

# Distribución de mastocitos del estroma de la glándula mamaria de perra (*Canis familiaris*), en periodos activo e inactivo\*

Héctor Villaseñor Gaona\*\*

Rosa Emilia Laville\*\*

Santiago R. Anzaldúa Arce\*\*

Mario Pérez Martínez\*\*,\*\*\*

## Abstract

Morphologic characteristics of stroma and parenchima depend of the functional level in the mammary gland. Mast cells (MC) are dynamic elements present in connective tissues, which can induce degranulation of biologically active mediators which the interaction with other connective cells. The objective of this study was to find out the number and pattern of distribution and possible differences in mast cell population present in the mammary gland (MG) of bitches under two physiologic conditions: active or inactive. Forty adult bitches from the Antirrabic Health Center were sacrificed and sampled. Fragments from abdominal, cranial and caudal mammary gland were collected, processed and included in paraffin wax, cut in thin 6  $\mu\text{m}$  sections and stained with hematoxilin-eosine and toluidine blue. The total number of MC was counted in 16 selected fields at random to estimate the  $\text{mm}^2$  population from both interalveolar and interlobulillar stroma. Statistical analysis showed significant differences ( $P<0.05$ ) between the interalveolar (R1) and interlobulillar regions (R2) from inactive MG. Differences were found in MC and between inactive MG and R1 and R2 from active MG. During the active period the number of MC were significantly decreased in relation to that one during the inactive period; this suggests that MC play a relevant role in proliferative changes and growth from interalveolar connective cells of the inactive MG. In this period, the connective tissue includes all the space from the glandular epithelium present in the active period.

**KEY WORDS:** MAMMARY GLAND, MAST CELLS, BITCH.

## Resumen

Los mastocitos (MC) son células del tejido conjuntivo que participan activamente en los mecanismos de comunicación paracrína mediante la liberación de diversos mediadores químicos contenidos en sus gránulos. El presente estudio se efectuó con el propósito de evaluar la distribución de los MC en la glándula mamaria de la perra (*Canis familiaris*), en periodos activo e inactivo. Las muestras de tejido mamario se obtuvieron a partir de perras adultas. Dichas muestras se procesaron siguiendo el método de inclusión en parafina y los cortes histológicos obtenidos fueron teñidos con azul de toluidina para posteriormente efectuar la cuantificación de MC por  $\text{mm}^2$ , considerando para este fin el estroma interalveolar y el estroma interlobulillar del tejido mamario. Durante el periodo activo de la glándula mamaria, la población de MC presentes en el estroma disminuye significativamente respecto del periodo inactivo ( $P<0.05$ ). Estos resultados en conjunto sugieren que los MC presentes en el estroma de la glándula mamaria de perra, participan activamente en los cambios proliferativos que experimenta el tejido conjuntivo laxo areolar, dependiendo del estadio funcional de la glándula.

**PALABRAS CLAVE:** GLANDULA MAMARIA, MASTOCITOS, PERRA.

---

Recibido el 6 de abril de 1999 y aceptado el 18 de julio de 1999.

\*Parte de este trabajo corresponde a la tesis de licenciatura del primer autor.

\*\*Departamento de Morfología, Sección de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\*\*Correspondencia a: M. Pérez-Martínez. Laboratorio de Biomorfología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F. e-mail: perezm@cuauhtli.veterin.unam.mx

## Introducción

La perra presenta cinco pares de mamas, que en sentido craneal a caudal se denominan: a) Torácico craneal y torácico caudal; b) abdominal craneal y abdominal caudal; c) inguinales.<sup>1</sup>

Histológicamente la glándula mamaria (GM) se clasifica como una glándula exocrina tubuloalveolar compuesta, cuya unidad secretora se compone de un alveolo y un ducto. Los grupos de unidades secretoras forman lobulillos que están separados por septos de tejido conjuntivo. El conjunto de lobulillos forman un lóbulo glandular.<sup>2,3,4,5</sup>

El tejido intersticial de la GM proporciona sostén para las unidades secretoras y en él se encuentran vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. En cada unidad secretora existe una capa de tejido conjuntivo laxo con fibras colágenas y elásticas, en donde se encuentran plasmocitos, linfocitos y mastocitos.<sup>6,7</sup>

El desarrollo morfofuncional de la GM comprende los períodos de mamogénesis, lactogénesis y de lactancia. En la modulación de cada una de estas etapas participan de manera integrativa diversos mecanismos neuroendocrinos.<sup>8,9,10,11</sup>

Los mastocitos (MC) son células del tejido conjuntivo que presentan en su citoplasma gránulos basófilos envueltos por membrana y que resultan metacromáticos cuando se tiñen con anilinas básicas.<sup>12</sup> Estas células responden a estímulos de diferente naturaleza, secretando diversas moléculas biológicamente activas que participan en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos.<sup>13-23</sup> Entre los mediadores químicos que están contenidos en los gránulos de los MC se citan la histamina, serotonina (5-HT), los leucotrienos B4 que actúan como factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos,<sup>23,24</sup> activadores de cininas, heparina, condroitín sulfatos, triptasas, proteasas, prostaglandinas, ácido hidroxílico eicosádrico y factor activador de plaquetas.<sup>25,26,27</sup>

Diversos informes sugieren que la degranulación de los MC puede estar relacionada con la formación de fibras de colágeno *in vivo*.<sup>28</sup> También se ha informado que los fibroblastos son una fuente importante de tropocolágeno y son necesarios para la maduración de los gránulos de los MC.<sup>28</sup>

En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se ha observado que los MC tienen capacidad para interactuar con diversos tipos celulares,<sup>29</sup> incluyendo a células endoteliales, epiteliales, linfocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, células nerviosas e incluso células cancerosas. Dicha interacción se da por medio de la liberación de sus mediadores químicos a través de procesos degranulativos y no degranulativos.<sup>30-34</sup> Asimismo, existen evidencias que indican que los MC sintetizan citocinas multifuncionales que participan en procesos biológicos, asociados con la activación de estas células.<sup>35</sup>

Hasta el momento no se han efectuado estudios en la perra (*Canis familiaris*) que permitan conocer la dinámica

de distribución de los MC en la glándula mamaria, bajo diferentes estadios fisiológicos. El disponer de esta información contribuirá a comprender mejor la manera en que dichas células interactúan con otros elementos celulares del tejido conjuntivo, involucrados en la actividad funcional de la GM. El objetivo del presente estudio fue evaluar las características de distribución de los MC en la glándula mamaria de la perra (*Canis familiaris*), en períodos activo e inactivo.

## Material y Métodos

Las muestras de GM se obtuvieron a partir de 40 perras adultas de 2 a 4 años de edad que a la revisión clínica no presentaban evidencia de procesos inflamatorios agudos. Los animales empleados en este estudio se encontraban con glándulas mamarias en períodos activo (n = 20) e inactivo (n = 20), que fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia en el Centro Antirrábico Luis Pasteur, de la ciudad de México, dependiente de la Secretaría de Salud.

Inmediatamente después de ser sacrificados los animales, se obtuvieron fragmentos de 2 cm<sup>3</sup> de la base de la mama de los pares: abdominal craneal y caudal, posteriormente se fijaron en formol salino durante cinco días, después se procesaron en un históquinete automático, se incluyeron en bloques de parafina y se efectuaron cortes de 6 mm de grosor. Para observar la organización histológica general de la GM y determinar su estado de actividad o inactividad se tiñeron 3 cortes / animal con hematoxilina-eosina y 6 cortes semiseriados fueron teñidos con azul de toluidina para efectuar el conteo de los MC en tejido mamario de animales en períodos activo e inactivo. Aunque los MC pueden identificarse utilizando tinciones con diversas anilinas básicas, el azul de toluidina es el que ha permitido su mejor identificación y cuantificación de acuerdo a un trabajo previo.<sup>21</sup> Para este fin se contaron los MC presentes en 16 campos tomados al azar para conocer su población por mm<sup>2</sup> mediante el uso de un ocular con retícula micrométrica y el objetivo de 40X.<sup>13,36,37</sup>

Cuadro 1		
CONTEO DE MASTOCITOS (MC) POR mm <sup>2</sup> EN DIVERSAS PORCIONES DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN ESTADOS ACTIVO E INACTIVO		
	R1 X ± DE	R2 X ± DE
ACTIVO	56.65 ± 19.69	69.55 ± 19.68
INACTIVO	426.45 ± 101.28*	116.4 ± 41.64

R1: Estroma interalveolar  
R2: Estroma interlobulillar  
Se encontró diferencia estadística significativa\* (P<0.05) entre el número de células de los períodos activo e inactivo y entre R1 y R2 del período inactivo.

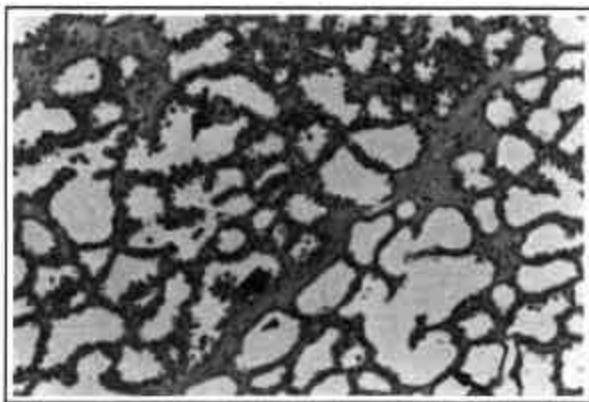


Figura 1. Glándula mamaria de perra en periodo activo. Alveolos en producción (flecha delgada), estroma interlobulillar (flecha ancha), H.E, 400X.

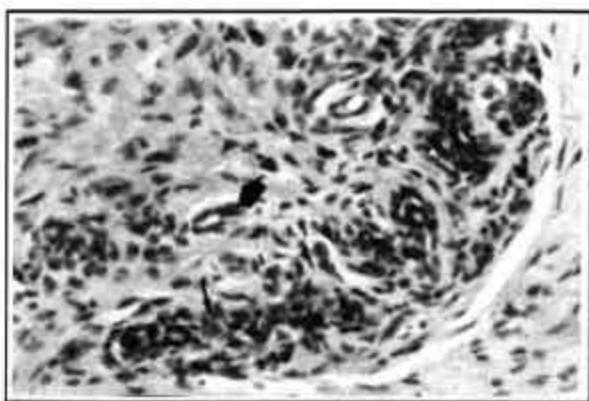


Figura 2. Glándula mamaria de perra en periodo inactivo, alveolos contraídos (flecha delgada), proliferación del tejido conjuntivo (flecha ancha), H.E, 400X.

Con éste propósito se consideró el estroma interalveolar (R1) y el estroma interlobulillar (R2).

Los resultados obtenidos del conteo celular se sometieron a un análisis de ANOVA con el fin de determinar la posible existencia de diferencias entre los períodos estudiados. Posteriormente se efectuó un análisis de comparaciones múltiples de Newmann-Keuls.<sup>38</sup>

## Resultados

La GM de los animales en periodo activo se caracterizaron por la presencia de alveolos y presencia de estroma interalveolar pequeño (Figura 1), mientras que la GM en periodo inactivo presentó alveolos contraídos y gran cantidad de tejido conjuntivo (Figura 2).

Los resultados obtenidos del conteo celular ( $X \pm D.E$ ) se presentan en el Cuadro 1. Se encontró diferencia estadística significativa entre la región estromal interalveolar (R1) y la región interlobulillar (R2) de la glándula mamaria en periodo inactivo, así como entre la R1 en periodo inactivo respecto de la R1 y R2 en periodo activo ( $P < 0.05$ ) (Figuras 3 y 4).

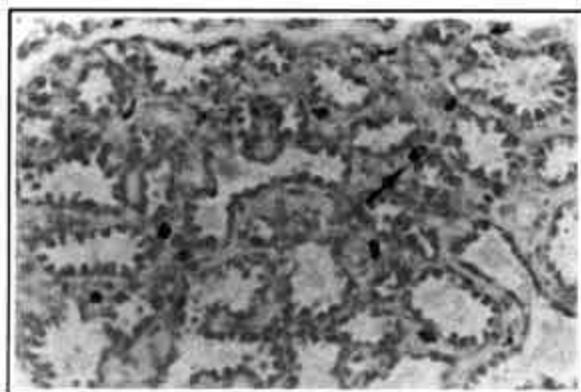


Figura 3. Glándula mamaria de perra en periodo activo, se muestran MC en el estroma interalveolar (flecha delgada). Azul de toluidina, 400X.

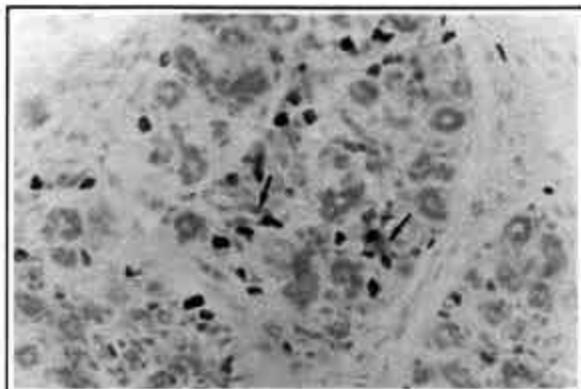


Figura 4. Glándula mamaria de perra en periodo inactivo, se observa gran número de mastocitos en el estroma interalveolar (flecha delgada). Azul de toluidina, 400X.

## Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la población de MC por  $mm^2$  del estroma interalveolar, así como del estroma interlobulillar de la GM, es notoriamente mayor durante el periodo inactivo respecto del periodo activo, ello podría explicarse debido a que el proceso de transición morfológica de la GM que ocurre del periodo de lactancia al de inactividad secretora, ocurre un colapso gradual de los alveolos que dejan de secretar hasta que se vacían, al mismo tiempo el tejido conjuntivo perialveolar prolifera intensamente hasta llegar a cubrir el espacio que ocupa el tejido glandular.

Los resultados anteriores concuerdan con lo informado por otros autores,<sup>7</sup> quienes demostraron que los productos de los MC estimulan la producción de la colagenasa tipo I en cultivos de fibroblastos.

Los MC interactúan de manera estrecha con diversas estructuras del tejido conjuntivo, ya que favorecen la angiogénesis, regulan el flujo sanguíneo<sup>39</sup> local en diversos órganos y establecen contactos directos con las fibras nerviosas,<sup>22,28</sup> además del gran número de interacciones celulares paracrinas que pueden establecer

estas células con diversas poblaciones celulares del tejido conjuntivo. Como un ejemplo de lo anterior se encuentra el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) citocina producida in vitro por MC peritoneales de ratón (una subpoblación específica de MC), esta citocina es capaz de generar entre otros efectos angiogénesis, fibrosis tisular, formación de granulomas e inflamación,<sup>40</sup> todos ellos procesos de remodelación y cambios tisulares del tejido conjuntivo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los MC destacan en la dinámica que presenta el tejido conjuntivo laxo areolar durante el periodo inactivo de la GM, donde el tejido conjuntivo interalveolar prolifera notoriamente hasta llegar a cubrir el espacio que ocupaba el tejido glandular.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a las autoridades del Centro Antirrábico Luis Pasteur, de la Secretaría de Salud, por las facilidades otorgadas para la obtención del material biológico; asimismo, se agradece al técnico Francisco López López el apoyo brindado en el procesamiento histológico.

## Referencias

1. Frandson DR. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. México (DF): Interamericana-McGraw-Hill, 1988.
2. Dukes HH, Swenson MJ. Fisiología de los animales domésticos. Madrid, España: Aguilar, 1977.
3. Dellman HD, Brown ME. Histología veterinaria. Zaragoza, España: Acribia, 1980.
4. Banks JW. Histología veterinaria aplicada. México (DF): Manual Moderno, 1986.
5. World Association of Veterinary Anatomists. Nómica anatómica e histológica. 4a ed. Zurich, Switzerland: International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 1992.
6. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. Bovine mononuclear leucocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci* 1992;75:998-1006.
7. Harveit F. Mast cell association with collagen fibres in human breast stroma. *Eur J Morphol* 1993;31:209-218.
8. Austin CR, Short RV. Hormonas en la reproducción. México (DF): Manual Moderno, 1980.
9. Aceves VC, Valverde RC. Lactación, homeorresis y hormonas tiroideas. *Vet Méx* 1987;18:215-228.
10. Guyton AC. Tratado de fisiología médica. México (DF): Interamericana-McGraw-Hill, 1988.
11. Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine immune axis. *Immunopathology* 1993;14:221-238.
12. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Ann Rev Immunol* 1989;7:59-76.
13. Jones RE, Duvall D, Guillette LJ. Rat ovarian mast cells: distribution and cyclic changes. *Anat Rec* 1980;197:489-493.
14. Brandon JM, Evans JE. Observations on uterine mast cells during early pregnancy in the vole, *Microtus agrestis*. *Anat Rec* 1984;208:515-520.
15. Newlands GF, Huntley JF, Miller HR. Concomitant detection of mucosal mast cells and eosinophils in the intestines of normal and *Nippostrongylus*-immuno rats. *Histochemistry* 1984;81:585-589.
16. Woodbury RG, Miller HR, Huntley JF, Newlands GF, Pallisert AC, Wakelin D. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature* 1984;312:450-452.
17. Anzaldúa AS. La biología de la célula cebada. Estudio recapitulativo (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.UNAM, 1985.
18. Ashraf M, Urban JF, Lee TD, Lee CM. Characterization of isolated porcine intestinal mucosal mast cells following infection with *Ascaris suum*. *Vet Parasitol* 1988;29:143-158.
19. Parshad RK, Kathpalia K. Distribution and characteristics of mast cells in the rat ovary during the oestrus cycle, lactation and pregnancy. *Folia Morphol (Praha)* 1990;38:327-330.
20. Gaytan F, Aceiteiro J, Bellido C, Sánchez-Criado JE, Aguilar E. Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol Reprod* 1991;45:27-33.
21. Lavielle RE, De Buen N, Candanosa E, Pérez MM, Martínez MJ. Conteo de mastocitos en glándula mamaria canina con diferentes tipos de neoplasias. *Acta Médica* 1994;30:117-118.
22. McKay DM, Bienenstock J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today* 1994;15:533-538.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2a ed. México (DF): Interamericana-McGraw-Hill, 1995.
24. Castella MA. Cytokines produced by polymorphonuclear neutrophils: molecular and biological aspects. New York: Landes Company, 1996.
25. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 1981;289:646-650.
26. Heyworth MF, Jones AL. Immunology of the gastrointestinal tract and liver. New York: Raven Press, 1988.
27. Huntley JF. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol* 1992;107:349-372.
28. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *New Eng J Med* 1993;328:257-265.
29. Greenberg G, Burnstock G. A novel cell to cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res* 1983;147:1-13.

30. García DD. Distribución y variación del número de mastocitos en la glándula mamaria en regresión en la rata (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1983.
31. Becker AB, Fan Chung K, McDonald D, Lazarus S, Frick OL, Gola WM. Mast cells meterogeity in dog. *Skin Anat Rec* 1985;213:477-480.
32. Lee CS, Mensn EL, Brandon MR. Subpopulations of lymphocytes in the mammary gland of sheep. *Immunology* 1989;66:388-393.
33. Crow J, Wilkins M, Howes M, Helliwel P. Mast cells in the female genital tract. *Int J Gynecol Pathol* 1991;10:230-237.
34. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol* 1991;3:865-873.
35. Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ, Askenase PW. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in Guinea pig. *J Immunol* 1982;129:790-796.
36. Du Bois JA, Wordinger RJ, Dickey JF. Mast cells and lymphocyte variations in bovine oviduct. *J Anim Sci* 1976;42:1578.37. Lozano CB, Tolosa SJ. Cuantificación de células cebadas y de los eosinófilos en la mucosa del cuello uterino del ganado Cebú en diferentes etapas reproductivas. *Vet Méx* 1989;20:393-395.
38. Scheffler WC. Bioestadística. México (DF) Fondo Educativo Interamericano, 1981.
39. García-Pascual A, Labadía A, Triguero D, Costa G. Local regulation of oviductal blood flow. *Gen Pharmacol* 1996;27:1303-1310.
40. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. *Nature* 1990;346:274-276.