g Idade: 6 meses Sexo: M Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério de criação e experimentação de camundongos da Universidade Federal do ABC – UFABC- Santo André -SP	
Objetivo Acadêmico:	☐ () TCC ☒ (X) Mestrado ☐ () Doutorado ☐ () Outros – (Iniciação Científica) ☐ () Pós- Graduação

Rio Claro, 27/01/2021

 Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira
 Coordenador

Agradecimentos

Agradeço minha mãe, pai e irmão por todo o auxílio direto e indireto. Sei que os esforços para me ajudar de todas as formas possíveis não foram simples, na graduação e durante o mestrado. Das bolas de isopor a até mesmo evitar grandes barulhos durante as inúmeras videoconferências realizadas durante a pandemia.

Agradeço o Laboratório de Morfologia e Atividade Física e seus integrantes. Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, por toda a paciência, revisões de artigos (inclusive as de finais de semana) e cobrança por uma “visão artística” para a organização dos resultados. Jurandyr, Lara, Carolina e Gabriela pela incrível receptividade de cada um de vocês e auxílios em ótimas discussões acadêmicas.

Em um período pandêmico e de grandes distâncias, guardo com todo o carinho pelos que me apoiaram das mais diversas formas. Tenho enorme apreço e gratidão por aqueles que sempre me possibilitaram momentos de risadas em um período tão tenebroso. Esther (maior nome do transporte alternativo), Gabi (microbióloga e microbiologista), Amanda (sempre indecisa), Felipe (que ficará sem descrição por falta de características marcantes), além é claro do Emygdio, saudoso técnico do departamento de Biodiversidade (não mais Zoologia, infelizmente) que em 1996 tinha 10 anos, Emygdio. Com vocês vislumbro um futuro melhor e faço do presente um momento de resiliência.

Agradeço a Beatriz Garcia Gonçalves e ao Bestiário Brasileiro pela ilustração.

Agradeço aos animais que cederam a vida para que essa pesquisa pudesse ocorrer. O respeito à vida é fundamental em todas as práticas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) pela formação. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço também a todos aqueles que possibilitaram o enfrentamento na maior crise sanitária que minha geração viu até o momento. Há esperança porque muitos não se resignaram em meio as adversidades. Portanto, agradeço todos aqueles que resistem em meio a desertificação dos investimentos em pesquisa.

Novamente não citei todos aqueles que estiveram comigo ou que de alguma forma me auxiliaram. Ressalto o que também escrevi nos agradecimentos do TCC: para todos aqueles que me ajudaram, não se sintam ofendidos por não terem sido citados, pois lembro de todos vocês e tenho plena convicção que todos possibilitam para que eu siga me esforçando cada vez mais para me tornar uma pessoa e profissional melhor. Muito obrigado.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos. ”

Marie Skłodowska-Curie

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) consiste em uma patologia ligada ao cromossomo X que acomete humanos e caracteriza-se por ciclo de degeneração e regeneração das fibras musculares, ocasionando na deposição de tecido conjuntivo e adiposo na musculatura. Nos estágios iniciais, o comprometimento motor é característico, entretanto outras regiões também apresentam alterações, como as musculaturas da cavidade oral. Associadas na deglutição alimentar, os diferentes músculos mastigatórios apresentam alterações que causam dificuldades na deglutição. Para o estudo da DMD, o modelo animal mais utilizado é o camundongo *mdx*, apesar de existir a caracterização da musculatura da língua, as repercussões na mucosa lingual ainda não foram evidenciadas. O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as alterações morfológicas estruturais e ultraestruturais do epitélio, lamina própria e musculatura da língua de camundongos *mdx*. Foram utilizados 40 camundongos com 6 meses de idade organizados em dois grupos: Grupo Controle: n = 20 (C57bl/10) e *mdx*: n = 20 (C57bl/10^{*mdx*}). As amostras foram processadas para análises estruturais, tridimensionais e ultraestruturais sob técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Estavam presentes papilas filiformes cônicas e triangulares, fungiformes, folhadas e valadas, e seus respectivos tecidos conjuntivos associados. As papilas triangulares filiformes apresentaram múltiplas pontas devido a maior desgaste. O epitélio foi caracterizado estratificado em camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal, o grupo *mdx* apresentou maior espessura nas diferentes regiões do corpo da língua. A lâmina própria possui composição de fibras de colágeno de coloração avermelhada e esverdeada, no grupo *mdx*, houve maior densidade de fibras colágenas. A região da submucosa apresentou glândulas mucosas e serosas com a presença de colágeno adjacente, aumento da área das glândulas mucosas e diminuição das serosas no grupo *mdx*. A musculatura dos camundongos *mdx* foi caracterizada pela grande deposição de colágeno entre as fibras, miocitólise e foco inflamatório. Em conclusão, a língua de camundongos *mdx* com 6 meses de idade teve os aspectos morfológicos, estruturais e ultraestruturais evidenciados, a distrofia proporcionou alterações indiretas na morfologia na espessura epitelial e desgaste das papilas, e direta na composição da lâmina própria, submucosa e musculatura dos camundongos *mdx*.

Palavras-chave: língua; epitélio; papilas linguais; Distrofia Muscular de Duchenne.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) consists of a pathology related to the X chromosome that affects humans and characterized by a cycle of degeneration and regeneration of muscular fiber, causing deposition of connective and adipose tissue on the musculature. In the early stages, the motor commitment is very characteristic; however in other regions also have alterations, as the oral cavity musculature. Associated with food swallowing, the different masticatory muscles present changes that provide difficulties during feeding. For the study of DMD, animal models are used and the *mdx* mouse is the more common, although there is a characterization of the tongue musculature, aspects of the lingual mucosa have not yet been evidenced. The aim of the study was describe changes in structural and ultrastructural morphological characteristics of the epithelium, lamina propria and tongue musculature of *mdx* mice. Forty mice with 6 months-old were used, organized into two groups: Control Group: n = 20 (C57bl/10) and *mdx*: n = 20 (C57bl/10^{*mdx*}). Samples were processed for structural, tridimensional and ultrastructural analysis under light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Our results showed conical and triangular filiform, fungiform, foliate, and vallate papillae, and its connective tissue cores. The filiform triangular papillae showed multiple tips due to increased wear. The epithelium was characterized stratified into layers: keratinized, granular, spinous and basal, and different regions of the tongue's body had thicker epithelium in the *mdx* group. The lamina propria has a composition of reddish and greenish collagen fibers, in the *mdx* there was a higher density of collagen fibers. The region of submucosa had mucous and serous glands with the presence of adjacent collagen, higher area of mucous glands and lower area of serous glands in *mdx* group. The musculature of *mdx* mice was characterized by large collagen deposition between fibers, myocytolysis and inflammatory focus. In conclusion, the tongue of *mdx* mice with 6 months-age had the morphological, structural and ultrastructural aspects evidenced; dystrophy provided indirect changes in the epithelium thickness and wear of papillae and direct changes in the composition of the lamina propria, submucosa, and musculature of the *mdx* mice.

Keywords: tongue; epithelium; lingual papillae, Duchenne Muscular Dystrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Posição característica da marcha miopática	14
Figura 2.	Camundongo <i>mdx</i>	15
Figura 3.	Ilustração da superfície da língua de humanos	17
Figura 4.	Músculos extrínsecos e intrínsecos da língua.....	19
Figura 5.	Microscopia de luz das papilas filiformes na língua da cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>).....	21
Figura 6.	Microscopia de luz da papila fungiforme da cutia	22
Figura 7.	Microscopia de luz da papila folhada da cutia	22
Figura 8.	Microscopia de luz da papila valada da cutia	23
Figura 9.	Ilustração da língua de camundongos.	28
Figura 10.	Microscopia de luz das papilas do corpo da língua de camundongos.	30
Figura 11.	Microscopia de luz da lâmina própria da língua de camundongos.	31
Figura 12.	Microscopia de luz do músculo estriado esquelético da língua de camundongos	32
Figura 13.	Microscopia de luz das papilas folhadas e valadas da língua de camundongos.	33
Figura 14.	Microscopia de luz das glândulas da língua de camundongos	35
Figura 15.	Microscopia eletrônica de varredura das papilas do corpo da língua de camundongos.	37
Figura 16.	Microscopia eletrônica de varredura das papilas da proeminência da língua de camundongos.....	38

Figura 17.	Microscopia eletrônica de varredura das papilas folhadas da língua de camundongos.	39
Figura 18.	Microscopia eletrônica de varredura das papilas valadas de camundongos.	40
Figura 19.	Microscopia eletrônica de transmissão da mucosa de camundongos	41
Figura 20.	Microscopia eletrônica de transmissão do tecido muscular da língua de camundongos	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CADI	Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais.
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne.
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HE	Hematoxilina e Eosina.
IB	Instituto de Biociências.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<i>mdx</i>	Muscular Dystrophy linked to X chromosome (Distrofia muscular ligada ao cromossomo X).
NaOH	Hidróxido de Sódio.
PS	Picro-sírius red.
SP	São Paulo.
TCA	Tecido Conjuntivo Associado.
UNESP	Universidade Estadual Paulista.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Distrofia Muscular de Duchenne	13
2.2 Modelos Experimentais para DMD	14
2.3 Língua	16
2.3.1 Papilas linguais	20
3. OBJETIVO	24
3.1 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Animais	25
4.2 Microscopia de Luz	25
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	26
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Análises Macroscópicas	28
5.2 Microscopia de Luz	29
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	36
5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I	55

1. INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) consiste em um distúrbio ligado ao cromossomo X, ou seja, é uma herança genética ligada ao sexo e por conta disso acomete majoritariamente indivíduos com genótipo XY (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015). Essa alteração ocorre no gene responsável por codificar a proteína denominada de distrofina, fundamental na membrana das células musculares, e sua ausência causa progressiva degeneração muscular (HOFFMAN et al., 1987).

A alteração genética proporciona degeneração muscular, modificações no diâmetro e comprimento das fibras e necrose tecidual, além da deposição de tecido conjuntivo fibroso intersticial e tecido adiposo intramuscular que resultam em comprometimento motor (CROS et al., 1989; DECONINCK; DAN, 2007; ALLEN et al., 2016).

O quadro clínico da DMD apresenta diferentes estágios e características, inicia-se durante a infância e manifesta-se pelo acometimento motor que ocasiona quedas, além da pseudo-hipertrofia do músculo gastrocnêmio (HOFFMAN et al., 1987). Na idade adulta, a DMD proporciona alterações no músculo diafragma que causa comprometimento cardiorrespiratório (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015).

A DMD também afeta os músculos associados a mastigação, estes apresentam modificações que causam dificuldade com a deglutição alimentar que se agravam com o envelhecimento (PANE et al., 2006; ALOYSIUS et al., 2008; ENGEL-HOEK et al., 2016). A redução da força da musculatura da língua proporciona uma menor pressão da mesma contra o palato, e assim dificulta a ingestão de alimentos sólidos (ENGEL-HOEK et al., 2013).

Para a compreensão da patologia, utiliza-se como modelo animal a linhagem isogênica de camundongo *mdx* (*Muscular Dystrophy linked to X chromosome*, distrofia muscular ligada ao cromossomo X) (BULFIELD et al., 1984; VAINZOF et al., 2008). Embora existam estudos em modelo animal que abordem a degeneração dos músculos envolvidos na mastigação como: masseter, temporal e língua aos 100 dias de idade (SPASSOV et al. 2010), as repercussões da distrofia na mucosa especializada da língua ainda não foram elucidadas.

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as alterações morfológicas estruturais e ultraestruturais do epitélio, lâmina própria e tecido muscular da língua de camundongos *mdx*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne

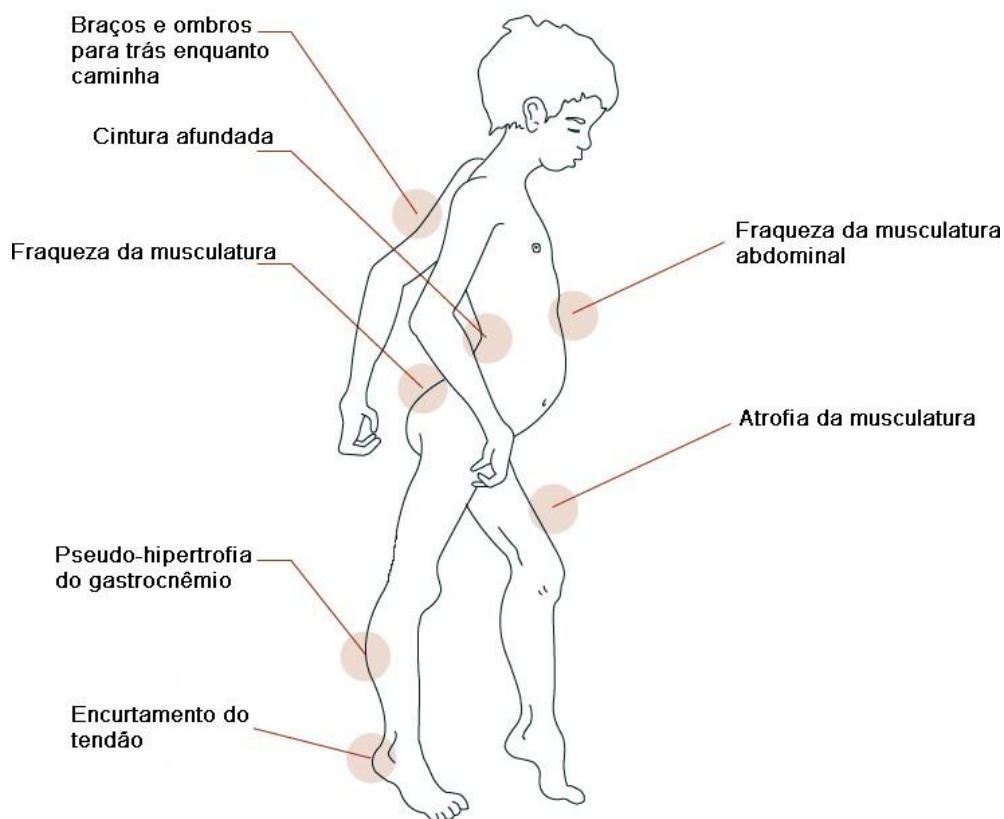
As distrofias musculares consistem em um grupo de doenças genéticas caracterizadas pela progressiva degeneração muscular e consequente perda da capacidade motora (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015). Descrições e ilustrações em registros demonstraram a presença das distrofias musculares ao longo da história da humanidade, entretanto, apenas em 1868 houve a caracterização do quadro clínico da DMD por Guillaume-Benjamin-Armand Duchenne, a mais comum das distrofias (MARANHÃO-FILHO; VINCENT, 2019).

No século seguinte, a causa da distrofia foi elucidada: uma mutação no *locus* Xp21 do cromossomo X que inibe a produção da distrofina (BULFIELD et al., 1984). A distrofina é uma proteína responsável por ligar o sarcolema ao citoesqueleto e em sua ausência ocorrem pequenos rompimentos no sarcolema (ALLEN et al., 2016). Em decorrência disso, ocasiona o aumento da concentração de íons de cálcio no meio intracelular, e dessa forma, causa a ativação da enzima proteolítica denominada de Calpaína e consequente digestão de proteínas contráteis do próprio músculo estriado esquelético (BULFIELD et al., 1984; HOFFMAN et al., 1987).

A DMD é caracterizada por ciclos de degeneração-regeneração das fibras musculares (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015). Gradativamente ocorre a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e deposição de tecido adiposo intramuscular que resulta em pseudo-hipertrofia e fraqueza muscular (SEIXAS et al., 1997; VAINZOF et al., 2008; GOMES et al., 2011).

Em decorrência de sua herança ligada ao cromossomo X, a DMD acomete majoritariamente indivíduos do sexo masculino (BULFIELD et al., 1984). As manifestações clínicas ocorrem durante os três primeiros anos, período em que se inicia as fases da marcha e locomoção, e é caracterizada pelas frequentes quedas, fraqueza dos músculos dos membros inferiores e pélvicos, além do atraso no desenvolvimento psicomotor (ALLEN et al., 2016). Como consequência da fraqueza muscular apresentam marcha miopática, descrita por uma maior rotação da pelve em contraposição ao corpo, hiperlordose (Fig. 1) e realizam a “manobra de Gowers” (EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015).

Figura 1. Posição característica da marcha miopática.



Fonte: Adaptado de Moraes et al. (2011).

Legenda: Principais alterações causadas pela DMD durante os estágios iniciais do processo de degeneração muscular.

A degeneração muscular progressiva geralmente causa perda de funções motoras entre os 9 e 16 anos de idade (BULFIELD et al., 1984; EMERY; MUNTONI; QUINLIVAN, 2015). Posteriormente, dos 18 aos 25 anos, as complicações cardiorrespiratórias são frequentemente relatadas na literatura (BUSHBY et al., 2010).

Nos estágios mais avançados da DMD, a degeneração muscular passa afetar com maior intensidade os músculos da região oral (PANE et al., 2006; ALOYSIUS et al., 2008; ENGEL-HOEK et al., 2016). Os efeitos na língua proporcionam menor pressão da mesma contra o palato e acarretam em dificuldades de comunicação e deglutição (ENGEL-HOEK et al., 2013).

2.2 Modelos experimentais para DMD

Os modelos animais são fundamentais para a compreensão de patologias, bem como, para a testagem de eficiência e toxicidade de terapias em desenvolvimento (SANTOS, 2002; VAINZOF et al., 2008). Para a DMD existem modelos experimentais adequados para diferentes práticas, como roedores, felinos e caninos (NAKAMURA; TAKEDA, 2010).

Dentre os roedores, destacam-se os camundongos *mdx*, estes têm origem na linhagem C57bl/10 ou C57bl/6, porém apresentam uma mutação espontânea no *exon* 23 em relação a linhagem original (Fig. 2) (VAINZOF et al., 2008). Essa alteração gera a ausência da distrofina no sarcolema muscular e proporciona início do ciclo de degeneração-regeneração da musculatura após o 1º mês de idade e que persiste por toda a vida do animal (NAKAMURA; TAKEDA, 2010).

Os músculos possuem duas proteínas do sarcolema muscular que proporcionam a integridade das fibras, sendo a distrofina encontrada preferencialmente na região do ventre muscular, enquanto a utrofina é caracterizada pela presença nas regiões de junção miotendínea e neuromuscular. Devido à ausência da distrofina, a utrofina passa a apresentar maior expressão e ser encontrada na região do ventre muscular (BLAKE; TINSLEY; DAVIES, 1996).

Figura 2. Camundongo *mdx*.



Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Camundongo da linhagem C57bl/10^{mdx} em caixa de polipropileno na sala do Biotério do Laboratório de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro/São Paulo.

A idade consiste em um fator importante que influencia no grau das alterações promovidas pela ausência da proteína distrofina, até os 13 meses de idade, os camundongos *mdx* possuem um ciclo de degeneração-regeneração muscular equilibrado (BULFIELD et al., 1984; VAINZOF et al., 2008). Entretanto, após esse período a capacidade regenerativa apresenta declínio enquanto a de degeneração se mantém, inclusive proporcionando diminuição da expectativa de vida quando comparada a linhagem de origem (PASTORET; SEBILLE, 1995).

Os ciclos de degeneração-regeneração muscular são caracterizados por afetarem de forma não uniformes os músculos, sendo assim, alguns músculos tendem a apresentar uma

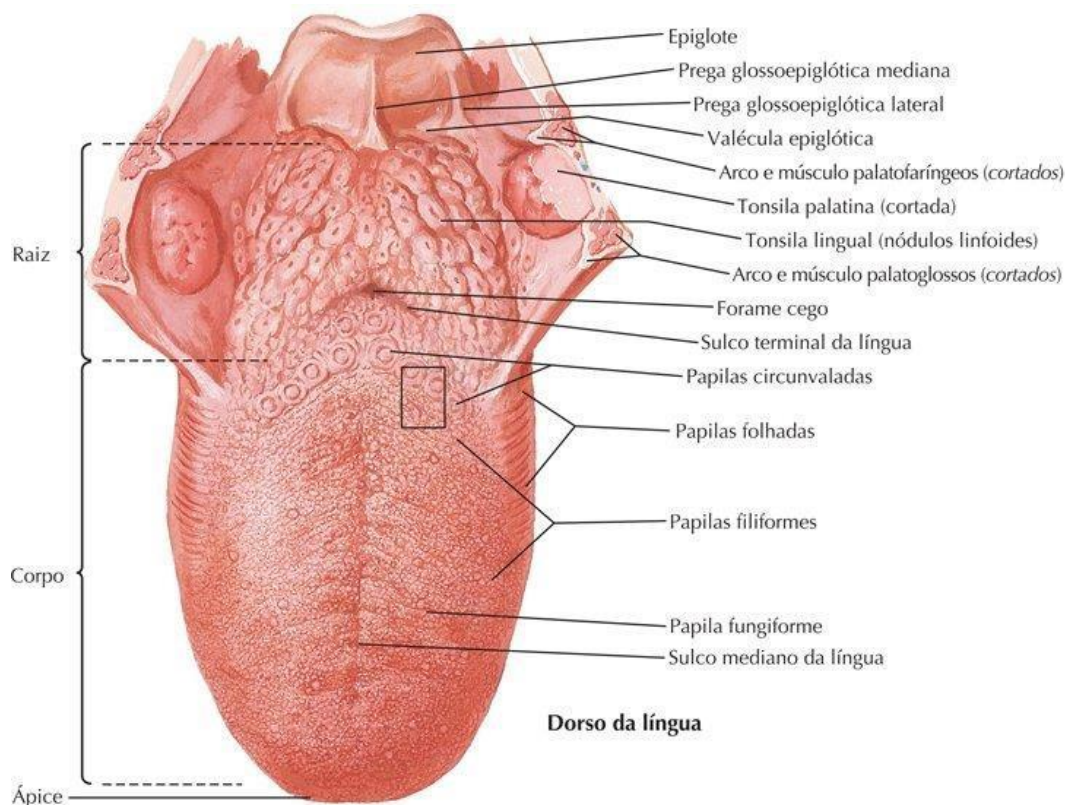
alteração mais tardia (PASTORET; SEBILLE, 1995). Os músculos associados à mastigação possuem diferentes graus de comprometimento em camundongos *mdx*. Aos 100 dias de idade, o masseter e o temporal apresentam alterações com a deposição de colágeno, enquanto que a musculatura da língua permanece inalterada (SPASSOV et al., 2010). Em idades mais avançadas, aos 26 meses, a língua é caracterizada pela presença de focos de fibrose muscular (CHAMBERLAIN et al., 2007), todavia não foram descritos possíveis reflexos na mucosa lingual.

2.3 Língua

Localizado na cavidade oral, a língua consiste em um órgão muscular complexo revestido por mucosa especializada com projeções denominadas de papilas, anatomicamente apresenta: ápice, corpo e raiz (HIATT; GARTNET, 2011). Suas principais funções consistem na: comunicação/vocalização, deglutição alimentar, somatossensação e nos roedores possui também a função de “*grooming*” (comportamento relacionado a limpeza) (IWASAKI, 2002; HIEMAE; PALMER, 2003; HAEBERLE; LUMPKIN, 2008; SANDERS; MU, 2013).

Em humanos, a língua caracteriza-se pela presença de um sulco terminal. Anteriormente a este sulco está localizado o sulco mediano superficial e posteriormente, o forame cego (estrutura vestigial do desenvolvimento embrionário associada a formação do ducto tireoglosso) e tonsila lingual (agregado de nódulos linfóides) (Fig. 3) (COSTACURTA, 1979; ALVES; CÂNDIDO, 2009; MOORE; DALLEY; AGUR, 2018).

Figura 3. Ilustração da superfície da língua de humanos.



Fonte: Netter (2018).

Legenda: Ápice, corpo e raiz, a língua possui sulco mediano e papilas: filiformes, fungiformes, folhadas e circunvaladas.

Nos animais não humanos existem variações no comprimento, formato, presença ou ausência de sulco mediano e da proeminência, além das distintas morfologias das papilas linguais (KUMAR; BATE, 2004; CIENA et al., 2013; CIENA et al., 2019; ARO et al., 2019). Essas características estão estritamente relacionadas aos hábitos alimentares, habitats e desenvolvimento evolutivo das espécies (KOBAYASHI et al., 1994; IWASAKI, 2002).

Em roedores, a língua apresenta um formato alongado e na subordem Hystricomorpha o sulco mediano está ausente (CIENA et al., 2013; CIENA et al., 2019). A proeminência lingual pode estar ausente como na capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (WATANABE et al., 2013), entretanto quando presente, possui variações e é caracterizada como diminuta no esquilo da Manchúria (*Tamias sibiricus asiaticus*) (KOBAYASHI et al., 1992) e da paca (*Cuniculus paca*) (BERALDO-MASSOLI et al., 2013), ou protuberante como na lebre-patagônica (*Dolichotis patagonum*) (EMURA; OKUMURA; CHEN, 2011b) e degu (*Octodon degus*) (CIZEK et al., 2017). De acordo com Shindo, Yoshimura e Kobayashi (2006), a proeminência consiste em

uma estrutura relacionada com a herbivoria e também é visualizada com destaque em ruminantes (ADNYANE et al., 2011; EL-BAKARY; ABUMANDOUR, 2017).

A superfície dorsal da língua é revestida pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado composto pelas camadas: córnea, granular, espinhosa e basal (CIENA et al., 2013). Superficialmente, a camada córnea é formada por células cornificadas, ou seja, citoplasma repleto de queratina que se caracteriza pela constante esfoliação e substituição de células (WATANABE et al., 2013). Subsequentemente, encontra-se a camada granular composta por queratinócitos achatados e citoplasma com grânulos de querato-hialina (CIENA et al., 2019).

A camada espinhosa é composta de células planas com projeções semelhantes a espinhos e unidas por meio de desmossomos (CIENA et al., 2013). E a mais profunda, a camada basal é composta por células de morfologia cilíndrica, e esta região é fundamental para a renovação das células das camadas superiores, por apresentar células em constante processo mitótico (WATANABE et al., 2013).

Inferiormente às camadas epiteliais está localizada a lâmina própria, que por sua vez, consiste em uma região predominantemente composta por fibroblastos e tecido conjuntivo denso (REGINATO et al., 2020). Estão presentes também mecanorreceptores que funcionalmente possibilitam a somatossensação oral e dentre essas estruturas destacam-se os corpúsculos lamelares (TEÓFILO et al. 2019). Estes consistem em mecanorreceptores de adaptação rápida que detectam pressão e vibrações de formato esférico e compostos de um axônio mielinizado central e lamelas concêntricas de células de Schwann (MUNGER; IDE, 1988; HAEBERLE; LUMPKIN, 2008).

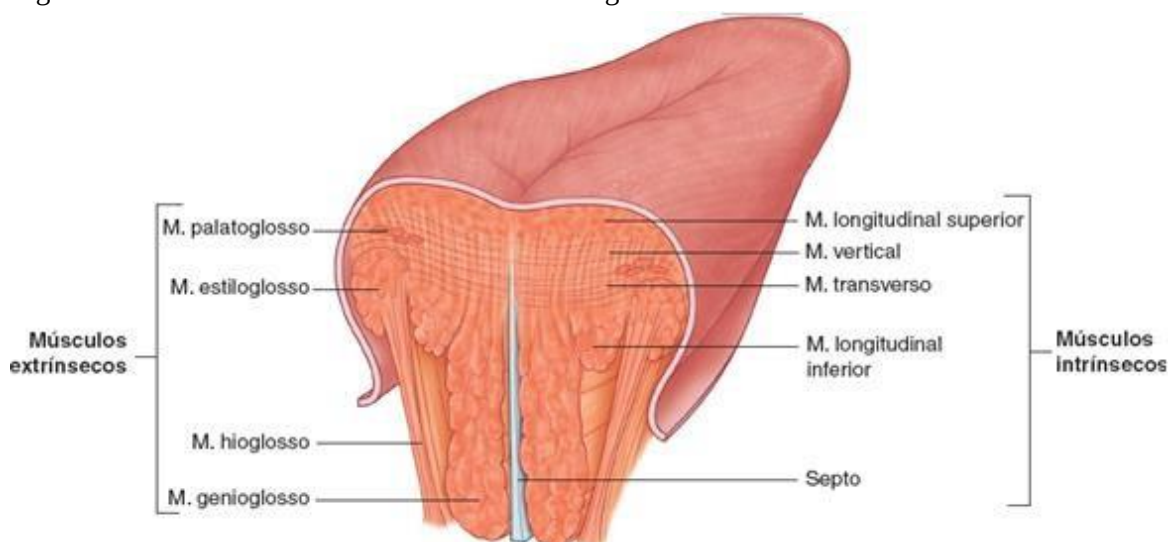
A lâmina própria apresenta projeções no epitélio que configuram estabilidade à região (MARTINEZ et al., 1997; TOMIATE et al., 2021a, 2021b) e proporcionam maior proximidade de vasos sanguíneos a camadas epiteliais mais superficiais (BERALDO-MASSOLI et al., 2013; ERDOGAN; SAGSÖZ, 2018). As projeções possuem aspecto tridimensional denominado de tecido conjuntivo associado (TCA) que é caracterizado sob análise de microscopia eletrônica de varredura combinada a tratamento em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) para a remoção da superfície epitelial (NAKANO, 1992; 1995).

Em região mais profunda está presente a musculatura estriada esquelética que compõe a língua, esta possui fibras musculares multinucleadas, longas e cilíndricas, distribuídas em múltiplos eixos, e dessa forma possibilitam grande amplitude de movimentos (CIENA et al., 2013; CIENA et al., 2019; ARO et al., 2019). Dois diferentes grupos de músculos compõem a língua: extrínsecos e intrínsecos (COSTACURTA, 1979). Os músculos, a vascularização e a

inervação da língua são separados por um septo fibroso mediano (MOORE; DALLEY; AGUR, 2018).

Os músculos extrínsecos são: genioglosso, hioglosso, estiloglosso, palatoglosso, estes apresentam como principal ação a movimentação da língua, entretanto também podem alterar seu formato (BECKER et al., 2018). Enquanto os músculos intrínsecos da língua são: longitudinal superior, longitudinal inferior, transverso e vertical (Fig. 4) (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2021). A função dos dois primeiros consiste em retrair a língua protrusa e tornar a língua mais curta e espessa, enquanto os dois últimos músculos possuem as ações de tornar a língua longa e estreita, assim como protrair a língua (HIATT; GARTNET, 2011).

Figura 4. Músculos extrínsecos e intrínsecos da língua.



Fonte: Drake, Vogl e Mitchell (2021).

Legenda: Indicação dos músculos extrínsecos: palatoglosso, estiloglosso, hioglosso e genioglosso; e intrínsecos: longitudinal superior e inferior, vertical e transverso. O septo lingual separa os músculos intrínsecos e extrínsecos.

A inervação dos músculos da língua é realizada pelo nervo hipoglosso (Nervo Craniano XII), a exceção consiste no músculo palatoglosso que é innervado pelo plexo faríngeo. A mucosa lingual é suprida pelo nervo lingual (ramo do V par de Nervo Craniano) para as funções de tato e temperatura, enquanto que para o paladar, a inervação é feita pelo nervo da corda do tímpano (ramo do VII par de Nervo Craniano), entretanto, as papilas circunvaladas são supridas pelo ramo lingual do nervo glossofaríngeo (IX par de Nervo craniano) (MOORE; DALLEY; AGUR, 2018).

Em relação à vascularização, a artéria carótida externa origina a artéria lingual, esta se localiza profundamente no músculo hioglosso e ascende na parte posterior da língua para suprir

o arco palatoglosso (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2021). A artéria dorsal da língua irriga o dorso e as bordas da língua (HIATT; GARTNET, 2011). A artéria profunda da língua (ramo terminal da artéria lingual) se projeta profundamente na face ventral da língua e acompanha o nervo lingual, até o ápice lingual (onde se anastomosa com a do lado oposto). A artéria sublingual emerge na margem do músculo hioglosso e segue entre o genioglosso e milo-hióideo até suprir as glândulas sublinguais (ALVES; CANDIDO, 2009). A veia lingual recebe as veias tributárias: sublingual, dorsal da língua e profunda da língua, estas veias seguem o mesmo trajeto das artérias correspondentes (COSTACURTA, 1979).

Na região da raiz da língua, a submucosa caracteriza-se pela presença de glândulas salivares dos tipos: mucosa e serosa (COSTACURTA, 1979). Envoltas por músculos, as glândulas secretam muco fluido espesso e viscoso de composição glicoproteica e apresentam fundamental importância associadas com as papilas folhadas e valadas para a percepção gustativa (CIZEK et al., 2017).

2.3.1 Papilas linguais

A mucosa especializada da superfície dorsolateral da língua caracteriza-se fundamentalmente pela presença de quatro tipos de papilas: filiforme, folhada, fungiforme, e circunvalada para humanos e valada para animais não humanos (KOBAYASHI et al., 1989; KOBAYASHI et al., 1994).

As papilas filiformes apresentam alta densidade e estão presentes por toda a extensão da superfície dorsal da língua, com formato triangular e alongado, sem associação a botões gustativos, com funcionalidade mecânica e direcionadas à região caudal (KOBAYASHI et al., 1994). As papilas filiformes caracterizam-se por ampla variação morfológica entre as espécies de roedores e mesmo em diferentes regiões da língua (Fig. 5) (CIENA et al., 2013; CIENA et al., 2019; IGBOKWE; MBAJIORGU, 2019).

Figura 5. Microscopia de luz das papilas filiformes na língua da cutia (*Dasyprocta leporina*).



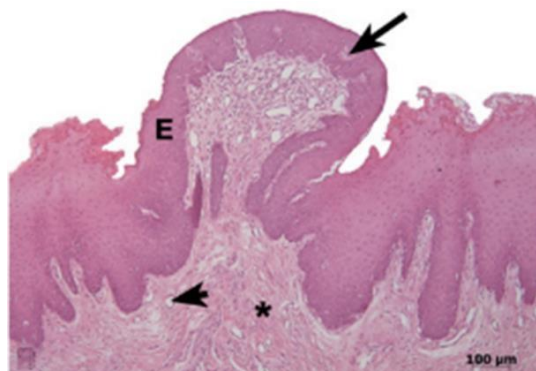
Fonte: Adaptado de Ciena et al. (2013).

Legenda: Epitélio (E), papilas filiformes (setas pretas) e inferiormente lâmina própria (*) com vasos sanguíneos (cabeça de seta). Coloração: Hematoxilina-eosina (HE). Barra: 100 μm.

O tecido conjuntivo associado (TCA), ou seja, o aspecto tridimensional da lâmina própria da papila filiforme possui ampla variação morfológica e está diretamente associada às características das papilas linguais (ZHENG; KOBAYASHI, 2006). Em algumas espécies de roedores, são caracterizadas pelo aspecto cônico como no rato *Sprague Dawley* (REGINATO et al., 2014) ou mesmo para camundongos que possuem variações, um tipo com morfologia cônica (KOBAYASHI et al., 1989) e outro semelhante à “pá” (“*shovel-like*”) (KOBAYASHI; IWASAKI, 1989).

A papila fungiforme assemelha-se ao píleo do corpo de frutificação de um fungo, ou seja, com base estreita e ápice largo, e botões gustativos geralmente são encontrados na região superior da papila (Fig. 6) (KOBAYASHI et al., 1989; CIENA et al., 2013), todavia estes podem estar ausentes (KOBAYASHI et al., 1994; KUMAR; BATE, 2004). O TCA de papilas fungiformes assemelha-se a um “botão de flor” (“*flower-bud*”) (EMURA; OKUMURA; CHEN, 2011b), “vulcão” (“*volcano-like*”) (REGINATO et al. 2014), ou apresenta formato cilíndrico e semelhante à “craca” (“*barnacle-like*”) (KOBAYASHI et al., 1989).

Figura 6. Microscopia de luz da papila fungiforme da cutia.



Fonte: Adaptado de Ciena et al. (2013).

Legenda: Epitélio (E), papila fungiforme (seta), inferiormente a lâmina própria (*) com vaso sanguíneo na região (cabeça de seta). Coloração: HE. Barra: 100 μm.

As papilas folhadas (Fig. 7) possuem formato semelhante à folha e consistem em rugas paralelas intercaladas por sulcos e associadas a botões gustativos (EMURA et al., 2002). Localizadas bilateralmente na língua são desenvolvidas em roedores (EMURA; OKUMURA; CHEN et al., 2011b), apesar de não necessariamente estarem presentes em todas as espécies, a exemplo do rato-africano-da-grama (*Arvicanthis niloticus*) (NASR et al., 2012) e o rato-toupeira-cego do Oriente Médio (*Spalax ehrenbergi*) (KILINC et al., 2010). Após a remoção da superfície epitelial, o TCA caracteriza-se por projeções de aspecto laminar circundando sulcos ovais largos (REGINATO et al., 2014).

Figura 7. Microscopia de luz da papila folhada da cutia.



Fonte: Adaptado de Ciena et al. (2013).

Legenda: Epitélio (E), papila folhada (seta) e botões gustativos associados (cabeça de seta), inferiormente a lâmina própria (*) e glândulas associadas (G). Coloração: HE. Barra: 100 μm.

As papilas valadas (Fig. 8) estão localizadas na região caudal da língua e apresentam dois principais aspectos morfológicos: semelhante a um domo circundado por um sulco (KOBAYASHI et al., 1989) ou composta por sulcos paralelos (CIENA et al., 2013), também

ocorrem variações na quantidade (CIENA et al., 2013; REGINATO et al., 2014; CIENA et al., 2019; IGBOKWE; MBAJIORGU, 2019). O TCA da papila valada caracteriza-se por variações morfológicas em diferentes espécies, dessa maneira, pode apresentar aspecto liso como na girafa (EMURA; OKUMURA; CHEN, 2013) ou espinhos curtos no ápice (EMURA; OKUMURA; CHEN, 2011a; EMURA; OKUMURA; CHEN, 2011c).

Figura 8. Microscopia de luz da papila valada da cutia.



Fonte: Adaptado de Ciena et al. (2013).

Legenda: Epitélio (E), papila valada (seta) e botões gustativos associados (cabeça de seta), inferiormente glândulas (G) adjacentes. Coloração: HE. Barra: 200 µm.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as repercussões do processo degenerativo nas características morfológicas estruturais e ultraestruturais do epitélio, lâmina própria e tecido muscular da língua de camundongos *mdx*.

3.1 Objetivos específicos

- Descrever os aspectos estruturais do epitélio, lâmina própria e músculos da língua sob microscopia de luz;
- Realizar análises morfométricas da espessura epitelial e área glandular;
- Revelar o aspecto tridimensional do epitélio lingual através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Evidenciar o TCA das papilas linguais por meio da MEV mediante a técnica de maceração epitelial;
- Descrever as características ultraestruturais do epitélio e lâmina própria da língua através da microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Caracterizar as alterações ultraestruturais das células musculares através da MET.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos com 6 meses de idade de duas linhagens: Grupo controle - C57bl/10 (n=20) e Grupo *mdx* - C57bl/10^{mdx} (n=20). Oriundos do Centro de Criação e Experimentação em Biomodelos da Universidade Federal do ABC e foram alocados no Biotério do Laboratório de Anatomia, Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Rio Claro – São Paulo (SP). As atividades foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB, UNESP – Rio Claro (protocolo nº 2381/2021). Os animais foram eutanasiados com overdose de Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal pela responsável técnica (CRMV-SP N°26257). Posteriormente as línguas foram dissecadas por incisão ventral e removidas.

4.2 Microscopia de Luz

As amostras (n = 5 por grupo) foram fixadas por imersão em solução de formalina 10% à 4°C, durante 48h e após este período substituída por álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em séries crescentes de álcoois (de 70% ao absoluto) e incluídas em parafina histológica. Foram realizadas secções sagitais e transversais de 6 µm de espessura e coradas com as técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-sírius red (PS). As amostras em coloração de PS foram analisadas sob luz polarizada, e todas as imagens foram obtidas através do microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Alemanha) no IB da UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

A análise morfométrica foi realizada para a mensuração da espessura epitelial em duas regiões. Na região medial do corpo da língua foram realizadas 5 mensurações por secção em região medial da língua totalizando um n = 125 por grupo. Na região da proeminência lingual foram realizadas 5 mensurações em região medial da língua totalizando um n = 125 por grupo. Foi empregado o teste de D'Agostino e Pearson para verificar a normalidade. As amostras apresentaram distribuição não-normal e por isso foi aplicado o teste de Mann-Whitney, foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

Para a análise da área das glândulas serosas e mucosas foram realizadas medidas independentemente (n=25 por grupo). Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade amostral e as amostras foram consideradas não-normais. Posteriormente, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, e foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

Todas as mensurações foram realizadas com o auxílio do Software ImageJ™ (Bethesda, Maryland, EUA) e as análises estatísticas com o auxílio do Software GraphPad Prism 9.3.0.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a dissecação, as amostras (n = 10 por grupo) foram perfundidos em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em solução de Cacodilato de sódio a 0,1M), pH 7,4, durante 24h, a 4°C (WATANABE et al., 2013).

As amostras (n = 5 por grupo) foram destinadas a análise do aspecto tridimensional da superfície dorsolateral do epitélio da língua. As demais amostras (n = 5 por grupo) foram destinadas ao processo de maceração por imersão em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% em temperatura ambiente, durante 4 dias, com trocas diárias para observação dos elementos da matriz extracelular em “*situ*” (CIENA et al., 2019). Posteriormente, todas as amostras foram lavadas entre 12 a 24h em água destilada. As amostras foram alocadas em frascos individuais com água destilada para tratamento no ultrassom para eliminação de possível resíduo tecidual ou externo que permaneça em contato com a superfície de análise.

Após as lavagens, todas as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcoois (de 70% ao absoluto), imersas em solução de acetato de isoamila por 3h, a 4 °C e secadas no aparelho de ponto-crítico (Balzers CPD-30) utilizando CO₂ líquido (BARBOSA et al., 2020). As amostras secas foram montadas em bases metálicas de alumínio (1 cm²), cobertas com íons de ouro em aparelho Balzers SCD-040, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise ultraestrutural do epitélio, lâmina própria e musculatura (n = 5 por grupo), após a dissecação, as línguas foram fixadas por imersão em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em solução de Cacodilato de sódio a 0,1M) pH 7,4, durante 48h, a 4°C (WATANABE et al., 2013).

Em seguida, as línguas foram seccionadas em amostras menores (2 mm³), lavadas com a solução de tampão fosfato de sódio e pós-fixadas com a solução de tetróxido de ósmio à 1% durante 2h a 4°C. Novamente, as amostras foram lavadas em água destilada e contrastadas em “bloco” com a solução aquosa de acetato de uranila à 5% durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois, a

partir do 70% até o álcool absoluto com banhos de 15 minutos cada, e 2 banhos de óxido de propileno por 15 minutos para a infiltração da resina (Spurr® 1:1 óxido de propileno por 4h) em misturador rotativo. Após esta etapa, a resina foi retirada e colocada resina pura durante 6h.

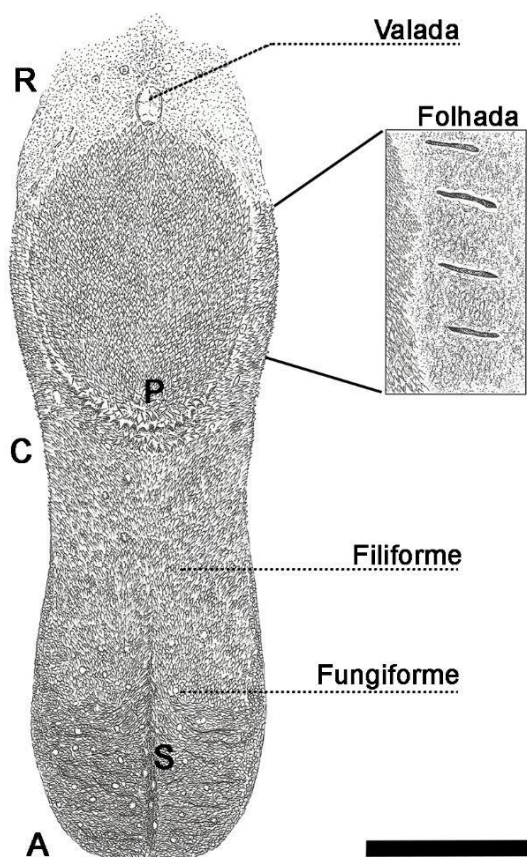
Na etapa final, a resina pura foi substituída por uma nova resina, colocada na estufa a 37° C com o frasco aberto por 1h, sendo realizada a inclusão do material em moldes de borracha e polimerização na estufa a 60°C, durante 5 dias. Obtidos os blocos de resina, foi realizada a triagem para a obtenção das secções de 0,5 µm a 1 µm, corados com a solução de azul de toluidina a 1% para a verificação da área em microscópio de luz. Posteriormente, foram obtidas as secções de 90 nm, coletados em telas de cobre de 200-mesh (EMSTM), contrastados com a solução de acetato de uranila a 4%, por 3 minutos e com a solução aquosa de citrato de chumbo a 0,4% por 3 minutos, lavando em seguida com água destilada (CIENA et al. 2019). As telas com os respectivos cortes foram examinadas através do microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 (JEOL Ltda., Tóquio, Japão), Instituto de Ciências Biomédicas - III, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 Análises Macroscópicas

A língua dos camundongos possui um aspecto alongado e anatomicamente dividida em: ápice, corpo e raiz. Um sulco está presente medialmente na região rostral do corpo da língua e a proeminência lingual está localizada na região caudal do corpo da língua. Foram encontradas papilas filiformes e fungiformes no ápice e no corpo da língua, papilas filiformes na proeminência lingual, bilateralmente papilas folhadas e medialmente na raiz uma papila valada (Fig. 9).

Figura 9. Ilustração da língua de camundongos.



Fonte: Garcia, 2022.

Legenda: Anatomia geral da língua de camundongos. Foram identificadas papilas dos tipos: filiforme, fungiforme, folhada e valada. Ápice (A), corpo (C) com sulco mediano (S) e proeminência (P), e raiz (R). Barra: 0,5 cm.

5.2 Microscopia de Luz

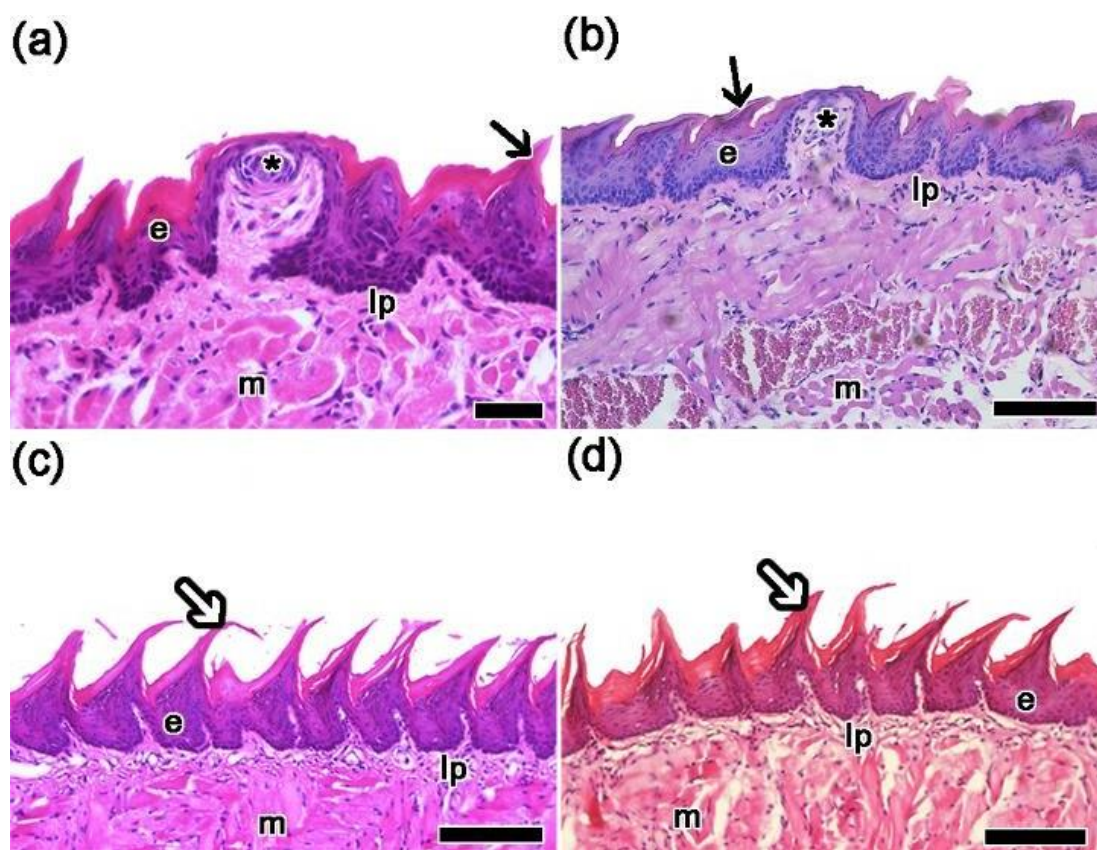
Na superfície epitelial dorsal da língua de ambos os grupos foram encontradas papilas: filiformes, fungiformes, folhadas e valada. Abaixo do epitélio foi localizada a lâmina própria e na região caudal da língua, na submucosa foi evidenciado conglomerados de glândulas serosas e mucosas. Profundamente, foi evidenciada a musculatura da língua.

As regiões do corpo da língua caracterizam-se pela presença de diferentes papilas: rostral e medial com papilas filiformes e fungiformes; e caudal com papilas filiformes. Existem variações na espessura epitelial por toda a extensão da língua, a lâmina própria é delgada e projeta-se no epitélio.

No grupo controle, as regiões rostral e medial do corpo da língua apresentaram papilas filiformes curtas e com a ponta direcionada para a região caudal; também estavam presentes papilas fungiformes com morfologia de cúpula e botão gustativo localizado no topo. Inferiormente foi localizada a lâmina própria com projeções no epitélio nas regiões papilares com aspectos diferentes nas papilas filiformes e fungiformes, e subjacentes fibras musculares. O epitélio é queratinizado e apresentou espessura de $89,25 \pm 18,50 \mu\text{m}$ no grupo controle (Fig. 10.a). No grupo *mdx*, a mesma região foi caracterizada de forma essencialmente semelhante, entretanto o epitélio apresentou maior espessura, $97,61 \pm 21,62 \mu\text{m}$ (Fig. 10.b). O epitélio das regiões rostral e medial apresentou, entre os grupos, diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) na espessura.

A região da proeminência lingual foi caracterizada, em ambos os grupos, pela presença de papilas filiformes, direcionadas para a região caudal e pela ausência de papilas fungiformes. Subjacente ao epitélio, a lâmina própria apresentou aspecto delgado e com projeções no epitélio abaixo das papilas filiformes, inferiormente estavam presentes fibras musculares. O epitélio é queratinizado, a lamina própria delgada e também estão presentes projeções da mesma no epitélio. No grupo controle, a espessura epitelial apresentou $80,13 \pm 18,15 \mu\text{m}$ (Fig. 10.c). Enquanto o grupo *mdx*, possui $99,41 \pm 27,83 \mu\text{m}$ (Fig. 10.d). A diferença da espessura do epitélio da proeminência entre os grupos apresentou significância estatística ($p < 0.05$).

Figura 10. Microscopia de luz das papilas do corpo da língua de camundongos.



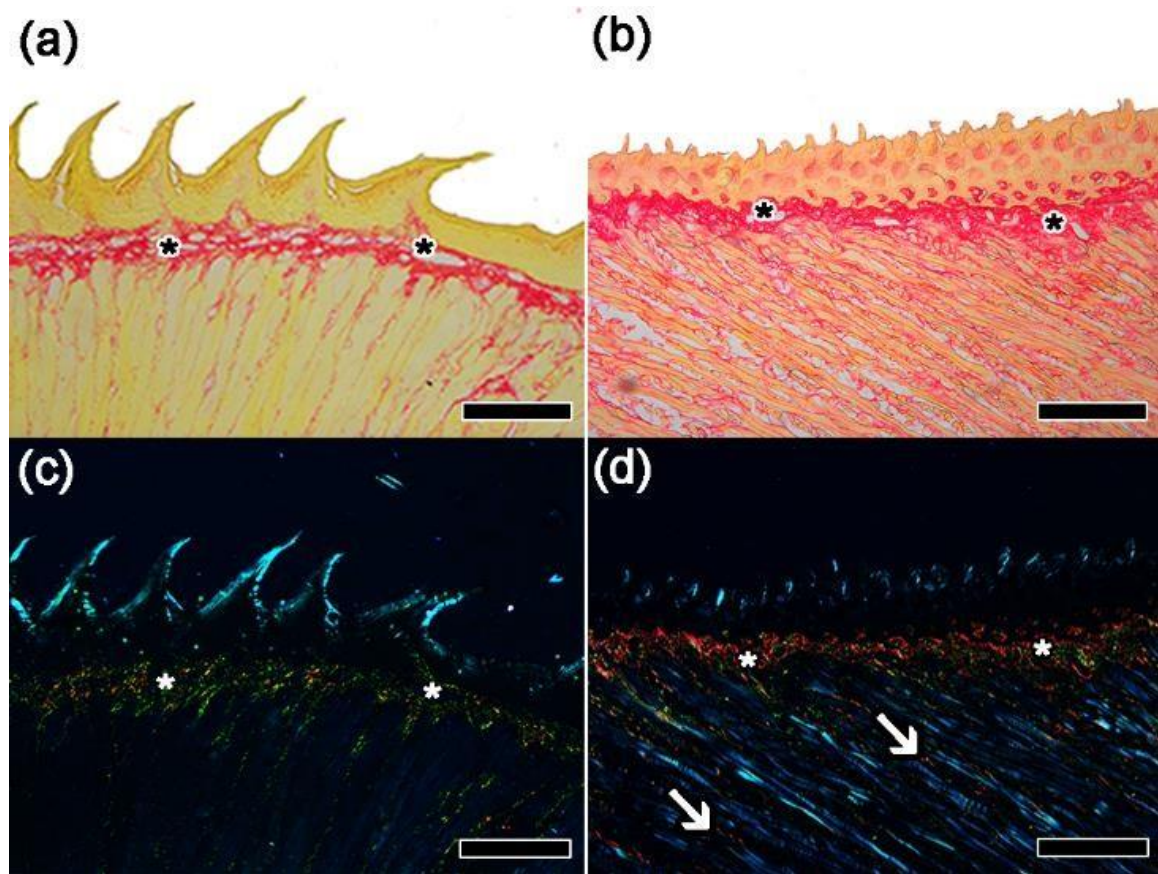
Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Região medial do corpo da língua. Grupo controle, corte sagital: (a) Epitélio (e) com papila filiforme (seta preta) adjacente a papila fungiforme com botão gustativo no topo (*), inferiormente lâmina própria (lp) e fibras musculares (m). Grupo *mdx*, corte sagital: (b) Epitélio (e), papila fungiforme com botão gustativo no topo (*) adjacente à papila filiforme (seta preta), subjacente a lâmina própria (lp) e fibras musculares (m). Região da proeminência lingual. Grupo controle, corte transversal: (c) Papilas filiformes (seta branca) no epitélio (e) e inferiormente lâmina própria (lp) e fibras musculares (m). Grupo *mdx*, corte transversal: (d) Epitélio (e) com papilas filiformes (seta branca), subjacente lâmina própria (lp) e fibras musculares (m). Coloração: HE. Barras: 100 µm.

Localizada inferiormente ao epitélio, a lâmina própria apresenta composição de fibras colágenas. Analisada com a coloração de PS, a região no grupo controle apresentou destaque com a coloração avermelhada (Fig. 11.a). Enquanto no grupo *mdx*, houve maior intensidade na coloração avermelhada e também a presença de fibras de colágeno dispersas no tecido muscular localizado subjacente (Fig. 11.b).

Sob a luz polarizada, no grupo controle foi revelada coloração essencialmente esverdeada com focos avermelhados de fibras de colágeno (Fig. 11.c). O grupo *mdx* caracterizou-se pelo aspecto majoritariamente avermelhado das fibras de colágeno dispersas entre fibras de coloração esverdeada, abaixo, na região do tecido muscular houve deposição de fibras de colágeno avermelhadas adjacentes às fibras musculares (Fig. 11.d).

Figura 11. Microscopia de luz da lâmina própria da língua de camundongos.

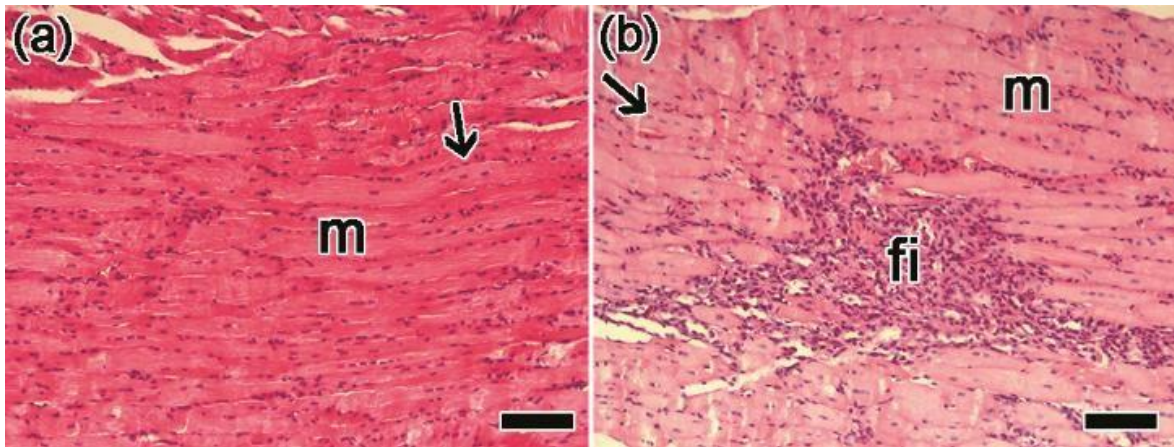


Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle, corte longitudinal: (a) Lâmina própria evidenciada essencialmente pela composição de colágeno (* pretos). Grupo *mdx*, corte longitudinal: (b) Lâmina própria composta por fibras de colágeno em intensa coloração vermelha (* pretos). Grupo controle, corte longitudinal sob luz polarizada: (c) Fibras de colágeno esverdeado e pontos avermelhados (* brancos). Grupo *mdx*, corte longitudinal sob luz polarizada: (d) lâmina própria com fibras colágenas de coloração essencialmente vermelhas e esverdeadas (* brancos) e presença de fibras de colágeno entre as fibras musculares (setas brancas). Coloração: PS. Barras: 100 μ m (a e c) e 500 μ m (b e d).

Inferiormente à lâmina própria, os músculos estriados esqueléticos da língua apresentaram fibras multinucleadas dispostas paralelas e longitudinalmente. No grupo controle com núcleos periféricos majoritariamente (Fig. 12.a). Enquanto no grupo *mdx*, as fibras musculares também apresentaram núcleos periféricos, entretanto houve a presença de núcleos centralizados nas fibras e conglomerados de núcleos caracterizando foco inflamatório, início do processo da formação de fibrose tecidual. (Fig. 12.b).

Figura 12. Microscopia de luz do músculo estriado esquelético da língua de camundongos.

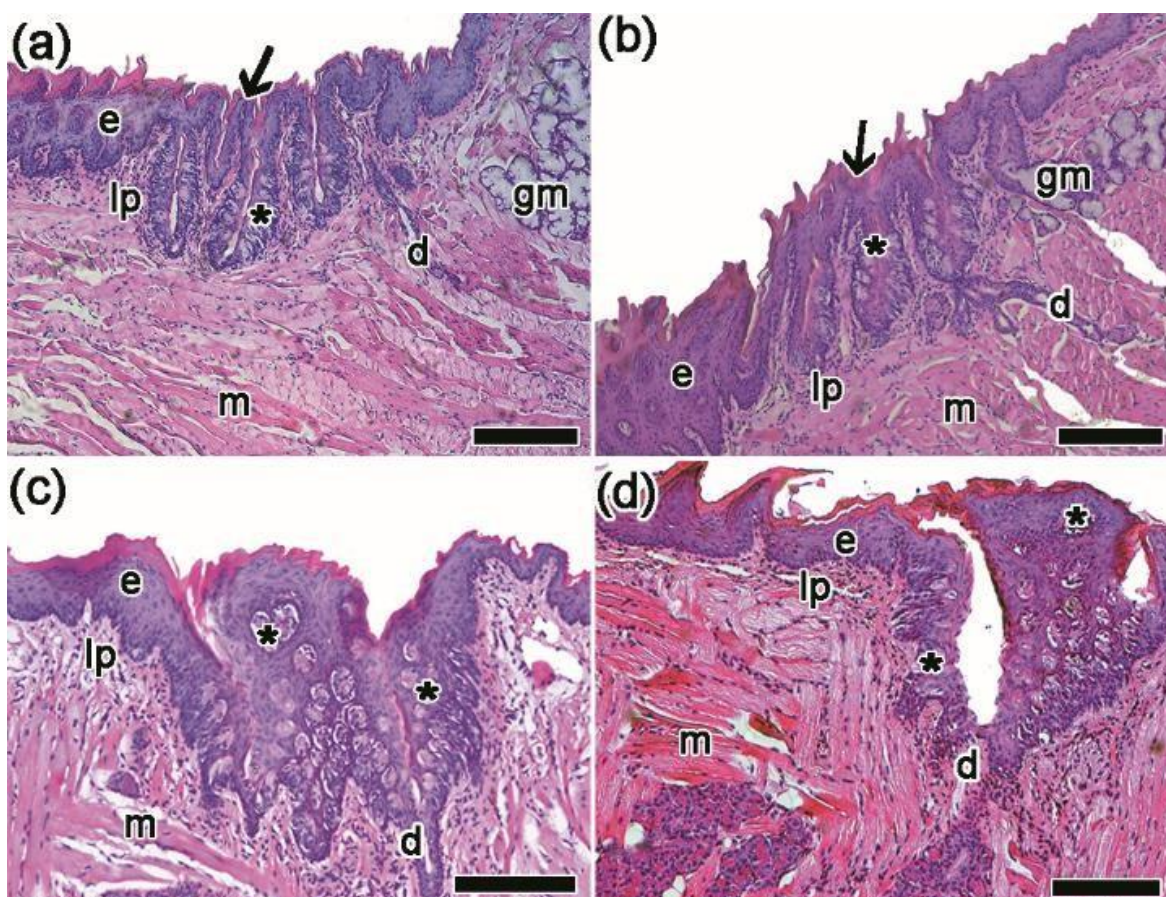


Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle, corte longitudinal: (a) destaque fibras musculares (m) e com núcleos de localização periférica (seta preta). Grupo *mdx*, corte longitudinal: (b) fibra muscular (m) com núcleos centralizados (seta preta) e foco inflamatório (fi). Coloração: HE. Barras: 50 µm.

Localizadas bilateralmente à proeminência e próximas à raiz da língua, as papilas folhadas consistem em dobras epiteliais delimitadas por sulcos profundos, os grupos controle (Fig. 13.a) e *mdx* (Fig. 13.b) eram morfologicamente semelhantes. Na raiz da língua, a papila valada apresentou uma projeção central delimitada por fendas, botões gustativos foram localizados nas paredes laterais e na projeção papilar, as características são semelhantes para ambos os grupos (Fig. 13.c e 13.d). Destaca-se a associação dessas papilas a ductos conectados a glândulas mucosas e serosas localizadas inferiormente à lâmina própria, na região da submucosa.

Figura 13. Microscopia de luz das papilas folhadas e valadas da língua de camundongos.



Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle, corte transversal: (a) Epitélio (e), lâmina própria (lp), papila folhada (seta) com botão gustativo lateralmente (*), e adjacentes a ducto salivar (d) associados à glândulas mucosas (gm), inferiormente fibras musculares (m). Grupo *mdx*, corte transversal: (b) Epitélio (e), lâmina própria, papila folhada (seta) com botões gustativos nas paredes laterais (*) associada a ducto (d) adjacente a glândulas mucosas (gm). Grupo controle, corte sagital: (c) Epitélio (e), lâmina própria (lp), papila valada com botões gustativos (*) e ducto (d), inferiormente fibras musculares (m). Grupo *mdx*, corte sagital: (d) Epitélio (e), lâmina própria (lp), papila valada com botões gustativos (*) associada a ducto (d) e inferiormente fibras musculares (m). Coloração: HE. Barras: 200 µm.

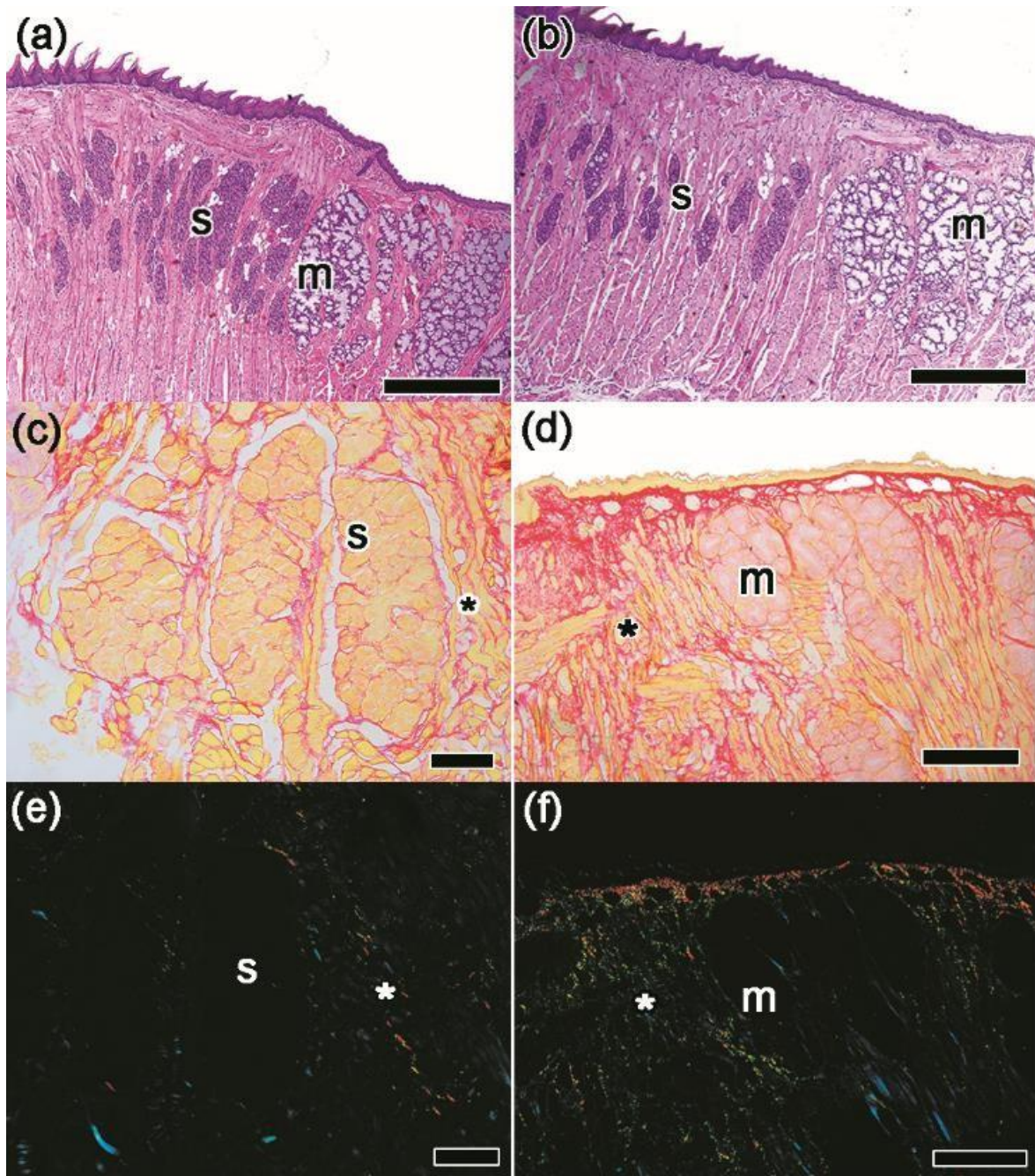
Na submucosa apenas da região caudal estavam presentes grupamentos de glândulas mucosas e serosas associadas por meio de ductos às papilas folhadas e valadas. As glândulas serosas estavam dispostas anteriormente e as mucosas posteriormente. No grupo controle, a área das glândulas serosas apresentou $35 \pm 4 \mu\text{m}^2$ e das mucosas $39 \pm 7 \mu\text{m}^2$ (Fig. 14.a). No grupo *mdx*, a disposição glandular foi semelhante (Fig. 14.b) e a área das glândulas serosas foi de $29 \pm 11 \mu\text{m}^2$ e das mucosas foi de $46 \pm 12 \mu\text{m}^2$. O grupo controle apresentou menor área das glândulas serosas e maior área de glândulas mucosas, houve diferença estatística entre os grupos para ambas as análises ($p < 0.05$).

Com a coloração de PS foi evidenciada a presença de colágeno envolvendo as glândulas. No grupo controle, a deposição de colágeno revelou-se sutil e diretamente relacionada com as

glândulas (Fig. 14.c). No grupo *mdx*, a deposição de colágeno ao redor das glândulas também esteve presente associado às fibras musculares adjacentes (Fig. 14.d).

Sob luz polarizada, as fibras de colágeno apresentaram coloração amarelada no grupo controle e restrita envolvendo as glândulas (Fig. 14.e), diferentemente do grupo *mdx*, que por sua vez, foi evidenciada grande deposição de fibras de colágeno de coloração esverdeada adjacentes às fibras musculares associadas aos grupamentos glandulares (Fig. 14.f).

Figura 14. Microscopia de luz das glândulas da língua de camundongos.



Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle, corte transversal: (a) glândulas serosas (s) e mucosas (m). Grupo mdx, corte transversal: (b) glândulas serosas (s) e mucosas (m). Grupo controle, corte sagital: (c) Glândula serosa (s) envolta por fibras de colágeno (* preto). Grupo mdx, corte transversal: (d) Glândulas mucosas (m) entre as fibras de colágeno (* preto). Grupo controle, corte sagital sob luz polarizada: (e) Glândula serosa (s) envolta por fibras de colágeno de coloração avermelhada (* branco). Grupo mdx, corte transversal sob luz polarizada: (f) Fibras de colágeno amarelado (* branco) adjacente às glândulas mucosas (m). Coloração: HE (a, b), PS (c, d, e, f). Barras: 50 μ m (c, e) e 500 μ m (a, b, d, f).

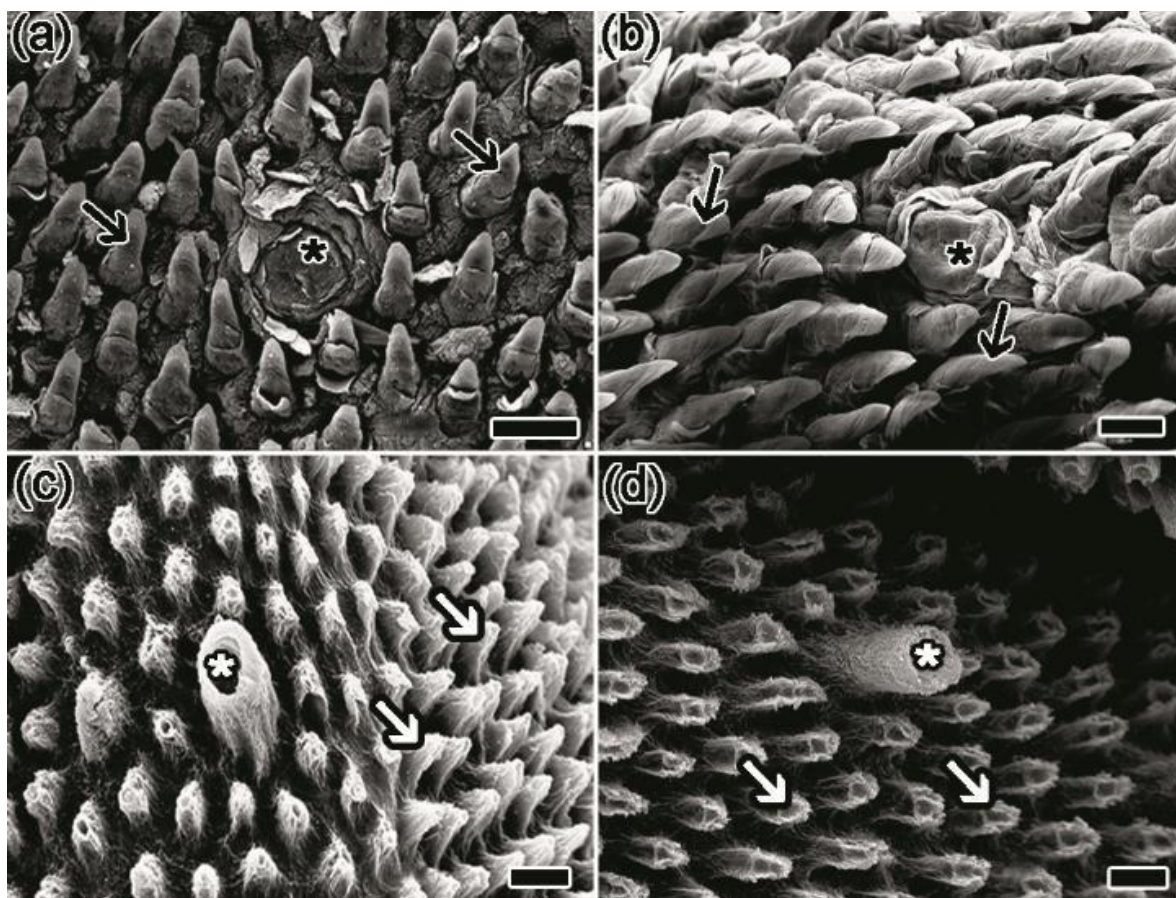
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os aspectos tridimensionais das papilas filiformes, fungiformes, folhadas e valada e seus respectivos TCAs foram revelados.

Nas regiões rostral e medial do corpo da língua, o grupo controle apresentou papilas filiformes de formato cônico com ponta única e adjacentes papilas fungiformes de morfologia semelhante a um “cogumelo” (Fig. 15.a). O grupo *mdx* foi caracterizado por papilas filiformes e fungiformes semelhantes (Fig. 15.b).

A técnica de maceração epitelial revelou o TCA das papilas filiformes e fungiformes. Nas regiões rostral e medial do corpo da língua do grupo controle, as papilas filiformes apresentaram TCAs cônicos com ponta única, e as papilas fungiformes eram caracterizadas por uma protrusão cilíndrica com cavidade papilar do botão gustativo, também descrita como uma morfologia semelhante a “craca” no grupo controle (Fig. 15.c) e *mdx* (Fig. 15.d).

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura das papilas do corpo língua de camundongos.



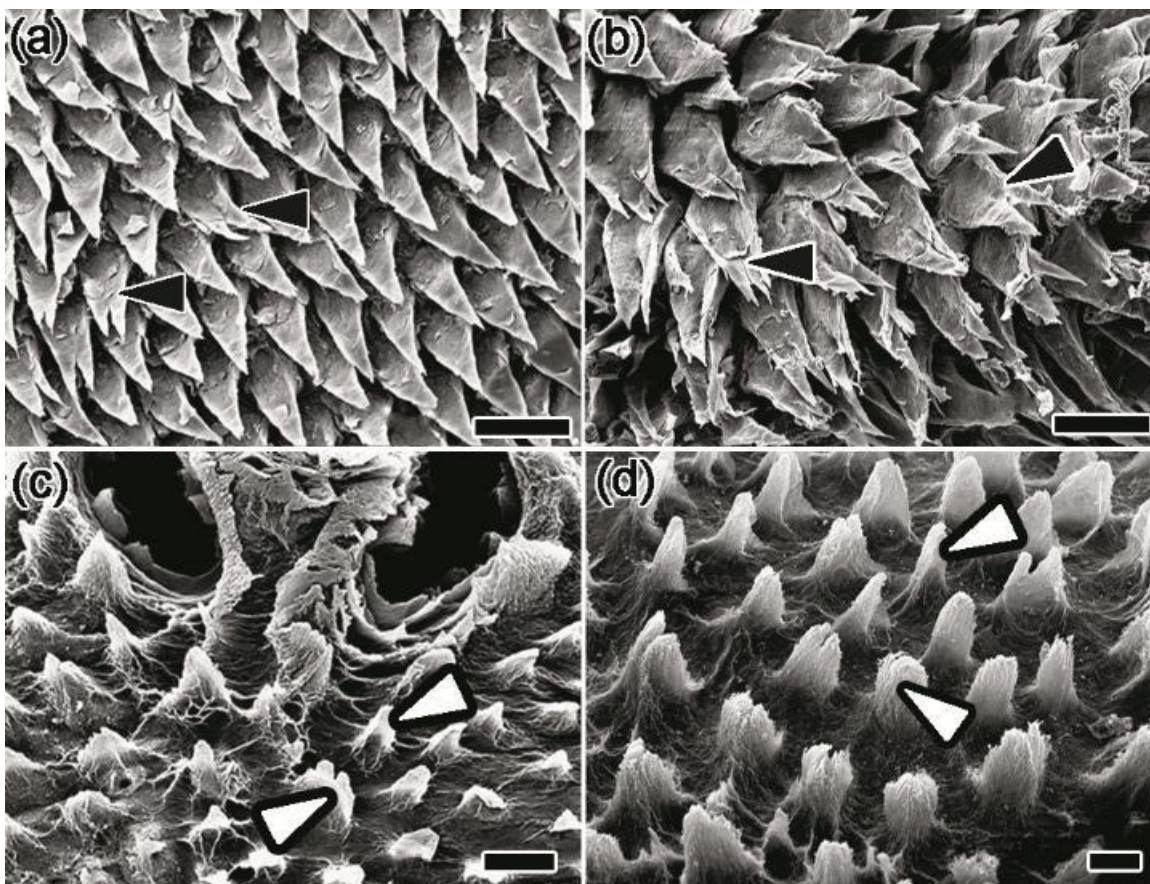
Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Aspecto tridimensional da região medial do corpo da língua. Grupo controle: (a) Papilas filiformes cônicas (setas pretas) e papila fungiforme (*). Grupo *mdx*: (b) Papilas filiformes cônicas (setas pretas) e papila fungiforme (*). Aspecto tridimensional do TCA da região medial do corpo da língua. Grupo controle: (c) TCA da papila filiforme cônica (setas brancas) e TCA da papila fungiforme (* branco). Grupo *mdx*: (d) TCA da papila fungiforme (* branco) e TCA de papilas filiformes cônicas (setas brancas). Barras: 30 µm.

Na região da proeminência lingual do corpo da língua, o grupo controle revelou papilas filiformes caracterizadas por formato triangular e de ponta única, enquanto que as papilas fungiformes estavam ausentes nessa região (Fig. 16.a). No grupo *mdx*, as papilas filiformes de morfologia triangular apresentaram pontas fimbriadas caracterizando desgaste papilar (Fig. 16.b).

Após a maceração epitelial foi revelado o TCA das papilas da proeminência lingual. No grupo controle, o TCA foi caracterizado pelo aspecto semelhante à “pá” e de ponta única (Fig. 16.c). Enquanto no grupo *mdx*, a morfologia foi semelhante, entretanto, a presença de pontas duplas e triplas foi frequente (Fig. 16.d).

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura das papilas da proeminência da língua de camundongos.

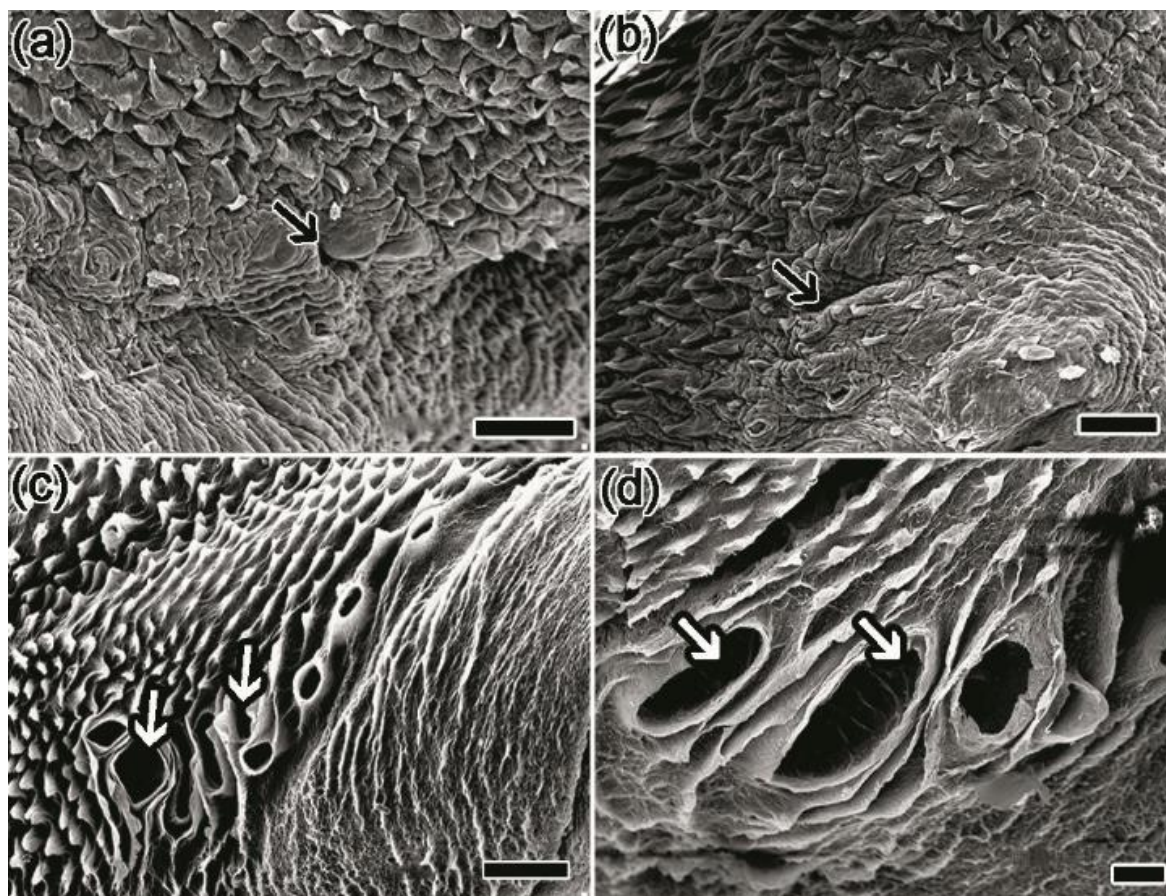


Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Aspecto tridimensional da região da proeminência lingual. Grupo controle: (a) Papila filiforme triangular (cabeças de seta). Grupo *mdx*: (b) Papila filiforme triangular com pontas fimbriadas (cabeças de seta). Aspecto tridimensional do TCA da região da proeminência lingual. Grupo controle: (c) TCA da papila filiforme triangular com aspecto cônico (cabeças de seta brancas). Grupo *mdx*: (d) TCA da papila filiforme triangular com aspecto cônico de ponta dupla (cabeças de seta brancas). Barras: 30 μm (c, d) e 100 μm (a, b).

Na face lateral da proeminência lingual foram localizadas papilas folhadas. Estas são caracterizadas pelas dobras epiteliais delimitadas por sulcos paralelos e foram encontradas no grupo controle (Fig. 17.a) e *mdx* (Fig. 17.b) morfologicamente semelhantes. Sob a técnica de maceração da superfície epitelial, o TCA caracterizou-se por óstios com formatos irregulares delimitados por projeções laminares, no grupo controle (Fig. 17.c) e *mdx* (Fig. 17.d) os aspectos revelados foram semelhantes.

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura das papilas folhadas da língua de camundongos.

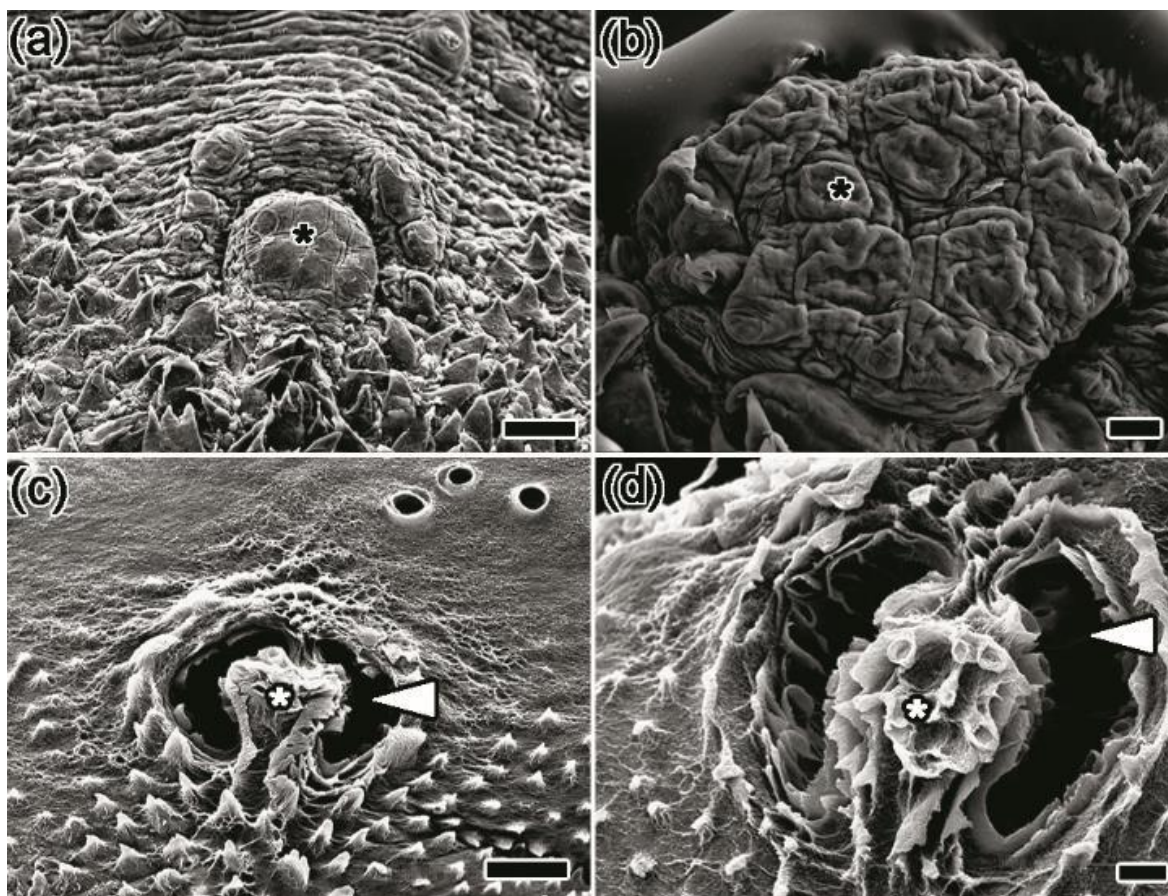


Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Aspecto tridimensional da margem da proeminência lingual. Grupo controle: (a) Papila folhada, delimitada por sulcos (seta preta). Grupo *mdx*: (b) Sulco da papila folhada (seta preta). Após remoção da superfície epitelial, revelou-se o TCA. Grupo controle: (c) Óstios dos TCAs das papilas folhadas (setas brancas). Grupo *mdx*: (d) Óstios dos ductos do TCAs das papilas folhadas (setas brancas). Barras: 30 μ m (d) 100 μ m (a, b, c).

Localizada medialmente na região caudal da língua, notou-se uma papila valada de morfologia semelhante a um domo rodeada por um fosso estreito a circundando, nos grupos controle (Fig. 18.a) e *mdx* (Fig. 18.b) as características foram semelhantes. E após a maceração do epitélio, o TCA da papila valada foi caracterizado por estar circundado por sulcos elípticos e por uma projeção central com múltiplas impressões de papilas gustativas com um aspecto “alveolar”. O grupo controle apresentou maior desgaste da projeção central por conta da técnica da maceração (Fig. 18.c) enquanto que no grupo *mdx*, a morfologia da projeção foi melhor evidenciada (Fig. 18.d).

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura das papilas valadas de camundongos.



Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Aspecto tridimensional da região caudal da língua. Grupo controle: (a) Papila valada (* preto). Grupo *mdx*: (b) Papila valada (* preto). TCA revelado após remoção da superfície epitelial. Grupo controle: (c) Sulco elíptico (cabeça de seta branca) adjacente ao TCA da papila valada (* branco). Grupo *mdx*: (d) TCA da papila valada (* branco) envolto por sulco elíptico (cabeça de seta branca). Barras: 30 μm (b, d), 100 μm (a, c).

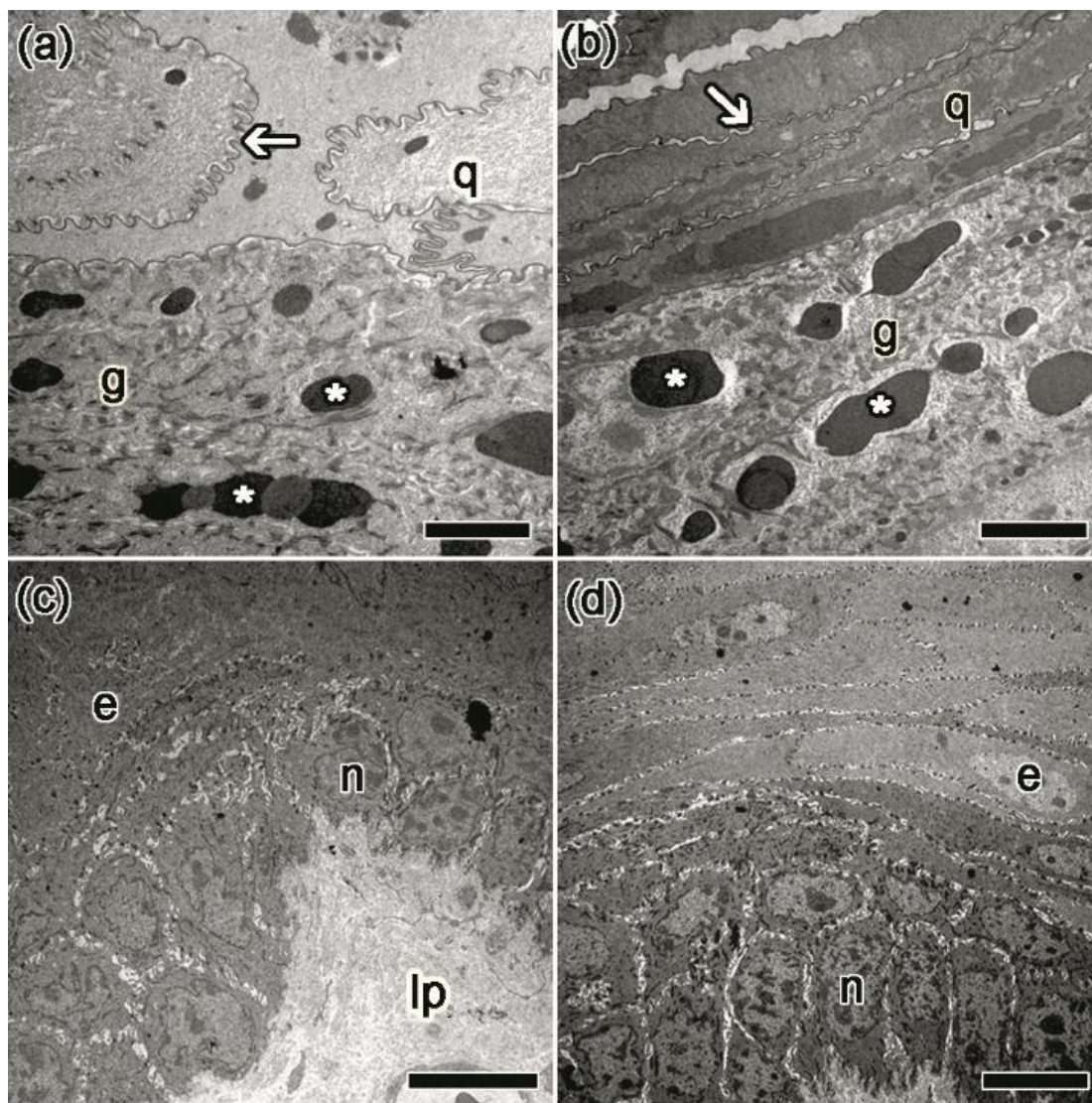
5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A língua dos camundongos de ambos os grupos foi caracterizada pela presença de epitélio escamosos estratificado, lâmina própria e músculo estriado esquelético.

No grupo controle, a camada córnea (queratinizada) foi diferenciada por apresentar células epiteliais sobrepostas, anucleadas e com padrão serrilhado difuso nas interfaces intercelulares. Inferiormente, a camada granulosa apresentou células achatadas com grânulos no citoplasma, inúmeros tonofilamentos e adesão celular através dos desmossomos (Fig. 19.a). No grupo *mdx* foi observada estratificação semelhante, camada córnea com justaposição de queratinócitos e inferiormente a camada granulosa com numerosos granulosos no citoplasma das células (Fig. 19.b). Na camada espinhosa, do grupo controle, foi observada a presença de células planas e na camada basal, células com projeções citoplasmáticas e núcleos ovais

volumosos (Fig. 19.c). Enquanto no grupo *mdx*, a camada espinhosa também apresentou células planas e a camada basal revelou organização em células colunares paralelas com núcleos elípticos (Fig. 19.d).

Figura 19. Microscopia eletrônica de transmissão da mucosa de camundongos.



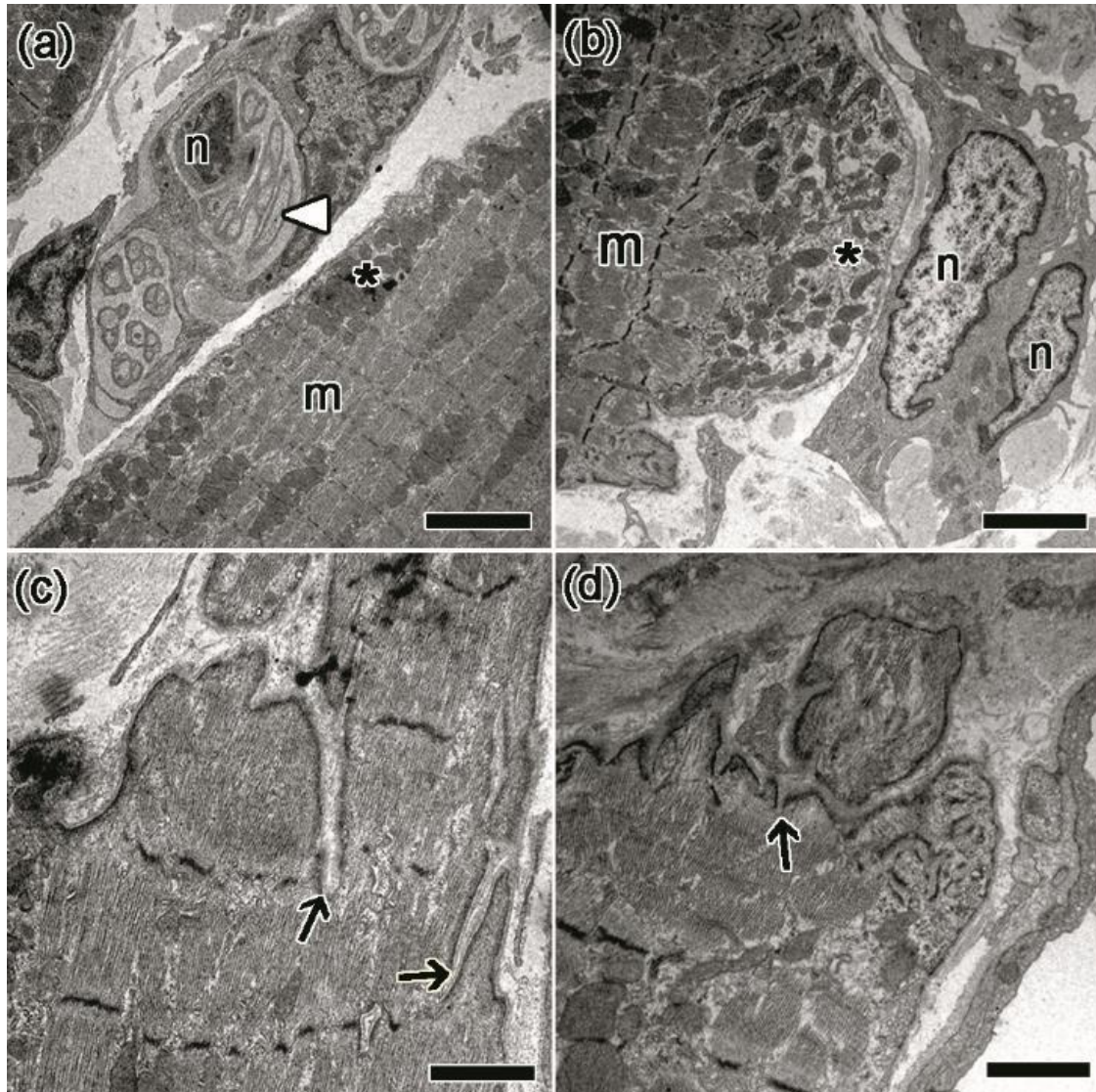
Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle: (a) Camada queratinizada (q) com padrão serrilhado entre células (seta branca), abaixo camada granulosa (g), queratinócitos com grânulos no citoplasma (* branco). Grupo *mdx*: (b) (a) Camada queratinizada (q) com padrão serrilhado entre células (seta branca), camada granulosa (g) com querato-hialina no citoplasma (* branco) dos queratinócitos. Grupo controle: (c) Camada espinhosa (e) e núcleo (n) de célula da camada basal, abaixo lâmina própria (lp). Grupo *mdx*: (d) Camada espinhosa (e), inferiormente a camada basal, núcleo de célula da camada basal (n). Barras: 2 μ m (a, b, d) e 5 μ m (c).

Na região de interface entre a camada basal e lâmina própria observou-se uma área de tecido conjuntivo com inúmeros fibroblastos. Na transição da lâmina própria e da musculatura do grupo controle foram encontradas fibras nervosas não mielinizadas adjacentes a fibras musculares, disposição dos sarcômeros em séries e grupamentos mitocondriais subsarcolemais (Fig. 20.a). No grupo *mdx*, observou-se uma ampla área com depósito de tecido conjuntivo e miocitólise da fibra muscular (Fig. 20.b).

Foram evidenciados invaginações sarcoplasmáticas (feixes de colágeno) (Fig. 20.c). Na lâmina própria e na interface do tecido conjuntivo com as células musculares foram observados extenso comprometimento com alterações na relação na região de junção, com redução das invaginações sarcoplasmáticas (Fig. 20.d).

Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão do tecido muscular da língua de camundongos.



Fonte: Tomiate, 2022.

Legenda: Grupo controle: (a) Fibra muscular (m) e grupamentos mitocondriais subsarcolemais (* preto) adjacentes a fibras nervosas amielínicas (cabeça de seta branca) e núcleo de célula de Schwann (n). Grupo *mdx*: (b) Miocitólise (* preto) de fibras musculares (m), fibroblastos (n) adjacentes. Grupo controle: (c) Invaginações sarcoplasmáticas (setas pretas). Grupo *mdx*: (d) Invaginação sarcoplasmática (seta preta). Barras: 2 μ m.

6. DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a morfologia das papilas linguais e os aspectos tridimensionais do tecido conjuntivo associado das papilas. Além das descrições das características estruturais e ultraestruturais do epitélio, lâmina própria e tecido muscular da língua de camundongos *mdx*.

A língua dos camundongos é essencialmente semelhante à caracterizada por Kobayashi et al. (1989) e apresenta: ápice, corpo e raiz. As regiões rostral e medial do corpo da língua apresentaram papilas fungiformes e filiformes de formato cônico. Na proeminência lingual, foram encontradas apenas papilas filiformes de morfologia triangular. Nas margens da proeminência observaram-se papilas folhadas e na região caudal uma papila valada.

Distribuídas por toda a extensão do ápice e regiões rostral e medial do corpo da língua estavam as papilas filiformes de formato cônico, ou seja, apresentaram uma base maior do que o ápice e ponta arredondada, semelhantes às encontradas em ratos *Sprague Dawley* (REGINATO et al., 2014).

Após a maceração epitelial sob MEV foram revelados TCAs de morfologia cônica, semelhante a descrição presente na literatura para camundongos (KOBAYASHI et al., 1989) e ratos *Sprague Dawley* (REGINATO et al., 2014). Entre o grupo controle e *mdx* não foram encontradas diferenças nas características morfológicas e estruturais para as papilas cônicas da superfície epitelial e TCA.

As papilas fungiformes estavam localizadas adjacentes as papilas filiformes de formato cônico e distribuídas principalmente pelas regiões rostral e medial do corpo da língua e possuem morfologia semelhante à um “cogumelo” assim como em outros roedores (REGINATO et al., 2014; CIENA et al., 2019).

No topo da papila fungiforme está presente um botão gustativo, como revelado pela microscopia de luz. Sob a técnica de maceração epitelial, o TCA apresentou um formato cilíndrico com uma cavidade no topo, essa característica morfológica corrobora com os resultados de Kobayashi et al. (1989) para camundongos, que a denomina de semelhante a craca e assemelha-se a outros roedores (KITAJIMA; KOBAYASHI, 1992; REGINATO et al., 2014). Os grupos controle e *mdx* não apresentaram diferenças morfológicas entre a papila fungiforme e respectivo TCA.

Na região caudal do corpo da língua está presente a proeminência lingual, observaram-se papilas filiformes com aspecto triangular, ou seja, caracterizadas por uma morfologia diferente das filiformes das regiões rostral e medial. No grupo *mdx*, as papilas da proeminência

apresentaram pontas fimbriadas diferentemente do grupo controle, aspecto relacionado ao desgaste que essas papilas, de função mecânica, possuem. Outros roedores como os ratos *Sprague Dawley* (REGINATO et al., 2014) e o mocó (*Kerodon rupestris*) (ARO et al., 2019) também apresentaram papilas filiformes na região da proeminência lingual. Os TCAs das papilas filiformes da proeminência apresentam morfologia semelhante à “pá” como descritas por Kobayashi e Iwasaki (1989) para os camundongos.

Na face lateral da proeminência lingual, as papilas folhadas foram localizadas bilateralmente, estas consistem em dobras epiteliais paralelas delimitadas por sulcos profundos. São morfologicamente semelhantes as descrições em cutia (CIENA et al., 2013), porquinho-da-Índia (CIENA et al., 2019) e camundongos (KOBAYASHI et al., 1989). Após a remoção da superfície epitelial foram reveladas inúmeras aberturas de ductos separados por projeções laminares como as descritas por Kobayashi et al. (1989). Os grupos apresentaram características semelhantes e as diferenças no número de aberturas de ductos podem estar relacionadas com variações individuais.

Medialmente na raiz da língua, estava presente uma papila valada com morfologia de domo. A quantidade e forma é semelhante em camundongos (KOBAYASHI et al., 1989) e ratos *Sprague Dawley* (REGINATO et al., 2014). A maceração epitelial revelou a presença de um sulco elíptico que delimitou o suporte papilar; e na microscopia de luz, os botões gustativos foram localizados profundamente nas paredes laterais assim como na língua da cutia (CIENA et al., 2013). O TCA da papila valada apresentava morfologia “alveolar” devido à presença de múltiplos botões gustativos conforme descritos por Kobayashi et al. (1989), também denominados de TCA semelhante a um “favo” (*beehive-like*).

A estratigrafia epitelial de ambas as linhagens de camundongos foi caracterizada pela composição das camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal. Estas são semelhantes ultraestruturalmente às descritas para a cutia (CIENA et al., 2013), capivara (WATANABE et al., 2013) e porquinho-da-Índia (CIENA et al., 2019). Entre os grupos, o *mdx* apresentou maior justaposição de células planas na camada córnea, ademais, as outras camadas epiteliais apresentaram características semelhantes. A análise morfométrica revelou maior espessura no epitélio do grupo *mdx*. Essa característica pode estar relacionada a uma maior frequência da renovação epitelial associada ao desgaste que o epitélio dos camundongos distróficos sofre em decorrência do comprometimento dos músculos associados à mastigação (MULLER et al., 2001; SPASSOV et al., 2010).

A lâmina própria foi composta principalmente por tecido conjuntivo com espessura delgada em toda a extensão lingual. Os tons avermelhados e esverdeados de fibras de colágenos

apresentam composições semelhantes e estão presentes em outra região da cavidade oral como a lâmina própria da mucosa palatina (TOMIATE et al., 2021a; 2021b). Entretanto, o grupo *mdx* caracterizou-se pela maior intensidade da coloração das fibras, demonstrando maior deposição e característico aspecto de fibrose tecidual.

O tecido muscular inferior a lâmina própria do corpo da língua apresentou diferenças entre os grupos controle e *mdx*. No modelo da DMD, observou-se que os músculos apresentam características heterogêneas em regiões do corpo da língua, como a presença de focos inflamatórios e intussuscepção de colágeno de coloração amarelada na musculatura, esses aspectos são algumas das múltiplas etapas do processo degenerativo muscular (PORTER et al., 2002; CHAMBERLAIN et al., 2007). Enquanto que, de acordo com Spassov et al. (2010), para camundongos *mdx* de 100 dias o tecido muscular permanece inalterado, denotando que a degeneração muscular progressiva afeta a língua em uma idade mais avançada.

Próximo à raiz da língua, a lâmina própria estava intimamente associada a grupamentos glandulares de dois tipos: glândulas mucosas e serosas circundadas por colágeno e tecido muscular, em proximidade às papilas folhadas e valadas. A presença de colágeno próximo aos aglomerados de glândulas é comumente encontrada em outras regiões da cavidade oral, como no palato mole (TOMIATE et al., 2021a; 2021b). A disposição do tecido muscular próximo ao aglomerado de glândulas e a conexão com as papilas folhada e valada eram semelhantes às características encontradas na língua de outros mamíferos (CIENA et al., 2013; CIZEK et al., 2017; CIENA et al., 2019).

Ao contrário do grupo controle, a linhagem *mdx* teve um comprometimento com depósito de colágeno no tecido muscular adjacente às glândulas, que pode resultar em pseudo-hipertrofia das glândulas mucosas, enquanto que as glândulas serosas apresentaram redução da área. Em outra patologia que também promove inflamação crônica, como na doença de Chagas, características semelhantes foram encontradas nas glândulas mucosas (BERTOLDO et al., 2019).

O processo degenerativo muscular foi caracterizado na literatura como diferente em músculos distintos com a idade influenciando os estágios (ALLEN et al., 2016). A principal característica um processo cíclico de degeneração e regeneração, e a formação de fibroses (PASTORET; SEBILLE, 1995; MARTINEZ et al., 2021). Portanto, a língua de camundongos *mdx* com 6 meses de idade apresenta múltiplas alterações musculares pontuais com diferentes graus entre as regiões anatômicas como miocitólise, diminuição das invaginações sarcoplasmáticas e deposição de colágeno. Essas características também estiveram presentes com diferentes intensidades nos músculos mastigatórios como masseter e temporal de 100 dias

(SPASSOV et al., 2010), e em camundongos *mdx* de 12 meses com uma degeneração do tipo leve do músculo masseter (MULLER et al., 2001).

As papilas linguais dos grupos controle e *mdx* não apresentaram grandes diferenças morfológicas, portanto a morfologia permanece inalterada mesmo em face do processo degenerativo da distrofia aos 6 meses de idade. Entretanto, na região rostral da língua do grupo *mdx* foi observado maior desgaste nas papilas filiformes triangulares e em decorrência disso apresentam aspecto de pontas fimbriadas. Essa característica pode estar relacionada ao comprometimento de músculos associados à mastigação conforme descrito por Spassov et al. (2010), consequentemente devido a menor força dessas musculaturas promovem indiretamente uma maior abrasão e desgaste das papilas filiformes triangulares.

Na DMD, Engel-Hoek et al. (2013) descreveram um aumento da espessura da língua destacando a pseudo-hipertrofia desta musculatura, além da diminuição de força da mesma contra o palato, bem como o comprometimento de outros músculos associados à mastigação. A combinação desses fatores compromete a trituração de alimentos na cavidade bucal ocasionando em maior dificuldade na ingestão de alimentos sólidos e possivelmente refletindo em maior desgaste na mucosa especializada da língua promovendo maior abrasão nas papilas filiformes e frequência de renovação das células da camada córnea.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que as características do epitélio, lâmina própria e tecido muscular da língua de camundongos *mdx* aos 6 meses de idade foram evidenciadas. Como reflexo indireto do processo de degeneração na mucosa especializada, houve maior desgaste das papilas filiformes triangulares da proeminência e aumento da espessura epitelial de diferentes regiões da língua. Na lâmina própria, o grupo *mdx* apresentou maior intensidade da deposição de colágeno, inclusive adjacente às glândulas mucosas e serosas. Na região da submucosa, houve diminuição da área das glândulas serosas e aumento das glândulas mucosas. As fibras musculares da língua apresentaram extenso comprometimento em decorrência do processo de degeneração muscular causado pela ausência de distrofina.

REFERÊNCIAS

- ADNYANE, I. K. M.; ZUKI, A. B.; NOORDIN, M. M.; AGUNPRIYONO, S. Morphological study of the lingual papillae in the barking deer, *Muntiacus muntjak*. **Anat Histol Embryol**, v. 40, n. 1, p. 73–77. 2011.
- AGUNGPRIYONO, S.; YAMADA, J.; KITAMURA, N.; NISA, C.; SIGIT, K.; YAMAMOTO, Y. Morphology, of the dorsal lingual papillae in the lesser mouse deer, *Tragulus javanicus*. **J. Anat.**, Great Britain, p. 635-640. dez. 1995.
- ALLEN, D. G.; WHITEHEAD, N. P; FROEHNER, S. C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca^{2+} , Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. **Physiol. Rev.**, v. 96, n. 1, p. 253-305, 2016.
- ALOYSIUS, A.; BORN, P.; KINALI, M.; DAVIS, T.; PANE, M.; MERCURI, E. Swallowing difficulties in Duchenne muscular dystrophy: indications for feeding assessment and outcome of video fluoroscopic swallow studies. **Eur. J. Paediatr. Neurol.**, v.12 p. 239–45. 2008.
- ALVES, N.; CÂNDIDO, P. L. **Anatomia** – Para o Curso de Odontologia Geral e Específica. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Santos Editora. 2009. p. 263.
- ARO, M. M. de; dos SANTOS, A. C.; da SILVEIRA, E. E.; da SILVA LISBOA NETO, A. F.; de OLIVEIRA, M. F.; de ASSIS NETO, A. C. Morphological tools to evaluate the digestory appa- ratus in rocky cavy (*Kerodon rupestris*). **Microsc. Res. Tech.** p. 1-13, 2019.
- BECKER, R. O.; DA SILVA, M.H.; PEREIRA, G. A. M.; PAVANI, K.K.G.; BRUM, L.F.S. **Anatomia Humana**. 1. ed. Porto Alegre: SAGAH, 2018. 560p.
- BERALDO-MASSOLI, M. C.; RIBEIRO, P. R. Q.; VIEIRA, L. G.; MENEZES, L. T.; LIMA, M. O. SOUZA, R. R.; MACHADO, M. R. F.; SANTOS, A. L. Q. Morfologia da língua e características das papilas linguais de *Cuniculus paca* (Rodentia: Cuniculidae). **Biotemas**, vol. 26, n. 4, p. 167-177, dezembro de 2013.
- BERTOLDO, B. B.; ETCHEBEHERE, R. M.; FURTADO, T. C. D. S.; FARIA, J. B. D.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, M. F. D.; RODRIGUES, D. B. R.; PEREIRA, S. A. D. L. Lingual salivary gland hypertrophy and decreased acinar density in chagasic patients without megaesophagus. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, vol. 61, 2019.
- BLAKE, D. J.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Utrophin: A structural and Functional Comparison to Dystrophin. **Brain Pathology**, vol. 6., p. 37-47. 1996.
- BULFIELD, G; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A. L.; MOORE, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 81, p. 1189-1192, fev. 1984.
- BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D. J.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J. CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurol.**, v. 9, p. 77–93. 2010.

CIENA, A. P.; BOLINA, C. S.; ALMEIRA, S. R. Y.; RICCI, R. E. G.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, M. C. P.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I.-S. Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). **J. Anat.**, v. 223, p. 152-158, 2013.

CIENA, A. P.; SANTOS, A. C.; VASCONCELOS, B. G.; RICCI, R. E. G.; ASSISS-NETO, A. C.; ALMEIDA, S. R. Y.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I.-S. Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of Guinea pig (*Cavia porcellus*). **Acta Zool.**, v. 98, p. 53-60. 2019.

CIZEK, P.; HAMOUZOVA, P.; JEKL, V.; TICHY, F. Light and scanning electron microscopy of the tongue of a degu (*Octodon degus*). **Anat. Sci. Int.**, v. 92, 493-499. 2017

CROS, D.; HARNDEN, P.; PELLISSIER, J. F.; SERRATRICE, G. Muscle hypertrophy in Duchenne muscular dystrophy. **J. Neurol.**, vol. 236, p. 43-47, 1989.

COSTACURTA, L. **Anatomia microscópica buco-dental humana**. São Paulo: Atheneu Editora da Universidade de São Paulo, 1979. p. 166.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **J. Pediatr. Neurol.**, vol. 36, n. 1, p. 1-7. 2007.

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHELL, A. W. M. **Gray – Anatomia Clínica para Estudantes**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2021. p. 960.

EL-BAKARY, N. E. R.; ABUMANDOUR, M. M. A. Morphological studies of the tongue of the egyptian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and their lingual papillae adaptation for its feeding habitats. **Anat Histol Embryol**, v. 46, n. 5, p. 474-486. 2017.

EMERY, A. E. H.; MUNTONI, F.; QUINLIVAN, R. C. M. **Duchenne muscular dystrophy**. 4ª Ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. p. 320.

EMURA, S.; HAYAKAWA, D.; CHEN, H.; SHOUMURA, S. Morphology of the dorsal lingual papillae in the Japanese macaque and savanna monkey. **Anat., Histol., Embryol.**, v. 31, n. 5, p. 313-316, 2002.

EMURA, S.; OKUMURA, T.; CHEN, H. Morphology of the lingual papillae in the sitatunga. **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v.88, n. 1, p. 23-27, mai. 2011a.

EMURA, S.; OKUMURA, T.; CHEN, H. Morphology of the lingual papillae in the Patagonian cavy. **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v. 88, n. 3, p.121-125, nov. 2011b.

EMURA, S.; OKAMURA, T.; CHEN, H. Morphology of the lingual papillae in the roan antelope. **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v.88, n. 3, p. 127-131, nov. 2011c.

EMURA, S.; OKAMURA, T.; CHEN, H. Morphology of the lingual papillae in the giraffe. **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v. 89, n. 4, p. 99-103, fev. 2013.

ENGEL-HOEK, L. van den; ERASMUS, C. E.; HENDRIKS, J C M.; GEURTS, A. C. H.; KLEIN, W. M.; PILLEN, S. SIE, L. T.; SWART, B. J. M.; GROOT, I, J, M. Oral muscles are progressively affected in Duchenne muscular dystrophy: implication for dysphagia treatment. **J. Neurol.**, v. 260, p. 1295-1303. 2013.

ENGEL-HOEK, L. van den; de GROOT, I. J. M.; SIE, L. T.; van BRUGGEN, H. W.; de GROOT, S. A. F.; ERASMUS, C. E.; van ALFEN, N. Dystrophic changes in masticatory muscles related chewing problems and malocclusions in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disord.**, v. 26, p. 354-360. 2016.

ERDOGAN, S.; SAGSOZ, H. Papillary Architecture and Functional Characterization of Mucosubstances in the Sheep tongue. **Anat. Rec.** v. 301, p. 1320-1335. 2018.

GOMES, A. L. O.; PINTO, A. N.; GÓES, E. R. et al. Desempenho motor e funcional na Distrofia Muscular de Duchenne: estudo de um caso. **J. Health Sci. Inst.**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 131-135, 2011.

HAEBERLE, H.; LUMPKIN, E. A. Merkel cells in somatosensation. **Chem. Percept.** v.1, p.110-118, 2008.

HIAMAE, K. M.; PALMER, J. B. Tongue Movements in feeding and speech. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, n. 6, p. 413-429, 2003.

HIATT, J. L.; GARTNER, L. P. **Anatomia Cabeça & Pescoço**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 369.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. **Cell**, v. 51, p. 919-928, 1987.

IWASAKI, S.I. Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. **J. Anat.**, v. 201, n. 1, p. 1–13, 2002.

IGBOKWE, C. O.; MBAJIORGU, F. E. Anatomical and scanning electron microscopic study of the tongue in the African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). **Anat. Histol. Embryol.**, vol. 48, p. 455–465. 2019.

JACKOWIAK, H.; GODYNICKI, S. The distribution and structure of the lingual papillae on the tongue of the bank vole *Clethrionomys glareolus*. **Folia Morphol.**, v. 64, n. 4, p. 326–333, 2005.

KITAJIMA, K.; KOBAYASHI, K. Light and electron microscopic studies on the lingual papillae and their connective tissue cores in hamster. **Jpn. J. Oral Biol.**, v. 34, p. 503–530. 1992

KOBAYASHI, K. Three-dimensional architecture of the connective tissue core of the lingual papillae in the Guinea pig. **Anat. Embryol.**, v. 182, n. 3, p. 205–213. 1990.

KOBAYASHI, K.; IWASAKI, S. Comparative studies on the stereo architecture of the connective tissue papillae in some mammalian tongues. **Prog. Clin. Biol. Res.**, vol. 295, p. 303–308. 1989.

KOBAYASHI, K.; KUMAKURA, M.; SHINKAI, H.; ISHII, K. Three-dimensional fine structure of the lingual papillae and their connective tissue cores in the human tongue. **Kaibogaku Zasshi (J. Anat.)**. v. 69, n. 5, p. 624-635, out. 1994.

KOBAYASHI, K.; MIYATA, K.; TAKAHASHI, K.; IWASAKI, S. Three-dimensional architecture of the connective tissue papillae of the mouse tongue as viewed by scanning electron microscopy. **Kaibogaku Zasshi (J. Anat.)**, v. 64, n. 6, 523–538. 1989.

KOBAYASHI, K.; TOH, H.; TOMO, S.; IDEGUCHI, T.; NAGAMOTO, S.; KIKUCHI, N.; ITOH, R. Scanning electron microscopic study on the lingual papillae in the Manchurian chipmunk, *Tamias sibiricus asiaticus*. **Okajimas Folia Anat Jpn**, v. 69, n. 2-3, 139-43.

KILINC, M.; ERDOGAN, S.; KETANI, S.; KETANI, M. A. Morphological study by scanning electron microscopy of the lingual papillae in the middle east blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*, Nehring, 1898). **Anat., Histol., Embryol.**, v. 39, n. 6, p. 509–515. 2010.

KUMAR, S.; BATE, L. A. Scanning electron microscopy of the tongue papillae in the pig (*Sus scrofa*). **Microsc. Resch Tech.**, v. 63, p. 253-258, 2004.

MARANHÃO-FILHO, P.; VINCENT, M. Guillaume-Benjamin Duchenne: a miserable life dedicated to science. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 77, n. 6, p. 442-444, 2019.

MARTINEZ, G. Z.; GRILLO, B.; ROCHA, L. C.; JACOB, C.; PIMENTEL NETO, J.; TOMIATE, A. N.; BARBOSA, G. K.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Morphological Changes in the Myotendinous Junction of mdx Mice. **Microsc. Microanal.**, v. 27, n. 5, p. 1290–1294. 2021.

MARTINEZ, M. M.; WATANABE, I.; MARTINEZ, F. E.; BASS, N. A.; RIBEIRO, O.; GREGÓRIO, E. A. Scanning Electron Microscopy study of the hard palatine mucosa of opossum (*Didelphis albiventris*). **Rev. chil. Anat.**, v.15, n.1, 1997.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F; AGUR, A. M. R. **Clinically Oriented Anatomy**. 8ª Ed. Filadélfia: Wolters Kluwer. 2018. p. 1168.

MORAES, F. M.; FERNANDES, R. C. S. C.; MEDINA-ACOSTA, E. Distrofia Muscular de Duchenne: relato de caso. **Revista científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 6, n. 2, p. 11-15, 2011.

MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; ROYUELA, M.; LEGER, M.E.; MULLER, A.; BACOU, F.; PONS, F.; HUGON, G.; MORNET, D. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old mdx mice. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 22, p. 133-139. 2001.

MUNGER, B. L.; IDE, C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. **Arch. Histol. Cytol.** v. 51, n. 1, p. 1-34, 1988.

NAKANO, T. NaOH Cell maceration/Scanning electron microscopic studies on the architecture of the lamina propria of the mouse palate. **Auris Nasus Larynx**, v. 19, n. 2, p. 133-142, 1992.

NAKANO, T. NaOH Cell maceration/Scanning electron microscopic studies on the connective tissue core in the incisive portion of the mouse had palate. **Auris Nasus Larynx**, v. 22, n. 1, p. 29-37, 1995.

NASR, E. S.; GAMAL, A. M.; ELSHEIKH, E. H. Light and scanning electron microscopic study of the dorsal lingual papillae of the rat *Arvicanthis niloticus* (Muridae, Rodentia). **J. Am. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 619–627, 2012

NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 672 p.

PANE, M.; VASTA, I.; MESSINA, S. et al. Feeding problems and weight gain in Duchenne muscular dystrophy. **Eur. J. Paediatr. Neurol.**, v. 10, p. 231–236, 2006.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. **Muscle & Nerve**, v. 18, n. 10, p. 1147–1154. 1995.

PORTER, J. D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H. J.; RAO, J. S.; MERRIAM, A. P., RICHMONDS, C. R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F. H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, n. 3, p. 263–272. 2002.

REGINATO, G. S.; BOLINA, C. S.; WATANABE, I; S.; CIENA, A. P. Three-Dimensional Aspects of the lingual papillae and their connective tissue cores in the tongue of rats: A scanning electron microscope study. **Sci. World J.** 2014.

REGINATO, G. S.; BARBOSA, G. K.; FERREIRA, A. O.; VASCONCELOS, B. G.; RICCI, R. E. G.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Morphological and ultrastructural characteristics of the tongue of wild boar. **Eur. J. Histochem.**, [S. l.], v. 64, n. 2, 2020.

SANDERS, I.; MU, L. A three-dimensional atlas of human tongue muscles. **Anat. Rec. (Hoboken)**. v. 296, n. 7, p. 1102–1114, 2013.

SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). *Animais de Laboratório - criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 115-118.

SEIXAS, S. L.; LAGROTA-CÂNDIDO, J.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 55, n.3, p. 610-617, 1997.

SHINDO, J.; YOSHIMURA, K.; KOBAYASHI, K. Comparative morphological study on the stereo-structure of the lingual papillae and their connective tissue cores of the American beaver (*Castor canadensis*). **Okajimas Folia Anat. Jpn.**, v. 82, n.4, p. 127–137, 2006.

SPASSOV, A.; GREDES, T.; GEDRANGE, T.; LUCKE, S.; PALVOLIC, D.; KUNERT-KEIL, C. Histological changes in masticatory muscles of mdx mice. **Arch. oral biol**, v. 55, p. 318-324. 2010.

TEÓFILO, T. S.; MORAIS, M. R. P. T.; PORTO, M. L.; CAVALCANTI, D. M. L. P.; DINIZ, A. N.; FONTENELE-NETO, J. D. Structural features and lamellar mechanoreceptors of the collared peccary's tongue (*Pecari tajacu*, Linnaeus 1758). **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.13, n.1, p.70-74, (jan-mar) 2019.

TOMIATE, A. N.; BARBOSA, G. K.; ROCHA, L. C.; VASCONCELOS, B. G.; de ALMEIDA, S. R. Y.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Structural and

ultrastructural characterization of the palatine epithelium of the Guinea pig: A new record of telocytes in the oral cavity. **Microsc. Res. Tech.**, v. 84, p. 1621–1627. 2021a.

TOMIATE, A.; BARBOSA, G.; ROCHA, L.; de ALMEIDA, S.; de OLIVEIRA, M.; WATANABE, I.; CIENA, A. Structural and Ultrastructural Characteristics of the Red-Rumped Agouti (*Dasyprocta leporina*—Linnaeus, 1758) Palatine Epithelium. **Microsc. Microanal.**, v. 27, n. 3, p. 645-649. 2021b.

ÜNSALDI, E. Macroscopic and light microscopic structure of fungiform papillae on the tongue of squirrels (*Sciurus vulgaris*). **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 16, n.1, p. 115–118, 2010.

UTIYAMA, C.; WATANABE, I.; KONIG-JR, B.; KOGA, L. Y.; SEMPRINI, M.; TEDESCO, R. C. Scanning electron microscopic study of the dorsal surface of the tongue of Calomys callosus mouse. **Ann. Anat.**, v. 177, n. 6, p. 569–572, 1995.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. **J. Mol. Neurosci.**, v. 34, p. 241-248. 2008.

WATANABE, I.; HAEMMERLE, C. A. S.; DIAS, F. J.; CURY, D. P.; SILVA, M. C. P.; SOSTHINES, M. C. K.; SANTOS, T. C.; GUIMARÃES, J. P.; MIGLINO, M. A. Structural Characterization of the Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) Tongue by Light, Scanning, and Transmission Electron Microscopy. **Microsc. Res. Tech.** v. 76, p. 141–155, 2013.

ZHENG, J.; KOBAYASHI, K. Comparative morphological study on the lingual papillae and their connective tissue cores (CTC) in reeves' muntjac deer (*Muntiacus reevesi*). **Ann. Anat.**, v. 188, n. 6, p. 555-564. 2006.

ANEXO I – Produção científica.

Título: Structural and Ultrastructural Changes in the Tongue of *mdx* Mice.

Autores: TOMIATE, A. N., BARBOSA, G. K., RICI, R. E. G., de ALMEIDA, S.R. Y., WATANABE, I., CIENA, A. P.

Revista: Microscopy and Microanalysis. Fator de Impacto: 4.1.

Doi: <https://doi.org/10.1017/S1431927622000022>*Microscopy and Microanalysis* (2022), 1–8
doi:10.1017/S1431927622000022Microscopy^{AND}
Microanalysis

Original Article

Structural and Ultrastructural Changes in the Tongue of *mdx* MiceAndré N. Tomiate¹, Gabriela K. Barbosa¹, Rose E. G. Rici², Sonia Regina Y. de Almeida³, Ii-sei Watanabe^{2,3} and Adriano P. Ciena^{1*}¹Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil and ³Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas - ICB III, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

The *mdx* mouse is an experimental model of Duchenne muscular dystrophy, a genetic disorder characterized by progressive muscular degeneration which affects the oral cavity musculature, and promotes difficulty in swallowing. This study aimed to describe morphological, structural, and ultrastructural changes in the tongue mucosa and musculature of *mdx* mice. Forty six-month-old mice were divided into two groups: Control C57bl/10 ($n = 20$) and *mdx* C57bl/10^{mdx} ($n = 20$). The tongue was dissected and analyzed with light microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy techniques. Our results showed conical and triangular filiform, fungiform, foliate, and vallate papillae, and their connective tissue cores. The epithelium layers identified were corneum, granulosum, spinosum, and basale. The *mdx* group had a thicker epithelium. Lamina propria was composed of reddish and greenish collagen. In *mdx*, collagen was present in the musculature of the tongue's body and in the muscular tissue between mucous and serous glands of the caudal region. Musculature was also characterized by a shorter length of sarcoplasmic invaginations, myocytolysis in mitochondrial groupings, and inflammatory focus. In conclusion, the tongue of 6-month-old *mdx* mice had morphology, structure, and ultrastructure revealed, showing higher wear of filiform papillae indirect reflex from the muscular degeneration process.

Key words: animal model, connective tissue cores, Duchenne muscular dystrophy, lingual papillae, muscular degeneration, rodents

(Received 1 October 2021; revised 10 December 2021; accepted 8 January 2022)

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disorder linked to the X chromosome that causes progressive muscle degeneration due to changes in the gene that encodes dystrophin, a protein in the membrane of muscle cells (Hoffman et al., 1987).

The dystrophin deficiency compromises the subsarcolemmal integrity and consequently promotes cycles of muscle degeneration and regeneration (Allen et al., 2016). This characteristic causes fiber size modification, tissue necrosis, and stimulates the deposition of interstitial fibrous connective tissue and intramuscular adipose tissue, these changes cause motor impairment (Cros et al., 1989; Deconinck & Dan, 2007).

The early stages of DMD report disorders with mastication and it worsens with aging (van den Engel-Hoek et al., 2016). The musculature associated with chewing and swallowing is progressively affected and causes feeding difficulties (Pane et al., 2006; Aloysius et al., 2008). Moreover, the reduction in the tongue musculature strength provides less pressure against the palate and makes it difficult to swallow solid foods (van den Engel-Hoek et al., 2013).

The isogenic *mdx* (muscular dystrophy X-chromosome-linked) mouse lineage is used as an animal model to study DMD (Bulfield et al., 1984; Vainzof et al., 2008). The previous studies demonstrate the changes of muscles involved in mastication such as the masseter, temporal, and tongue of 100-day-old *mdx* mice (Spasov et al., 2010) and degeneration of 26-month-old *mdx* mice tongue (Chamberlain et al., 2007), but not lingual mucosa morphological structures. Thus, the repercussions of DMD on the tongue specialized mucosa and its relation to the musculature have not yet been elucidated.

The present study aimed to describe changes in the structural and ultrastructural morphological characteristics of the epithelium, lamina propria, and musculature of the tongue of *mdx* mice.

Materials and Methods

Animals

Forty six-month-old mice from two strains were used: Control group—C57bl/10 ($n = 20$) and *mdx* group—C57bl/10^{mdx} ($n = 20$). The animals were allocated in the Animal Bioterium of the Anatomy Laboratory, Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, São Paulo (SP), Brazil. The Ethics Committee on the Use of Animals of the UNESP (no. 2381/2021) approved the procedures. The animals were euthanized with an overdose of Ketamine (50 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg), i.p. injection, and the tongues were dissected by ventral incision.

*Corresponding author: Adriano P. Ciena, E-mail: adriano.ciena@unesp.brCite this article: Tomiate AN, Barbosa GK, Rici REG, de Almeida SRY, Watanabe Ii-sei, Ciena AP (2022) Structural and Ultrastructural Changes in the Tongue of *mdx* Mice. *Microsc Microanal*. doi:10.1017/S1431927622000022

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press on behalf of the Microscopy Society of America

Light Microscopy and Morphometry

The samples ($n = 5$ per group) were dehydrated in an increasing series of alcohols (70% to absolute) and included in histological paraffin. We made sagittal and transverse sections ($6\ \mu\text{m}$ thickness) and stained them with the techniques of Hematoxylin and Eosin (HE) and Picrosirius Red (PSR). We analyzed the PSR sections under polarized light and obtained the images with a light microscope (Carl Zeiss Microimaging, Axioskop 40, Göttingen, Germany) at the Biosciences Institute of the UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Morphometric analyses were performed in both groups to measure the epithelial thickness of the tongue body median region ($n = 125$ per group) and of the lingual prominence region ($n = 125$ per group). We performed the D'Agostino and Pearson test to verify the normality of the data and both variables resulted in non-normal distribution, therefore we analyzed the data with the Mann-Whitney test with a significance level of $p < 0.05$.

The proportion of the tongue and the serous and mucous glands area ($n = 25$ per group) were measured. We performed the Shapiro-Wilk test to verify the normality of the data and both variables resulted in non-normal distribution; therefore, the data were analyzed with the Mann-Whitney test, and the significance level assumed was $p < 0.05$.

All mensuration was made through ImageJ™ (Bethesda, MD, USA) software, and statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9.3.0 software.

Scanning Electron Microscopy

The samples ($n = 10$ per group) were fixed in a modified Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, in 0.1 M sodium cacodylate solution, pH 7.4) for 24 h at 4°C (Watanabe et al., 2013). The samples were separated into two processes, epithelial surface analysis ($n = 5$ per group) and characterization of the lamina propria tridimensional aspect, also denominated as connective tissue cores (CTCs) ($n = 5$ per group). For the CTC analysis, samples were macerated by immersion in a 10% sodium hydroxide (NaOH) for 4 days at room temperature (Ciena et al., 2019). Then, they were rinsed and immersed in daily changes of distilled water for 3 days at 4°C.

After, all samples were postfixed in 1% osmium tetroxide solution, dehydrated in an increasing series of alcohols (70% to absolute), dried at a critical point dryer (Balzers CPD-030) with liquid CO₂ (Barbosa et al., 2020), mounted on stubs, and coated with gold (Balzers 040 SDC). All the samples were examined by scanning electron microscopy (LEO 435 VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at the Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Transmission Electron Microscopy

We performed transversal sections ($2\ \text{mm}^3$) in the tongue for ultrastructural analysis. Samples ($n = 5$ per group) were fixed in a modified Karnovsky solution (containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in phosphate buffer saline solution to 0.1 M, pH 7.3) (Martinez et al., 2021). Then, the samples were postfixed in 1% osmium tetroxide, at 4 °C, and in 5% uranyl acetate solution at room temperature, dehydrated in an increasing series of alcohols (70% to absolute), immersed in propylene oxide, and embedded in Spurr™ resin.

The ultrathin sections were collected in 200-mesh (EMS™), the analyzed area was stained with 1% toluidine blue, and the copper grid was contrasted with 4% uranyl acetate solution and 0.4% lead citrate aqueous solution (Ciena et al., 2019). The copper grids were examined with a transmission electron microscope (JEOL 1010, JEOL Ltd., Tokyo, Japan), Institute of Biomedical Sciences-III, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Results

The tongue dorsolateral regions of both groups were anatomically divided into apex, body, lateral, and root. The lingual body presented a median sulcus and a subtle lingual prominence in the caudal tongue region. There were filiform and fungiform papillae in the apex and body, filiform papillae in the lingual prominence. Four foliate papillae were observed bilaterally in the tongue lateral margin, and one vallate papilla was medially located in the caudal region (Fig. 1).

Light Microscopy

The tongue body of the Control group had fungiform papillae among short filiform papillae caudally directed, the epithelium was keratinized and thick ($89.25 \pm 18.50\ \mu\text{m}$); lamina propria

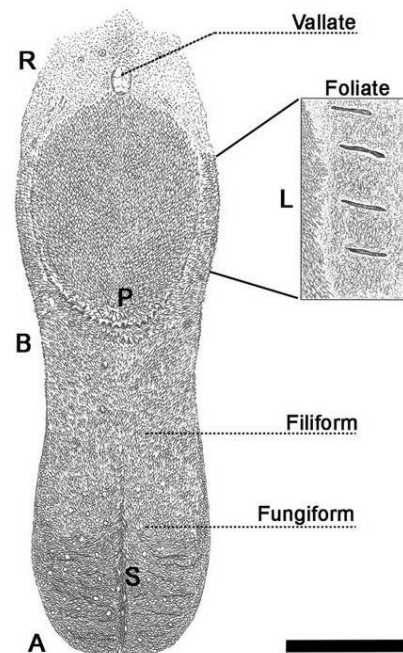


Fig. 1. Dorsolateral overview of the mice tongue. Anatomically characterized by apex (A), body (B), root (R), and lateral (L). The body had filiform and fungiform papillae, a median sulcus (S), and lingual prominence (P). Medially located in the caudal region a vallate papilla. Highlighted the foliate papillae on the tongue lateral sides. Scale bar: 1 mm.

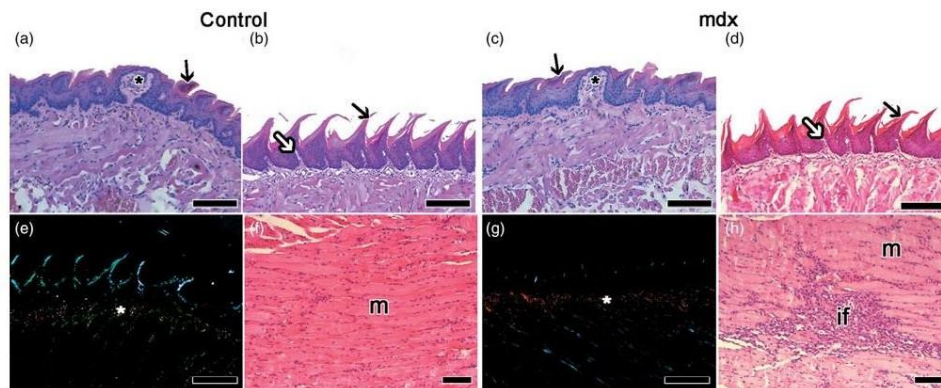


Fig. 2. Light micrograph. Control group: (a) fungiform papillae with a gustative bottom at the top (*) around filiform papillae (black arrow) in the lingual body. (b) In the lingual prominence filiform papillae (black arrow) with its papillary support (white arrow). In *mdx* group: (c) fungiform papillae and its gustative bottom at the top (*) and filiform papillae (black arrow) of the lingual body. (d) Filiform papillae (black arrow) and below the papillary support (white arrow) in the prominence. Control group: (e) lamina propria was composed of reddish and greenish collagen (white *). (f) Tongue muscle tissue (m) with peripheral nuclei. In *mdx* group: (g) lamina propria had greenish collagen and was mainly composed of reddish collagen (white *). (h) Inflammatory focus (if) in the muscle tissue (m). Stain: HE (a–d, f, h) and PSR under polarized light (e, g). Scale bars: 50 μm (f, h), 100 μm (a–e), and 500 μm (g).

located below had projections in the epithelium (Fig. 2a). In the lingual prominence were located filiform papillae, those were also directed to the caudal region, lamina propria formed the papillary support, fungiform papillae were absent, and epithelium was also keratinized and thick ($80.13 \pm 18.15 \mu\text{m}$) (Fig. 2b).

While in the *mdx* group, the epithelium of the tongue's body was keratinized and thicker ($97.61 \pm 21.62 \mu\text{m}$) than the Control group tongue's body median region ($p < 0.05$), lamina propria had similar features with papillary support in filiform and fungiform papillae (Fig. 2c). The lingual prominence only had filiform papillae, and epithelium was thicker ($99.41 \pm 27.83 \mu\text{m}$) in *mdx* than the Control group prominence ($p < 0.05$) (Fig. 2d).

The Control group lamina propria stained with PSR analyzed under polarized light was primarily composed of greenish and reddish collagen and, under this region, the tongue skeletal striated muscle had an association of yellowish and greenish collagen near the transition with lamina propria (Fig. 2e). The musculature was characterized by short muscle fibers (Fig. 2f).

In the *mdx* group, the lamina propria was mainly composed of reddish and greenish collagen; in some samples, the musculature was similar to the control group, although in other specimens dispersed yellowish collagen was present between and within muscular fibers near the lamina propria–musculature transition (Fig. 2g). The muscle tissue had short fibers, mostly with peripheral nuclei and regions of nuclei conglomerate characterizing an inflammatory focus (Fig. 2h).

Bilaterally located in the caudal region, foliate papillae had epithelial four-folds delimited by deep grooves with taste buds on the sidewalls (Fig. 3a). In the tongue dorsal caudal region, the vallate papilla had a central projection delimited by clefts with lateral gustatory buds (Fig. 3b). Furthermore, in the *mdx* group, foliate (Fig. 3c) and vallate (Fig. 3d) papillae were morphologically similar.

The submucosa of the caudal region presented glands groupings of two kinds: serous and mucous. Those were absent in the rostral and medial regions, and whereas near-associated to foliate

and vallate papillae. The serous glands were located more rostrally in relation to mucous glands. In the Control group, the gland clusters were surrounded by muscle tissue (Fig. 3e), and stained with PSR analyzed under polarized light was evidenced in high magnification yellowish and reddish collagen slightly involving the salivary glands (Fig. 3f).

The *mdx* group had a similar muscular disposition around the gland clusters (Fig. 3g). However, the PSR stain under polarized light demonstrated in a low magnification the presence of reddish collagen in lamina propria and of greenish color collagen distributed throughout the caudal region and deposited in the musculature associated with the gland clusters (Fig. 3h).

The proportion of the tongue and the glandular area presented differences between groups. In the Control group, the serous glands proportion was bigger ($35 \pm 4 \mu\text{m}^2$) than *mdx* ($29 \pm 11 \mu\text{m}^2$), and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). For mucous glands, the proportion in the Control group ($39 \pm 7 \mu\text{m}^2$) was smaller than the *mdx* ($46 \pm 12 \mu\text{m}^2$), and the group difference had statistical significance ($p < 0.05$).

Scanning Electron Microscopy

In the tongue's body, the Control group had conical-shape filiform papillae with a single tip and among them were present fungiform papillae with a mushroom-like morphology (Fig. 4a). The lingual prominence had filiform papillae characterized by a triangular shape mainly with a blunt tip (Fig. 4b). While in the *mdx* group, the tongue's body had similar features (Fig. 4c), however, the triangular-shaped papillae observed in the lingual prominence had several pointed processes (Fig. 4d).

In the Control group tongue's body, conical filiform papillae had conical CTCs with a single tip, and fungiform papillae were characterized by a protrusion with a papillary cavity for the taste bud, described as a barnacle-like morphology (Fig. 4e). The papillae in the lingual prominence had a shovel-like CTC, as the CTC of the body's filiform papillae mostly with a unique

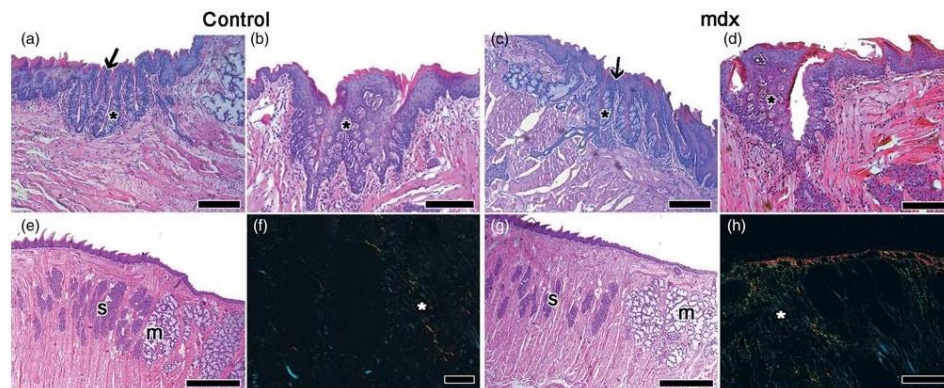


Fig. 3. Light micrography. Control group: (a) foliate papillae (arrow) and sidewalls taste buds (*). (b) Vallate papilla taste buds (*). In *mdx* group: (c) foliate papillae (arrow) and taste buds (*) on the sidewalls. (d) Vallate papilla taste buds (*). Control group: (e) caudal portion tongue mucous (m) and serous (s) glands. (f) The glands region was involved by collagen (white *) and musculature. In *mdx* group: (g) serous (s) and mucous (m) glands clusters. (h) The tongue caudal portion presents greenish collagen (white *) within the muscular tissue involving glands. Stain: HE (a–e,g) and PSR under polarized light (f,h). Scale bars: 50 μ m (f), 200 μ m (a–d), and 500 μ m (e,g,h).

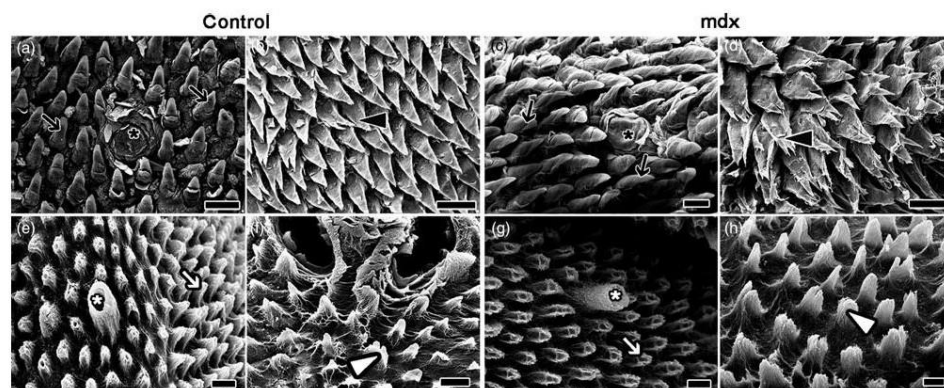


Fig. 4. Scanning electron micrograph. Epithelial surface: control group: (a) fungiform papilla (*) among conical filiform papillae (arrows). (b) Triangular-shape filiform papillae (arrowhead) from lingual prominence. In *mdx* group: (c) conical filiform papillae (arrows) around fungiform papilla (*). (d) In the lingual prominence triangular filiform papillae with several pointed processes (arrowhead). Connective tissue cores (CTCs): control group: (e) CTCs from the fungiform papilla with a gustative pore (white *) among CTCs from the conical filiform papillae (white arrow). (f) CTCs from the triangular filiform papillae (white arrowhead) of the lingual prominence. In *mdx* group: (g) the CTCs from the fungiform papilla with a gustative bud at the top (white *) were surrounded by conical filiform papillae CTCs (white arrow). (h) The CTCs from the triangular filiform papillae (white arrowhead) of the lingual prominence. Scale bars: 30 μ m (a,c,e–h) and 100 μ m (b,d).

tip, albeit some had double tip morphology (Fig. 4f). In the *mdx* group, the CTC papillae in the tongue's body were like control (Fig. 4g), and for those in lingual prominence, the shovel-like CTCs had one tip, but the presence of bifid and trifid tips was more common than in the Control group (Fig. 4h).

In the caudal region of the Control group, we found the foliate papillae bilaterally located on the lateral margin near the tongue root, which consisted of epithelial folds delimited by parallel grooves (Fig. 5a). Medially in the tongue's dorsal caudal region was a single vallate papilla with a dome-like morphology surrounded by a narrow sulcus (Fig. 5b). The *mdx* group also had

foliate papillae in both sides of the tongue's lateral region (Fig. 5c); caudally and medially the tongue dorsal region had one vallate papilla with a less concave aspect than the Control group and was surrounded by a sulcus (Fig. 5d).

In the Control group, foliate CTCs had irregular oval grooves delimited by laminar projections (Fig. 5e); vallate CTC was surrounded by an elliptical sulcus and characterized by the central projection with multiple taste bud cavities (Fig. 5f). In contrast, the *mdx* group had a similar aspect with foliate CTCs (Fig. 5g), and vallate CTC had the same morphology, also described as an alveolus shape or honeycomb-like (Fig. 5h).

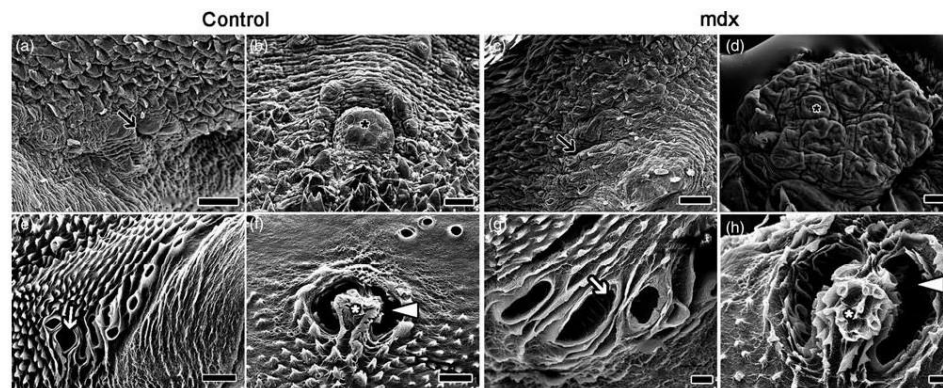


Fig. 5. Scanning electron micrograph. Epithelial surface: control group: (a) foliate papilla groove (arrow). (b) Vallate papilla (*). In *mdx* group: (c) foliate papilla groove (arrow). (d) Vallate papilla (*). Connective tissue cores (CTCs): control group: (e) The CTC of foliate papilla opening duct (white arrow). (f) Vallate papilla CTC (white *) surrounded by an elliptical sulcus (white arrowhead). In *mdx* group: (g) opening of the foliate papillae CTC (white arrow). (h) Elliptical sulcus (white arrowhead) and the CTC of the vallate papilla (white *). Scale bars: 30 μ m (d,g,h) and 100 μ m (a-c,e,f).

Transmission Electron Microscopy

The ultrastructure of both groups was characterized by the presence of epithelial layers: corneum, granulosum, spinosum, and basale, below which were observed the lamina propria and muscular tissue.

In the Control group the corneum stratum, the first epithelial layer was distinguished by overlapping epithelial cells and joined by numerous desmosomes. These cells showed a diffuse serrated pattern in the interface with adjacent cells. The granular layer had flattened cells with granules in the cytoplasm, countless tonofilaments, and cell adhesion through the desmosomes (Fig. 6a). In the spinous layer, the main character was the presence of flat cells; in the basal layer, keratinocytes with bulky oval nuclei and cytoplasm projections (Fig. 6b).

While the *mdx* group had similar stratification, the corneum stratum was seen to contain juxtaposed keratinocytes, several desmosomes, and a granular layer with cell's cytoplasm numerous granules internally (Fig. 6c). Furthermore, the spinous layer was composed of flat cells, and the basal layer was organized as columnar cells mediated with elliptic nuclei (Fig. 6d).

In the interface region between the lamina propria and the basal layer, a large area of connective tissue was observed, with numerous fibroblasts and blood capillaries. In the transition of lamina propria and musculature of the Control group, we found unmyelinated nerve fibers between muscle fibers, the sarcomeres disposition in series, and subsarcolemmal mitochondrial groupings (Fig. 6e). Also, sarcoplasmic invaginations (bundles collagen) were in evidence (Fig. 6f).

In the *mdx* group, we observed a connective tissue deposit large area. The muscle tissue revealed myocytolysis in mitochondrial conglomerates (Fig. 6g). We saw that, at the lamina propria and the connective tissue interface in the muscle cells, a great compromise with changes in the relationship between this region of junction, with reduction of collagen fiber bundles, beyond the sarcoplasmic invaginations presented a decrease in length (Fig. 6h).

Discussion

Our results showed the morphology of lingual papillae and the three-dimensional aspects of CTCs; also, we noted the structural and ultrastructural *mdx* mice tongue characteristics of the epithelium, lamina propria, and muscular tissue. We reported changes in the musculature and an indirect reflex in the papillae morphology.

The dorsolateral mice's tongue as described by Kobayashi et al. (1989) was anatomically characterized by apex, body, root, and lateral. The specialized mucosa had filiform papillae with mechanical functionality, and papillae with gustatory functions as fungiform, foliate, and vallate. The lamina propria was composed of collagen and had a three-dimensional aspect with morphological features, and deeper were present tongue musculature and glandular tissues.

The tongue had a keratinized stratified squamous epithelium and under transmission electron microscopy analysis the epithelial stratigraphy of both groups revealed the composition of four strata: corneum, granulosum, spinosum, and basale, and was ultrastructurally similar to those described for other rodents (Kitajima & Kobayashi, 1992; Cienca et al., 2013; Watanabe et al., 2013; Cienca et al., 2019). Between groups, *mdx* had a higher juxtaposition of flatter cells in the corneum stratum, which suggests an epithelial cell renewal due to greater wear. Furthermore, the other layers had similar characteristics. Under light microscopy and morphometric analysis, the epithelium of the *mdx* group was appointed with a greater thickness in the median region of the tongue body and in the lingual prominence, and this feature may indicate a reflex of muscular dystrophy in the tongue epithelium.

The lamina propria was mainly composed of collagen and had thin thickness throughout the tongue body. The PSR stain associated with the polarized light enables the characterization of collagen fibers coloration, and lamina propria of both groups had reddish and greenish collagen. This composition was similar to those present in other regions of the rodent's oral cavity as the palatine lamina propria (Tomiate et al., 2021a, 2021b).

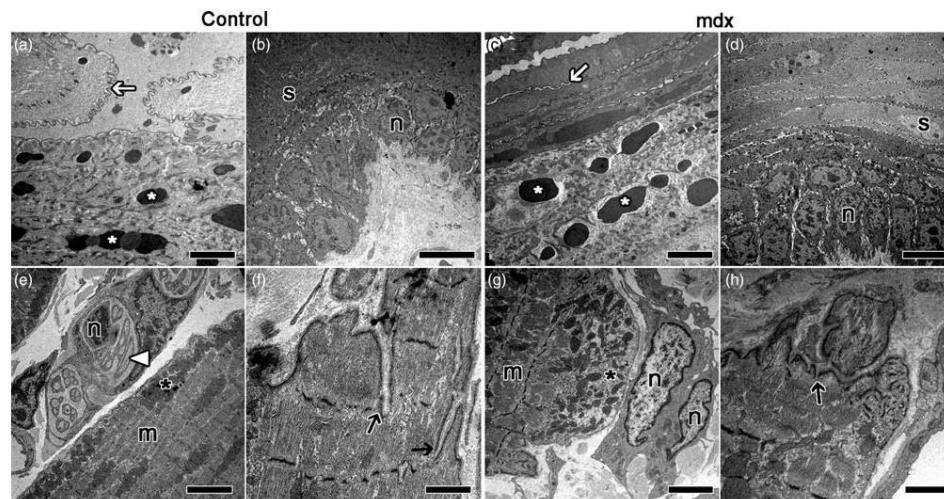


Fig. 6. Transmission electron micrograph of the tongue. Control group: (a) keratinized layer was composed of keratinocytes joined by desmosomes (white arrow), and granular (white *) in the granular layer. (b) spinous (s) layer associated with the basal layer evidenced by cuboid cells and its nucleus (n), and interfaced with lamina propria. In *mdx* group: (c) The keratinized layer, keratinocytes were connected by desmosomes (white arrow) and in the granular layer were evidenced granular (white *). (d) flat cells of the spinous (s) and nucleus (n) of a basal layer cell. Control group: (e) muscular tissue (m) and mitochondrial groupings (*) near associated with unmyelinated nerve fibers (white arrowhead) and schwann cell nucleus (n). (f) sarcoplasmic invaginations (arrows). In *mdx* group: (g) myocytolysis in the mitochondrial groupings (*) of the muscular tissue (m) near fibroblasts (n). (h) The sarcoplasmic invaginations (arrow). Scale bars: 2 μ m (a, c-h) and 5 μ m (b).

In the regions, apex and rostral and medial body of the tongue were located conical-shape filiform and fungiform papillae, and its superficial characteristics and CTCs were described by Kobayashi et al. (1989). The filiform papillae of this region were similar to those found in the *Sprague Dawley* rat (Reginato et al., 2014), and fungiform papillae had a mushroom-like morphology with a taste bud at the top. The conical filiform CTC had an also conical aspect and fungiform CTC had a cylindrical shape and on the top a cavity that allocates a taste bud, this papillary support was barnacle-like (Kobayashi et al., 1989) and morphologically similar to other rodents (Kitajima & Kobayashi, 1992; Reginato et al., 2014). Lingual papillae and its CTCs of the tongue's body of both groups were resemblant.

The lingual prominence located in the caudal region of the tongue body was such as described for mice (Kobayashi et al., 1989), and this characteristic is also present in other rodent species (Emura et al., 2011; Reginato et al., 2014; Ciena et al., 2019; de Aro et al., 2019; Igbokwe & Mbajorgu, 2019). In this region of the tongue's body, fungiform papillae were absent and our results showed filiform papillae with different morphology, triangular-shaped filiform, those were distributed throughout the prominence and other rodents had conical filiform papillae with similar distribution in this region (Reginato et al., 2014; de Aro et al., 2019). The CTC of triangular papillae had a shovel-like morphology similar to that described by Kobayashi & Iwasaki (1989) for mice. Between the Control and *mdx* groups, the presence of bifid and trifid tips were more common in the CTC papillae of the DMD murine model.

The muscular tissue under the tongue's body mucosa was different in the Control and *mdx* groups. In the DMD model, the

musculature had heterogeneous features, the degenerative process is characterized as different in distinct muscles with age influencing degeneration stages (Pastoret & Sebillé, 1995; Chamberlain et al., 2007). The main feature consists of a cyclic process of degeneration and regeneration of the musculature, and it was evidenced in our results by the myocytolysis; as a result of this chronic inflammation process, an increase of collagen deposition and tissue fibrosis formation occurs (Chamberlain et al., 2007; Martinez et al., 2021).

The musculature of the *mdx* group had inflammatory foci and when stained with PSR and analyzed by light microscopy under polarized light was revealed yellowish collagen deposition involving the musculature. Those characteristics were unlike those found by Spassov et al. (2010) in 100-day-old *mdx* mice, which have no significant changes. While, in 26-month-old *mdx* mice tongue, the effects of dystrophin absence are expressed with loss of muscle fibers and fibrosis due to the muscular necrosis and replacement by collagen (Chamberlain et al., 2007). The descriptions in the literature and our results denote that progressive muscle degeneration and collagen deposition affect the tongue at least after 6-month-old age.

The dorsolateral region of the tongue caudal portion had bilaterally located foliate papillae and medially, in the dorsal portion, a unique vallate papillae. Foliate papillae consist of epithelial grooves with taste buds on the sidewalls, as in red-rumped agouti (Ciena et al., 2013), and were morphologically similar to guinea pigs (Ciena et al., 2019). After epithelial exfoliation, the revealed CTC had several opening ducts, separated by laminar projections similar to those described by Kobayashi et al. (1989). The control and *mdx* morphologies were different in the number of opening ducts related to individual variations.

The medially located vallate papilla was dome-like and similar to the description, amount, and localization for mice (Kobayashi et al., 1989). The epithelial maceration revealed the presence of an elliptical sulcus which delimited the papillary support; and in light microscopy, taste buds were located on the sidewalls, as in red-rumped agouti (Ciena et al., 2013). The vallate CTC had an alveolus morphology due to the presence of multiple taste buds as in Kobayashi et al. (1989), denominated as beehive-like CTC.

In the caudal region of the tongue, the submucosa had glandular groupings of two types: serous and mucous glands. Both gland types were surrounded by collagen and associated with the musculature and also were connected to foliate and vallate papillae like the tongue of other rodents (Ciena et al., 2013; Ciena et al., 2019).

The relation between the tongue and the glandular area were different between groups, the Control group had a higher area of serous glands, while the *mdx* group had a larger area of mucous glands. Unlike the Control group, the *mdx* had a massive commitment of greenish collagen in the muscular tissue near the glands; this feature was also seen in the tongue of other pathologies that promote chronic inflammation such as Chagas disease (Bertoldo et al., 2019).

These features may indicate atrophy of serous glands in the DMD model and the hypertrophy of mucous glandular tissue may be caused by the higher collagen deposition in this area, providing a larger appearance to those glandular groupings characterizing a pseudohypertrophy, a very common feature in DMD (van den Engel-Hoek et al., 2013) and in its animal models (Porter et al., 2002; Chamberlain et al., 2007).

The tongue of the *mdx* group also had various similarities to the Control, indicating a non-uniformity of the degenerative process (Pastoret & Sebillé, 1995; Chamberlain et al., 2007). Therefore, our analysis showed the tongue of 6-month-old *mdx* mice with multiple muscle punctual changes, different degrees among anatomic regions such as myocytolysis, collagen deposition, and smaller sarcoplasmic invaginations. These characteristics were also present in different rates in other masticatory muscles, such as masseter and temporal in 100-day-old (Spasov et al., 2010), and 12-month-old *mdx* mice with a mild type of degeneration of the masseter (Muller et al., 2001).

Lingual papillae of the Control and *mdx* groups did not have significant morphological differences. Therefore, in most parts of the tongue, the morphology appears unchanged even in the face of the dystrophy degenerative process at 6-month-old age. Although in the tongue's rostral portion of the *mdx* group was found higher wear in the triangular filiform papillae, and stratum corneum had a higher cell juxtaposition, those may be related to the commitment of other muscles associated with chewing as described by Spasov et al. (2010) and consequently promoting a higher abrasion and wear of the triangular papillae.

Conclusions

In conclusion, the tongue mucosa and the musculature of the *mdx* mice showed alterations due to the dystrophic process. The epithelium was thicker and triangular-shaped papillae of lingual prominence had higher wear indicated an indirect effect of the degenerative process. Muscular degeneration and collagen deposition within the muscular fibers were in evidence. The glandular area had alterations, serous were smaller characterizing atrophy, and mucous was bigger which may indicate a pseudohypertrophy due to collagen deposition.

Acknowledgment. The authors acknowledge Beatriz Garcia Gonçalves for Figure 1.

Funding. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)—Finance Code 001 and by Grant #2013/12347-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Conflict of interest. The authors declare none.

References

- Allen DG, Whitehead NP & Froehner SC (2016). Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: Roles of Ca^{2+} , reactive oxygen Species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiol Rev* **96**(1), 253–305. doi:10.1152/physrev.00007.2015
- Aloysius A, Born P, Kinali M, Davis T, Pane M & Mercuri E (2008). Swallowing difficulties in duchenne muscular dystrophy: Indications for feeding assessment and outcome of videofluoroscopic swallow studies. *Eur J Paediatr Neurol* **12**(3), 239–245. doi:10.1016/j.ejpn.2007.08.009
- Barbosa GK, Jacob CS, Pimentel Neto J, de Oliveira MF, Rici REG, Watanabe I & Ciena AP (2020). Structural and ultrastructural characteristics of the tongue of the collared peccary (*Pecari tajacu*, Linnaeus, 1758). *Anat Histol Embryol* **49**(4), 532–540. doi:10.1111/ah.12557
- Bertoldo BB, Etchebehere RM, Furtado TCDS, Faria JBD, Silva CB, Araújo MFD, Rodrigues DBR & Pereira SADL (2019). Lingual salivary gland hypertrophy and decreased acinar density in chagasic patients without megaesophagus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **61**. doi:10.1590/S1678-9946201961067
- Bulfield G, Siller WG, Wight PAL & Moore KJ (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1189–1192. doi:10.1073/pnas.81.4.1189
- Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D & Faulkner JA (2007). Dystrophin-deficient *mdx* mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J* **21**, 2195–2204. doi:10.1096/fj.06-7353com
- Ciena AP, Bolina CDS, de Almeida SRY, Rici REG, de Oliveira MF, Silva MCPD, Miglino MA & Watanabe I (2013). Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). *J Anat* **223**(2), 152–158. doi:10.1111/joa.12065
- Ciena AP, dos Santos AC, Vasconcelos BG, Rici REG, Assis-Neto AC, Almeida SRY, Miglino MA & Watanabe I (2019). Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Acta Zool* **100**, 53–60. doi:10.1111/azo.12230
- Cros D, Harnden P, Pellissier JF & Serratrice G (1989). Muscle hypertrophy in duchenne muscular dystrophy. *J Neurol* **236**, 43–47. doi:10.1007/BF00314217
- de Aro MM, dos Santos AC, da Silveira EE, Lisboa Neto AFS, de Oliveira MF & de Assis Neto AC (2019). Morphological tools to evaluate the digestory apparatus in rocky cavy (*Kerodon rupestris*). *Microsc Res Tech* **82**, 696–708. doi:10.1002/jemt.23216
- Deconinck N & Dan B (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: Current hypotheses. *J Paediatr Neurol* **36**(1), 1–7. doi:10.1016/j.paediatrneurol.2006.09.016
- Emura S, Okumura T & Chen H (2011). Morphology of the lingual papillae in the patagonian cavy. *Okajimas Folia Anat Jpn* **88**(3), 121–125. doi:10.2535/ofaj.88.121
- Hoffman EP, Brown RH & Kunkel LM (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919–928. doi:10.1016/0092-8674(87)90579-4
- Igbokwe CO & Mbajiorgu FE (2019). Anatomical and scanning electron microscopic study of the tongue in the African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Anat Histol Embryol* **48**, 455–465. doi:10.1111/ah.12467
- Kitajima K & Kobayashi K (1992). Light and electron microscopic studies on the lingual papillae and their connective tissue cores in hamster. *Jpn J Oral Biol* **34**, 503–530. doi:10.2330/joralbiosci.1965.34.503

- Kobayashi K & Iwasaki S (1989). Comparative studies on the stereo architecture of the connective tissue papillae in some mammalian tongues. *Prog Clin Biol Res* **295**, 303–308.
- Kobayashi K, Miyata K, Takahashi K & Iwasaki S (1989). Three-dimensional architecture of the connective tissue papillae of the mouse tongue as viewed by scanning electron microscopy. *Kaibogaku Zasshi* **64**, 523–538.
- Martinez GZ, Grillo B, Rocha LC, Jacob C, Pimentel Neto J, Tomiate AN, Barbosa GK, Watanabe I & Ciena AP (2021). Morphological changes in the myotendinous junction of mdx mice. *Microsc Microanal* **27**(5), 1290–1294. doi:10.1017/S1431927621012496
- Muller J, Vayssiere N, Royuela M, Leger ME, Muller A, Bacou F, Pons F, Hugon G & Mornet D (2001). Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old mdx mice. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 133–139. doi:10.1023/a:1010305801236
- Pane M, Vasta I, Messina S, Sorleti D, Aloisius A, Sciarra F, Mangiola F, Kinali M, Ricci E & Mercuri E (2006). Feeding problems and weight gain in duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol* **10**, 231–236. doi:10.1016/j.ejpn.2006.08.008
- Pastoret C & Sebillé A (1995). Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve* **18**(10), 1147–1154. doi:10.1002/mus.880181011
- Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, Leahy P, Li J, Guo W & Andrade FH (2002). A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet* **11**(3), 263–272. doi:10.1093/hmg/11.3.263
- Reginato GDS, Bolina CDS, Watanabe I & Ciena AP (2014). Three-dimensional aspects of the lingual papillae and their connective tissue cores in the tongue of rats: A scanning electron microscope study. *Sci World J* **2014**. doi:10.1155/2014/841879
- Spasov A, Gredes T, Gedrange T, Lucke S, Palvolic D & Kunert-Keil C (2010). Histological changes in masticatory muscles of mdx mice. *Arch Oral Biol* **55**, 318–324. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.02.005
- Tomiate A, Barbosa G, Rocha L, de Almeida S, de Oliveira M, Watanabe I & Ciena A (2021b). Structural and ultrastructural characteristics of the Red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*—Linnaeus, 1758) palatine epithelium. *Microsc Microanal* **27**(3), 645–649. doi:10.1017/S1431927621000350
- Tomiate AN, Barbosa GK, Rocha LC, Vasconcelos BG, de Almeida SRY, Miglino MA, Watanabe I & Ciena AP (2021a). Structural and ultrastructural characterization of the palatine epithelium of the Guinea pig: a new record of telocytes in the oral cavity. *Microsc Res Tech* **84**, 1621–1627. doi:10.1002/jemt.23722
- Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PCG, Martins PCM, Lopes VF, Zilbertajn D, Maia LS, Sell K & Yamamoto LU (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci* **34**, 241–248. doi:10.1007/s12031-007-9023-9
- van den Engel-Hoek L, de Groot IJM, Sie LT, van Bruggen HW, de Groot SAF, Erasmus CE & van Alfen N (2016). Dystrophic changes in masticatory muscles related chewing problems and malocclusions in duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **26**, 354–360. doi:10.1016/j.nmd.2016.03.008
- van den Engel-Hoek L, Erasmus CE, Hendriks JCM, Geurts ACH, Klein WM, Pillen S, Sie LT, Swart BJM & de Groot IJM (2013). Oral muscles are progressively affected in duchenne muscular dystrophy: Implication for dysphagia treatment. *J Neurol* **260**, 1295–1303. doi:10.1007/s00415-012-6793-y
- Watanabe I, Haemmerle CAS, Dias FJ, Cury DP, da Silva MCP, Sosthines MCK, dos Santos TC, Guimarães JP & Miglino MA (2013). Structural characterization of the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) tongue by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech* **76**, 141–155. doi:10.1002/jemt.22145