

Trabajos Originales:

**DISTRIBUCIÓN DE LOS MASTOCITOS EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES DE RATA**

**Recibido para arbitraje: 16/04/2008**

**Aceptado para publicación: 06/11/2008**

- **Zavala Walther** -Doctor en medicina, docente Cátedra Histología. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina
- **David, Foscolo Mabel** Profesional principal CONICET Cavicchia J.C. - Profesor Titular Cátedra Histología. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Cuyo.

**RESUMEN**

Los mastocitos son células del tejido conectivo ampliamente distribuidas en la mucosa digestiva y respiratoria, especialmente cerca de sitios de respuesta inmune. El presente estudio se efectuó con el propósito de evaluar la distribución de los mastocitos en las glándulas salivales mayores (parótida, submaxilar y sublingual) de rata. Las muestras de tejido glandular fueron incluidas en parafina y los cortes histológicos obtenidos se colorearon con Azul alcian-safranina y Azul de Toluidina. Posteriormente se efectuó la cuantificación de mastocitos/mm<sup>2</sup> considerando dos áreas glandulares: el estroma intralobulillar y el interlobulillar. Los resultados no muestran variaciones significativas en la población de mastocitos al comparar las tres glándulas ( $p > 0,05$ ), pero si se encontró una mayor presencia de mastocitos en relación con la vía excretora principal. Los resultados en conjunto sugieren una activa participación de los mastocitos en los mecanismos de detección de antígenos que ingresan a las glándulas salivales y su estrecha relación con otras células captadoras de antígenos como las células dendríticas.

**Palabra claves:** glándulas salivales- mastocitos-inmunidad.

**Abstract**

Mast cells (MT) are connective tissue cells widely distributed throughout the body, especially in immune mucosal response sites like the digestive and air way tract. The aim of the present study was to find the number and the pattern of distribution and possible differences in mast cell population present in the mayor salivary glands (parotid, submandibular and sublingual glands) of rats. Fragments from salivary glands were collected, processed and included in paraffin wax, cut and stained with alcian blue-safranin and toluidine blue. The total number of MT was counted to estimate the mm<sup>2</sup> population from both intralobulillar and interlobulillar stroma tissues. Statistical analysis showed not significant differences ( $p > 0.05$ ) between the three analysed glands. Numerous mast cells were located around salivary secretory ducts, in close association. The results suggest that MT play a relevant role in salivary antigen detection and that there is a close cooperation with other antigen professional presenting cells like dendritic cells.

**INTRODUCCION**

Los mastocitos son células del tejido conectivo derivadas de una célula pluripotencial CD34+, localizada en la medula ósea (1). Se distribuyen con preferencia en la dermis cutánea y en varias mucosas como la digestiva, urinaria y respiratoria, aunque su cantidad y densidad son mayores en la interfase entre los ambientes externos e internos donde pueden responder a antígenos extraños (2). Presentan en su citoplasma gránulos basófilos envueltos por membrana y que resultan metacromáticos cuando se tiñen con anilinas básicas, lo que permite su identificación en cortes histológicos (3).

Los mastocitos pueden ser activados por mecanismos inmunológicos o no inmunológicos, liberando una gran cantidad de mediadores incluyendo citoquinas, aminas vasoactivas y enzimas. La cantidad de mastocitos es mayor en sitios de inflamación aguda y crónica como se describen en los casos de psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, parasitosis y reacciones de hipersensibilidad alérgica como urticaria y asma (4,5,6,7).

Se ha demostrado que algunos mediadores liberados por los mastocitos, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa, aumenta la movilización de neutrófilos ante la aparición de determinadas bacterias y, además, la migración de linfocitos intraepiteliales (8). Por otro lado, Artuc et al., 1999; describe el papel de los mastocitos en la reparación de heridas, ampliando el papel funcional de los mastocitos (9).

En la cavidad bucal varias investigaciones mencionan un incremento en el número de mastocitos en los casos de enfermedad periodontal, así como también se destaca la participación de mastocitos en los casos de liquen plano bucal (10,11).

Existen trabajos previos que indican la presencia de mastocitos en glándulas salivales en diferentes mamíferos (12,13, 14). La mayoría de los mastocitos de la cavidad bucal expresan las proteasas, triptasa y quimasa, mientras que una subpoblación menor son quimasa negativos(15). Evidencias recientes sugieren la participación de la triptasa, contenida en los gránulos mastocitarios, en la fibrosis que acontece en sialoadenitis crónica de las glándulas submaxilares (16). Los mastocitos han sido implicados también en varios desordenes inflamatorios inmunes que afectan las glándulas salivales, como el síndrome de Sjögren (17).

Aunque hay numerosos reportes sobre la participación de los mastocitos en diferentes patologías de la cavidad bucal, la información sobre la participación de los mastocitos glandulares en condiciones de normalidad, es escasa.

Hasta el momento no existen datos que permitan comparar la distribución de estas células en una glándula de secreción puramente serosa, como la parótida, en relación con otras glándulas de secreción mixta de predominio seroso, como la submaxilar, o de predominio mucoso, como las glándulas sublinguales.

El objetivo principal de este trabajo es describir la distribución de los mastocitos en el estroma de las glándula salivales parótida, submaxilar y sublingual en forma comparativa. El disponer de esta información contribuirá a comprender mejor el papel de estas células dentro del sistema inmune de cavidad bucal.

#### **MATERIALES Y MÉTODO:**

Se utilizaron quince ratas Wistar de dos meses de edad pertenecientes a ambos sexos. Los animales fueron sacrificados después de ser colocados bajo campana con vapores de éter, *respetando protocolos de cuidado y uso de animales de laboratorio* (18). Se disecaron y extrajeron treinta glándulas parótidas y quince submaxilares y seis sublinguales. Las glándulas extraídas fueron seccionadas en pequeños trozos y colocadas en fijador. Cada uno de los trozos fue inmerso en solución de paraformaldehído al 4 %, preparado una hora antes de su utilización. Los especímenes se mantuvieron en fijador durante 12 horas. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes e incluidos en parafina. El tejido incluido en bloque de parafina se cortó con micrótopo es secciones de 5 micras de espesor.

Para observar la organización histológica general de las glándulas salivales se tiñeron dos cortes por cada glándula con Hematoxilina-eosina. Esta es una técnica de tinción habitual de muestras histológicas pero no diferencia los mastocitos en forma específica, por lo cual se utilizó para identificar los componentes glandulares y como control negativo

Otros seis cortes semiseriados provenientes de cada una de las glándulas fueron coloreados con las técnicas que se detallan a continuación:

- a. Azul Alcian-safranina. Coloración utilizada según la técnica descrita por Bancroft y Stevens (1982) (19).
- b. Azul de toluidina es una anilina básica ya utilizada para identificar y contabilizar mastocitos en tejidos glandulares por lo que se utilizó como control positivo (3).

Las muestras se observaron con un microscopio Zeiss Axiostar plus, se fotografiaron con una cámara digital Canon. Para analizar la distribución celular, las imágenes se digitalizaron utilizando el programa Image Pro plus. Para conocer la población de mastocitos por mm<sup>2</sup> se tomaron ocho zonas al azar en cada uno de los cortes. Se contaron y promediaron los mastocitos por mm<sup>2</sup>, considerando dos sectores topográficos: a) estroma interlobulillar y, b) estroma intralobulillar.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  error estándar. Las comparaciones entre las diferentes medias se llevaron a cabo mediante la prueba de ANOVA y para el la comparación entre los dos sectores analizados se utilizó el test de Student con un nivel de significación de 0,05%

### RESULTADOS

Las técnicas histológicas empleadas permitieron identificar los mastocitos por la presencia de sus gránulos metacromáticos característicos, los cuales reaccionaron adecuadamente con los colorantes empleados (figura 1).

Los mastocitos aparecen localizados, con especial preferencia en el tejido conectivo interlobulillar donde su número fue significativamente alto en relación al estroma intralobulillar ( $P < 0.001$ ), tanto en la glándula parótida como en la submaxilar y sublingual (tabla 1). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre el número de mastocitos por mm<sup>2</sup> al comparar las glándulas salivales entre sí, tanto a nivel del estroma interlobulillar como en el intralobulillar (tabla 1).

Aunque la mayoría de los mastocitos no mostró un patrón particular de distribución, muchos de ellos se dispusieron formando pequeños grupos no solo en relación de proximidad con los vasos sanguíneos (figura 2a) sino que también pudimos observar numerosos mastocitos en las proximidades de las vías excretoras de mayor calibre como se observa en la figura 2b. Solo un escaso porcentaje de mastocitos sufrió pérdida de los gránulos citoplasmáticos (degranulación), con los métodos empleados. Llamó la atención la adaptación de la forma celular que observamos en algunos sectores glandulares; a pesar de que la mayoría de los mastocitos de los espacios interlobulillares presentaron forma redondeada o ligeramente ovalada (figura 2b), las células localizadas en periferia de cada lobulillo adoptaron un aspecto más alargado con su eje mayor paralelo al lobulillo y, aunque las células están muy separadas entre sí, asemejan una pseudo-empalizada (FIGURA 3a y 3b).

**Tabla 1**  
**Mastocitos/mm<sup>2</sup> presentes en el estroma de glándulas salivales mayores de rata.**

	Parotida		Submaxilar		Sublingual	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
<b>Promedio</b>	31,47	2,40	28,50	2,00	29,50	2,76
<b>S.E.M</b>	2,61	0,32	3,64	0,39	1,83	0,31

- (a) estroma interlobulillar  
(b) estroma intralobulillar

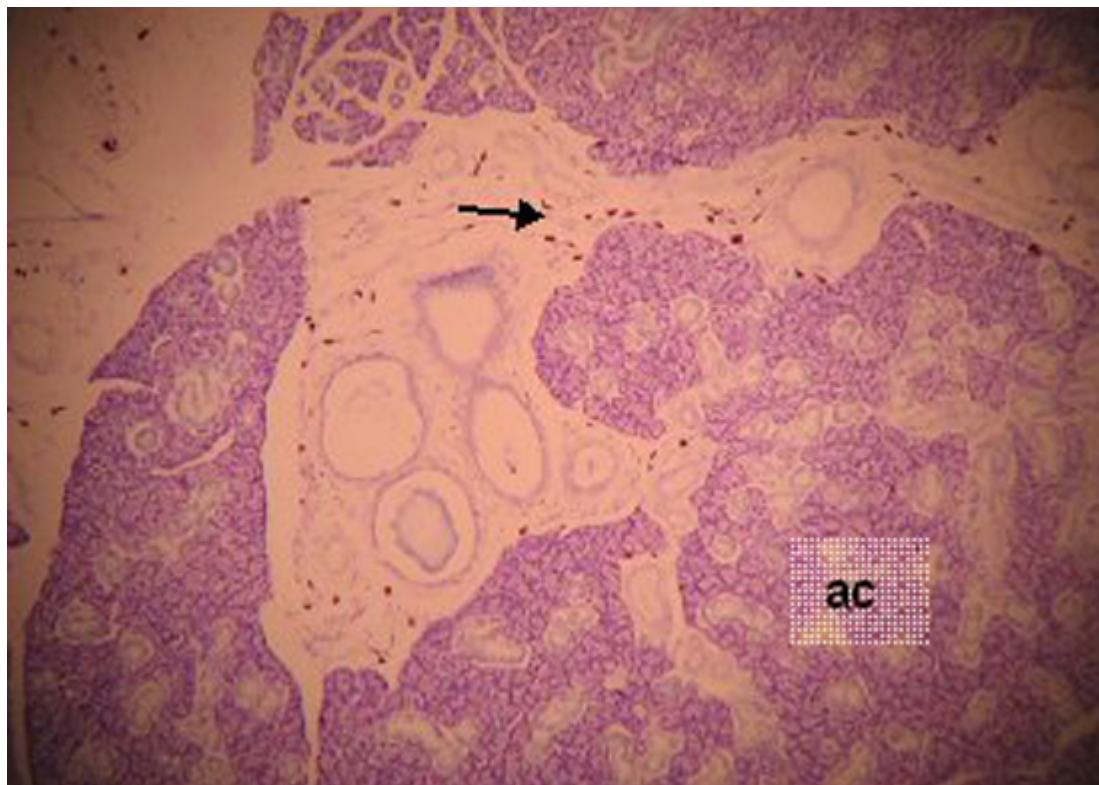


Figura 1

Glándula parótida, corte representativo mostrando la mayor concentración de mastocitos en el estroma interlobulillar (flecha). Acinos glandulares (ac). Azul alcian-safranina. Barra= 200  $\mu$ m, X200.

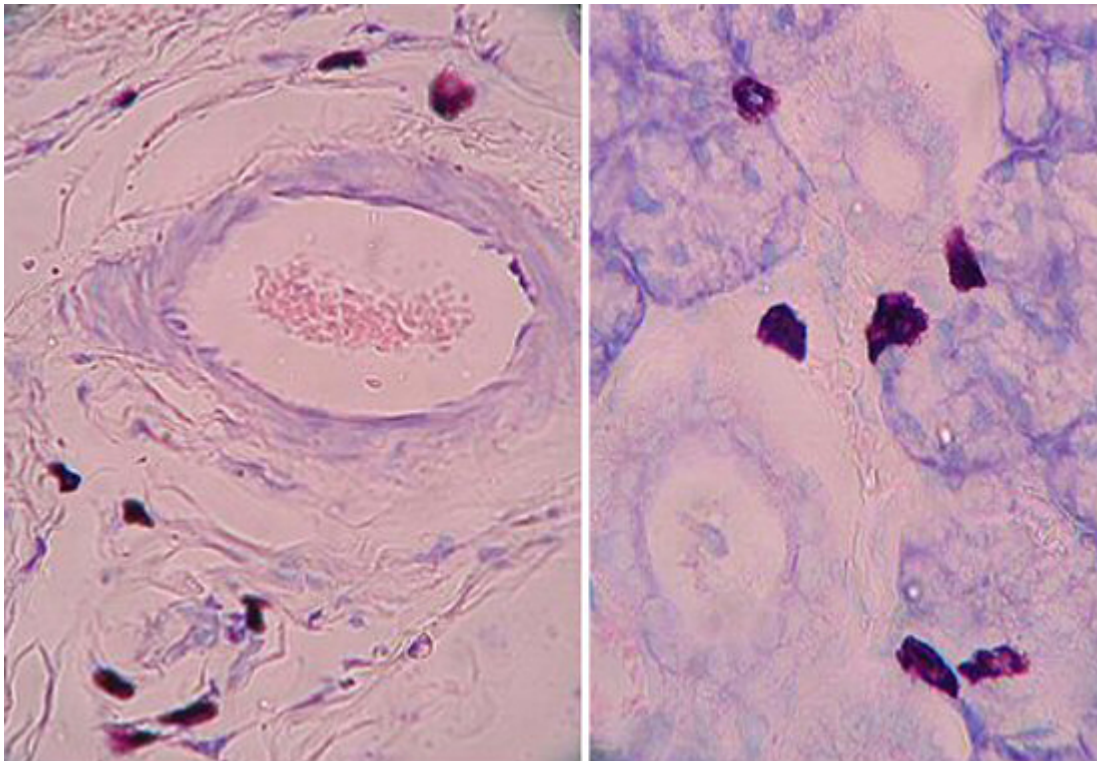


Figura 2a

Mastocitos (flechas) alrededor de un vaso sanguíneo (vs); mientras que en 2b los mastocitos se agrupan en las proximidades de la vía excretora (ve), \* acino seroso. Azul alcian-safranina. Barra=40  $\mu$ m, X400.

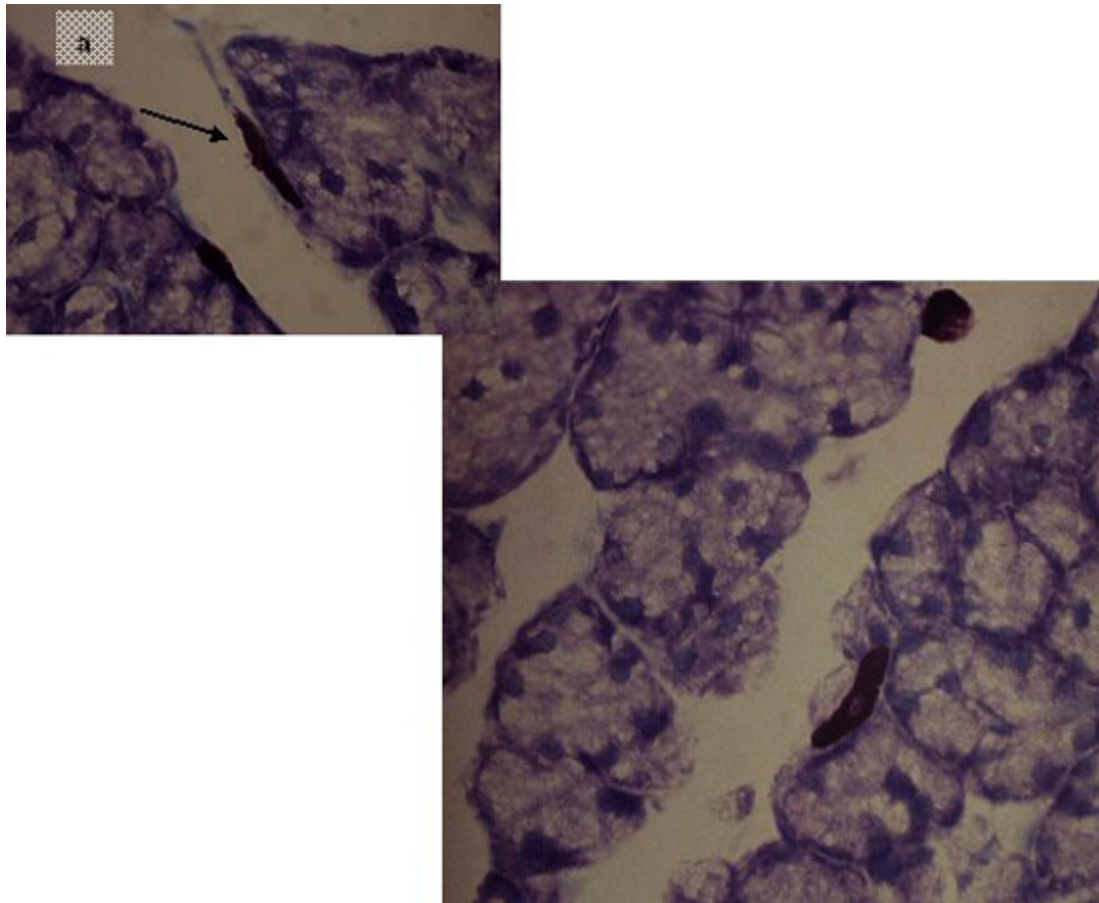


Figura 3a

Glándula submaxilar. Se observan algunos mastocitos ordenados linealmente formando una pseudoempalizada (flecha); en 3b con más detalles el aspecto alargado de los mastocitos intralobulillares. Azul de Toluidina. Barra=20  $\mu$ m, X600;

## DISCUSION

La presencia de mastocitos en las glándulas salivales es conocida, pero su función dentro de la cavidad bucal es aun discutida (20,21).

Walsh, (2003) menciona que la distribución de mastocitos en compartimentos titulares se relaciona con el potencial de los mediadores mastocitarios en influenciar células próximas, resultado esto en efectos estimulatorios, inhibitorios o tóxicos (22).

Nuestros hallazgos indican que los mastocitos además de reunirse cerca de los vasos sanguíneos también lo hacen en las proximidades de la vía excretora principal de las glándulas salivales. Estudios previos mencionan al factor de crecimiento mastocitario (MGF, del inglés mast cell growth factor) como un mediador clave que actúa influenciando la migración y asentamiento de los mastocitos. Este mediador puede ser sintetizado tanto por células endoteliales como por keratinocitos (23), lo que sustenta nuestras observaciones.

Los mastocitos expresan las moléculas MHC I y II, por lo que pueden interactuar con otras células del sistema inmune ya que poseen la capacidad para procesar antígenos virales y bacterianos (24). Son considerados células presentadoras de antígenos no profesionales, y por su localización perivascular

comparten una ubicación estratégica con células presentadoras de antígenos profesionales como células dendríticas (25). En concordancia con esto hemos descrito previamente la presencia de células dendríticas en relación de proximidad con las vías excretoras principales de glándulas salivales mayores y, especialmente, la localización dentro del epitelio ductal de la célula de Langerhans, este último dato también reportado por Stasulis et al., (2003). (26, 27)

Recientemente se describió la interacción célula Langerhans-mastocitos (28, 29) y al mismo tiempo Heib et al., (2007) ha demostrado el papel crucial de los mastocitos activados promoviendo, vía factor de necrosis tumoral alfa e interleuquina-1, la migración de las células de Langerhans intraepiteliales (30).

En conjunto los reportes mencionados señalan la posibilidad, por parte de los mastocitos, de iniciar una activación de la respuesta inmune específica al poseer la capacidad de capturar y procesar antígenos o indirectamente por su interacción con otras células del sistema inmune.

Algunas patologías infecciosas e inflamatorias afectan con preferencia las glándulas salivales pudiendo los microorganismos alcanzar la glándula por vía sanguínea o en forma ascendente a través de la vía excretora (31). En otras patologías inflamatorias como la parotiditis recurrente en niños y jóvenes la causa permanece aun incierta postulándose entre sus posibles causas los mecanismos inmunes (32) Es posible suponer, en base a nuestros hallazgos, que la distribución de los mastocitos en relación con la vía excretora principal les brinda mayor chance de interactuar con los antígenos que ingresan a la cavidad bucal en forma directa o indirectamente por su estrecha relación con las células dendríticas pudiendo estar involucrados en la repetición de procesos inflamatorios crónicos como los mencionados.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos especialmente la excelente asistencia técnica de Juana Dora Dávila. Este estudio fue realizado con el aporte financiero y científico de la Secretaria de Ciencia, Técnica y Postgrado, y Facultad Odontología de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina (proyecto n° 06/PK05).

#### **Análisis de varianza:**

- Prueba ANOVA, análisis de probabilidad entre las tres glándulas (a)-(a) y (b)-(b): N.S. ( $P > 0.05$ )
- Prueba-t comparación intragrupo(a)-(b) para cada glándula \*\*\* ( $P < 0.001$ )

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD, (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146:1410.
2. Clifton O. Bingham III, K. Frank Austen (1999). Biology of mast cell. In: Freedberg Im, Eisen, AZ Wolff, K Austen, KF Goldsmith, LA Katz, SI Fitzpatrick, TB eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*.
3. Cook H C, (1982). *Manual of Histological Demonstration Techniques* Bancroft JD & Stevens A, Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd ed, p 200.
4. Jiang WY, Chattedee AD, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Farber EM, (2001). Mast cell density and IL-8 expression in non lesional and lesional psoriatic skin. *Int J Dermatol*. Nov;40(11):699-703.
5. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M,

- Gebel M, Manns MP, (1996). Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 28: 1.
6. Reuter S, Taube C (2008). Mast cells and the development of allergic airway disease. *J Occup Med Toxicol*. Feb 27; 3 Suppl 1: S2.
  7. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC, (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. Dec; 7(12): 975-87.
  8. Waldorf HA, Walsh LJ, Schechter NM, Murphy GF (1991). Early cellular events during evolving cutaneous delayed hypersensitivity in humans. *Am J Pathol* 138: 477-486.
  9. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grützkau A, Henz BM (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders?. *Exp Dermatol*. Feb; 8(1): 1-16.
  10. Batista AC, Rodini CO, Lara VS (2005). Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis*. Jul; 11(4): 249-54.
  11. Zhao ZZ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ, (2002). Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. Apr; 31(4): 189-95.
  12. Selye, H, (1965). *The Mast Cells*. Washington: Butterworths.
  13. Garrett, JR, A Kidd, K Kyriakou, and RE. Smith, (1984). New observations on the localization of kallikrein-like activity in human salivary parenchymal and mast cells by enzyme histochemistry. *Histochem. J.* 16, 789-791.
  14. Fonseca MM, Ferraris ME, Rins de David ML, Gendelman H, (1987). Mast cell population in the salivary glands of rats treated with DMBA and castration. *Rev Fac Odontol Univ Nac (Cordoba)*. Jan-Dec; 15(1-2): 39-48.
  15. Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW (1995). Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. Jul; 24(6): 266-72.
  16. Epivatianos A, Zaraboukas T, Pouloupoulos A, Harrison JD (2008). Immunohistochemical study of fibroblasts and mast cells in chronic submandibular sialadenitis. *Oral Dis*. Apr; 14(3): 259-63.
  17. Konttinen YT, Hietanen J, Virtanen I, Ma J, Sorsa T, Xu JW, Williams NP, Manthorpe R, Janin A (2000). Mast cell derangement in salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int*; 19(4): 141-7.
  18. Tim Allen, MS, (1999). Information Resources for Institutional Animal Care and Use Committees. AWIC Resource Series No. 7. <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/IACUC/iacuc.htm>
  19. Bancroft JD & Stevens A, (1982) *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, 4th Ed.
  20. Konttinen YT, Tuominen S, Segerberg-Konttinen M, Jungell P, Malmström MJ, Grönblad M, Guven O, Santavirta S, Panula P, (1990). Mast cells in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome: a histochemical, immunohistochemical and electron microscopical study.



Ann. Rheum. Dis. 49, 685-689.

21. Henriksson R, Fröjd O, Gustafsson H, Johansson S, Yi-Qing C, Franzén L, Bjermer L. (1994). Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar cells in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. *Br. J. Cancer* 69, 320-326.
22. Walsh LJ, (2003). Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.*; 14(3):188-98.
23. Kligman LH, Murphy GF (1996). Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol* 63:123-127
24. Malaviya R, Twesten NJ, Ross EA, Abraham SN, Pfeifer JD (1996). Mast cells process bacterial antigens through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J Immunol* 156:1490-1496.
25. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor- $\alpha$  which induces endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4220-4224.
26. Zavala WD, Foscolo M, Cavicchia JC (2008). Distribución de células dendríticas en glándulas salivales de rata. *Rev. Facultad Odontología Universidad Nacional de Cuyo*, vol 2 N°4
27. Stasulis CA, Hand AR (2003). Immunohistochemical identification of antigen presenting cells in rat salivary glands. *Arch Oral Biol.* Oct;48(10):691-9.
28. Ali A, Rautemaa R, Hietanen J, Beklen A, Konttinen Y, (2007). A possible CD1a Langerhans cell-mast cell interaction in chronic hyperplastic candidosis. *J Oral Pathol Med.* Jul;36(6):329-36.
29. Kambayashi T, Baranski JD, Baker RG, Zou T, Allenspach EJ, Shoag JE, Jones PL, Koretzky GA, (2008). Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation. *Blood.* Feb 1;111(3):1489-96.
30. Heib V, Becker M., (2007). Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood.* Aug 1;110(3):946-53.
31. Hviid A, Rubin S, Mühlemann K, (2008). Mumps. *Lancet.* Mar 15;371(9616):932-44.
32. CM Leerdam, HCO Martin, D Isaacs (2005). Recurrent parotitis of childhood *Journal of Paediatrics and Child Health* 41 (12), 631-634