

Posible contribución de la histamina en la fisiopatología de la fibrosis hepática: modulación de la actividad proteolítica

Rafael Jurado-León¹, Lourdes Rodríguez-Fragoso², Jorge A Reyes-Esparza²

¹División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología
Ave. San Fernando No. 22, Col. Tlalpan, México

²Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)
Ave. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México
Email: mlrodrig1@yahoo.com.mx

RESUMEN

La finalidad de este estudio fue determinar si la histamina regula la producción, la actividad y la secreción del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y colagenasa IV en las células hepáticas WRL-68, y con esto inferir mecanismos moleculares que expliquen la función de la histamina en la fibrogénesis hepática. Los resultados muestran que la histamina induce la actividad de ambas proteasas. Se observó que en las células WRL-68 se incrementó la actividad de uPA (2 veces) con todas las concentraciones de histamina, mientras que la actividad de la colagenasa IV solo se elevó con 75 μM de histamina ($p < 0.05$). La actividad de las proteasas no se incrementó en el medio condicionado. En contraste, los niveles de las proteínas colagenasa IV y uPA fueron marcadamente incrementados tanto en las células como en el medio condicionado. Estos resultados indican que la histamina induce la producción de proteasas funcionalmente activas en las células hepáticas WRL-68. Además, induce la secreción de las proteasas al medio condicionado, pero esas proteínas no son activas. Esto sugiere que la histamina media sus efectos por el receptor H1, debido a que solamente la pirilamina fue capaz de abrogar el efecto anteriormente referido. Son necesarios estudios posteriores para comprender la función de la histamina en la fibrogénesis.

Palabras clave: uPA, colagenasa IV, proteasas, fibrosis

Biotecnología Aplicada 2005;22:215-220

ABSTRACT

Possible contribution of histamine in the pathophysiology of hepatic fibrosis: modulation of proteolytic activity. The aim of this study was to determine whether histamine modulates the production, activity and secretion of urokinase type plasminogen activator and collagenase IV in hepatic cell line WRL-68. Our results show that histamine induces the activity of both proteases. The activity of uPA was duplicated with all concentrations of histamine, whereas the collagenase IV was increased only with 75 μM histamine in hepatic cell line WRL-68 ($p < 0.05$). The activity of proteases was not increased in conditioned media. In contrast, the levels of collagenase IV and uPA proteins were markedly increased in both cells and conditioned media. The present results indicate that histamine might induce the production of proteases functionally active in WRL-68 cells. Histamine is able to induce the secretion of the proteases to conditioned medium, but these proteins are not active. Our results suggest that histamine might mediate its effects on liver cells through the H1 receptor pathway, because only pyrrolamine prevented the effect of histamine. Further studies are necessary to understand the role of histamine in fibrogenesis.

Key words: uPA, collagenase IV, proteases, fibrosis

Introducción

La fibrosis hepática es el resultado de un desequilibrio entre la síntesis, la degradación y el depósito de proteínas de la matriz extracelular. Los cambios en la composición de la matriz extracelular son similares en todas las formas de daño hepático crónico, lo que sugiere que el mecanismo general de la fibrosis es el mismo si el paciente tiene fibrosis alcohólica, viral o biliar [1-3]. En las células, la fibrogénesis se inicia por un daño a los hepatocitos, que origina el reclutamiento de células inflamatorias, plaquetas, la activación de las células de Kupffer y de las células estrelladas, con la subsiguiente liberación de citoquinas y factores de crecimiento [4, 5]. De todas las células del hígado, las células estrelladas hepáticas desempeñan una función central, debido a que se activan luego del daño al hígado. La activación de la célula estrellada es una respuesta caracterizada por distintos cambios morfológicos y funcionales relacionados con la proliferación, la contractilidad, la fibrogénesis, la secreción de citoquinas y la degradación de la matriz extracelular. La

célula estrellada es el blanco primario del estímulo inflamatorio y, como consecuencia, sufre el proceso de activación durante la fibrogénesis [6, 7]. Los factores que controlan esta activación son complejos y multifactoriales; sin embargo, las citoquinas y los factores de crecimiento son importantes mediadores que parecen ser responsables de la activación de la célula estrellada tanto *in vitro* como *in vivo* [8-10].

La histamina es un mediador químico ubicuo en tejidos y líquidos corporales, que puede funcionar como un factor de crecimiento [11]. La interesante observación de que la síntesis de la histamina puede ser inducida en tejidos que sufren una rápida proliferación o reparación, sugiere que esta amina tiene otras funciones adicionales a las ya reportadas [12]. Hasta el momento se han encontrado 4 subtipos de receptores para la histamina en humanos (H1, H2, H3, H4). Estos pertenecen a la familia de receptores acoplados a las proteínas G [13-15]. Previamente se ha señalado que los receptores para histamina se

1. Friedman SI. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Eng J Med* 1993;328:1828-35.
2. Lindros KO. Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. *J Hepatol* 1995; 23:7-15.
3. Kovalszky I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, Schaff Z. Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998;228:51-5.
4. Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol* 2001;15:187-93.
5. Rosenbaum J, Blazejewski S. Regulation of Ito cells proliferation by soluble factors. *J Hepatol* 1995;22:65-70.
6. Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19(4):397-410.

expresan en múltiples tipos de células normales y tumorales, con el hallazgo adicional de que ellos pueden activarse por múltiples vías de señalización y, por tanto, pueden desencadenar diversas funciones biológicas [16, 17].

La fibrosis hepática representa una compleja reacción fisiopatológica en la cual participan todas las células residentes del hígado, mediante varios mecanismos de transferencia de señales autocrinas, paracrinas y yuxtacrinas [18-22]. Esta afección se origina no solamente como una consecuencia de los cambios en la secreción de la matriz sino de cambios en su degradación, lo cual significa que en la enfermedad hepática crónica hay una pérdida del equilibrio funcional dinámico entre la fibrogénesis y la fibrólisis. A pesar de que está reportado que la histamina no es causa de fibrosis [23], un grupo de evidencias, incluyendo las de este trabajo, muestran la participación de la histamina en la fisiología de las células hepáticas y en la producción de factores causales del daño agudo y crónico del hígado [24-26]. Por ello, no se descarta la posible contribución de la histamina en la fisiopatología de la fibrosis hepática.

El activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA, por sus siglas en inglés) es una proteasa que encabeza una cascada proteolítica implicada en la remodelación de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas [27, 28]. El activador de plasminógeno tipo urocinasa desempeña una función importante en la fisiopatología de la enfermedad hepática crónica. Varios modelos *in vitro* han mostrado la presencia y actividad del activador de plasminógeno y de colagenasas en células estrelladas y hepatocitos, durante el desarrollo de la fibrosis hepática [29-31]. Puesto que hay reportes que señalan un incremento en los niveles de histamina hepática y sérica en el daño hepático agudo y crónico, no se debe descartar la posibilidad de una interacción histamina-proteasa en la fisiopatología de la enfermedad hepática. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue determinar si la histamina regula la producción, la actividad y la secreción del activador de plasminógeno tipo urocinasa y la colagenasa tipo IV en las células hepáticas WRL-68.

Material y métodos

Línea celular y condiciones de cultivo

Las células WRL-68 son una línea celular de tejido hepático normal humano (ATCC, CL-48). Para el estudio, estas células se sembraron y mantuvieron en cultivo con medio mínimo esencial (Gibco BRL), 4 µM de glutamina, 1% de aminoácidos esenciales (Gibco BRL), 10% de suero fetal de bovino y 100 µg/mL de ampicilina. Se cultivaron 10⁶ células en un frasco de cultivo de 75 cm² y se mantuvieron a 37 °C durante 24 horas, bajo una atmósfera de 5% CO₂ y humedad. Los subcultivos se realizaron con solución de tripsina-EDTA (N,N,-di-ethylthiocarbamic acid sodium).

Tratamientos farmacológicos

Para el tratamiento con histamina, se sembraron 4 x 10⁶ células en placas de cultivo de 100 mm, a una confluencia del 50%. Después de 24 horas, se desechó el medio, las células se lavaron dos veces con PBS, e incubaron con los diferentes tratamientos en un medio mínimo esencial con 10 µg/mL de transferrina,

L-glutamina, aminoácidos no esenciales y antibióticos. Se incluyeron los siguientes grupos de tratamiento: a) Control (sin tratamiento); b) Histamina (10, 50, 75 y 100 µM); c) Pirlamina (1 µM); d) Cimetidina (1 mM); e) Histamina (75 µM) + Pirlamina (1 µM), y f) Histamina (75 µM) + Cimetidina (1 mM). Los grupos pirlamina y cimetidina (H₁ y H₂ antagonistas, respectivamente) se incluyeron para identificar el tipo de receptor involucrado. Se eligió la concentración de pirlamina (1 µM) y cimetidina (1 µM) para tener comparación con estudios previos. Después de 24 horas, las células y el medio condicionado se colectaron y congelaron a -20 °C, hasta su uso.

Análisis de la actividad proteolítica

Se realizó un análisis zimográfico en geles de poliacrilamina-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), para cuantificar la actividad de la uPA y de la colagenasa tipo IV, como fue descrito previamente por Miskin y Soreq [31]. Las muestras del medio y las células de los extractos celulares (20 µg de proteína) se sometieron a una electroforesis a través de geles de poliacrilamina-dodecilsulfato de sodio que contenían plasminógeno o gelatina, como sustratos para uPA y colagenasa IV, respectivamente. Después de la separación electroforética, se lavaron los geles con 2.5% de triton X-100 para remover el dodecilsulfato de sodio. Posteriormente se incubaron por 3 horas a 37 °C para permitir que se desarrollara la proteólisis, y después se tiñeron con azul de Coomassie (R-250; BioRad). La actividad de la uPA y de la colagenasa IV se visualizó como bandas claras; en ella se degradó el plasminógeno y la gelatina. La comparación con patrones de peso molecular permitió corroborar que las bandas claras aparecen a la altura o talla esperada para las proteínas. No se detectaron bandas en los geles controles corridos en ausencia de plasminógeno y gelatina. Para el análisis semicuantitativo, se digitalizaron las imágenes y, posteriormente, se analizaron las bandas mediante densitometría. Las diferencias entre las bandas se cuantificaron por medio de un analizador de imágenes (Quantity One, BioRad).

Inmunoensayos

La evaluación de la cantidad total de proteína colagenasa IV y de uPA se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos con el ejemplo de anticuerpos monoclonales contra uPA y colagenasa IV (ELISA-direct enzyme-linked immunosorbent assay) [32]. Estos anticuerpos se obtuvieron mediante esquemas de inmunización en conejos (Nueva Zelanda). La cuantificación se llevó a cabo tanto en los extractos celulares como en los medios de cultivo condicionados de cada uno de los tratamientos. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos para inmunoensayos por el método de competencia directa para detectar antígenos solubles. Se incubaron 0.2 µg de antígeno diluidos en un amortiguador de carbonatos durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con albúmina sérica bovina diluida en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Para el ensayo se utilizaron 100 µg de proteínas totales de cada una de las muestras que se debían estudiar, y se mezclaron con los sueros anticolagenasa IV y anti-uPA. Junto con cada ensayo se

7. Rodríguez-Fragoso L, Álvarez R, Reyes-Esparza JA, Garcés ME: Acetaldehyde increases the activity and gene expression of urokinase type plasminogen activator in a hepatic stellate cell line. *Toxicology* 2000;137:1-11.

8. Suzuki C, Kayano K, Uchida K, Sakaida I, Okita K: Characteristics of the cell proliferation profile of activated rat hepatic stellate cells *in vitro* in contrast to their fibrogenesis activity. *J Gastroenterol* 2001;36:322-9.

9. Tsukamoto H: Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:911-6.

10. Pérez-Liz G, Flores J, Reyes-Esparza J A, Rodríguez-Fragoso L: Modulation of urokinase type plasminogen activator by TGF b1 in hepatic stellate cells activated. *Pharmacology* 2005;73:23-30.

11. Kahlson G, Rosengren E: New Approaches to the physiology of histamine. *Physiol Rev* 1968;48:155-96.

12. Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martin GA, Bergoc RM: Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol* 2000;10:15-23.

13. Hough LB: Genomics meets histamine receptors: a new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol* 2001;59(3):420-6.

14. Poli E, Poxxoli C, Coruzzi G: Role of histamine H(3) receptors in the control of gastrointestinal motility. An overview. *J Physiol Paris* 2001;95(1):67-74.

15. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rausler L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF: Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001; 59(3):427-33.

16. Bartholeyns J, Bouclier M: Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res* 1984;44: 639-45.

17. Panula P, Lintunen M, Karlstedt K: Histamine in brain development and tumors. *Semin Cancer Biol* 2000;10:11-4.

18. Eng FJ, Friedman SL: Fibrogenesis. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol* 2000; 279:G7-11.

19. Arthur MJ: Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology* 1997;26:1069-71.

20. Gressner AM: Mediators of hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 1996;43:92-103.

21. Tsukamoto H: Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcoholism Clin Exp Res* 1999;23:911-6.

22. Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-50.

23. Okasaki T, Hirota S, Xu ZD, Maeyama K, Nakama A, Kawano S, Hori M, Kitamura Y: Increase of mast cells in the liver and lung may be associated with but not a cause of fibrosis: demonstration using mas cells-deficient Ws/Ws rats. *Lab Invest* 1998;78(11):1431-8.

preparó una curva estándar de competición, mediante diluciones seriadas de antígeno en solución bloqueadora, más su respectivo anticuerpo (suero), previamente mezclados e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta se utilizó como curva patrón. Una vez preparadas las muestras y la curva patrón, se procedió a colocar alícuotas en la placa con el antígeno fijado anteriormente y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se agregó el sustrato cromógeno y, después de 10 minutos, se detuvo la reacción por la adición de HCl 6 N. La densidad óptica se midió en un lector de placas (Dynatech Micro ELISA Reader) a una longitud de onda de 492 nm.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como el promedio ± EEM de los valores obtenidos en 5 experimentos conducidos por duplicado. El análisis estadístico se hizo mediante la prueba de Fisher, y los valores de p<0.05 se consideraron significativos.

Resultados

Actividad de la colagenasa IV en las células WRL-68 hepáticas y los medios condicionados

La actividad proteolítica mediada por colagenasa IV se detectó al demostrarse la presencia de bandas de degradación de 72 kDa en los zimogramas (Figura 1a). Los resultados mostraron la presencia de la actividad proteolítica mediada por colagenasa IV solamente en las células que recibieron histamina a una concentración de 75 µM (2.5 veces del control), p<0.05 (Figura 2). Se incluyeron grupos de pirilamina y de cimetidina (antagonistas H1 y H2, respectivamente) para identificar el receptor de histamina involucrado, como se indicó en la sección de los materiales y métodos. La actividad proteolítica de la colagenasa se inhibió en el 100% de las células que se trataron simultáneamente con histamina (75 µM) y pirilamida (1 µM), p<0.05; es decir, la pirilamina inhibió completamente el efecto de la histamina. En cambio, las células que se trataron con histamina y cimetidina no mostraron cambios en la actividad proteolítica.

Por otro lado, en los medios condiciones se encontró un patrón de actividad proteolítica de colagenasa similar a los extractos celulares, es decir, hubo un incremento importante en la actividad con histamina

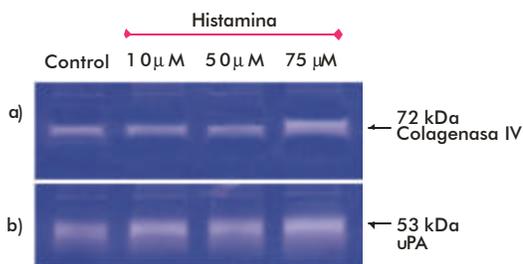


Figura 1. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de colagenasa IV y uPA en células WRL-68. La actividad proteolítica mediada por colagenasa IV y uPA se demostró por la presencia de bandas claras en los ensayos zimográficos de extractos celulares (20 mg de proteína). (a) Actividad de colagenasa IV sobre geles de gelatina, PM de 72 kDa. (b) Actividad de uPA sobre geles con plasminógeno, PM de 53 kDa.

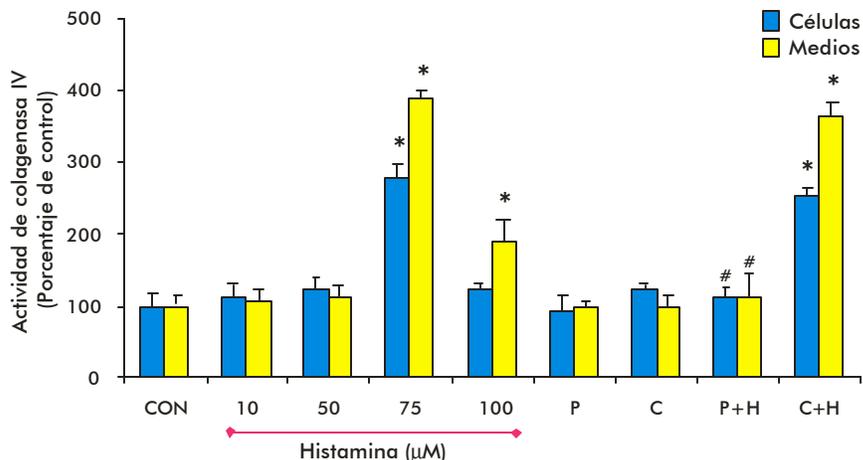


Figura 2. Efecto de la histamina sobre la actividad de la colagenasa IV. Las células se trataron con diferentes concentraciones de histamina durante 24 h; 1 µM de pirilamina (P) o 1 µM de cimetidina (C), antagonistas H1 y H2 respectivamente, se adicionaron simultáneamente con 75 µM de histamina (H) y solos. Muestras de 20 mg de proteína se sometieron a una electroforesis y se analizaron por zimografía. La densidad de las bandas correspondientes se determinó por un programa para imágenes, y los resultados fueron expresados como porcentaje del control. Las barras con diferente símbolo son significativamente diferentes comparadas con el grupo control (*p<0.05) o con 75 µM de histamina (# p<0.05).

75 µM (4 veces del control) y en mucho menor extensión, con histamina 100 µM, p<0.05 (Figura 2). En relación con el efecto de los antagonistas, la actividad proteolítica de los medios condicionados provenientes de las células tratadas con pirilamina 1 µM más histamina 75 µM, (p<0.05), pero no con cimetidina se inhibió 100%.

Actividad de uPA en las células hepáticas WRL-68 y los medios condicionados

La actividad proteolítica mediada por uPA se detectó en todos los grupos de células, al demostrarse la presencia de bandas en los zimogramas. La proteólisis dependió del plasminógeno al someter la misma muestra sobre geles sin plasminógeno. La presencia de una banda de actividad a 53 kDa relacionada con uPA coincidió con los reportes previos en la literatura [22]. Estos resultados mostraron la presencia de actividad proteolítica mediada por uPA en células tratadas con todas las concentraciones de histamina. La expresión mostró ser mayor que aquella de la actividad de colagenasa (Figura 1b). El incremento fue de más del 100% de los niveles encontrados en las células control, p<0.05 (Figura 3). La pirilamina bloqueó completamente (100%) el efecto de la histamina sobre la actividad de la uPA, p<0.05, mientras que la cimetidina (1 µM) no produjo ningún efecto. Tanto la pirilamina como la cimetidina tienden a incrementar, por sí mismas, la actividad de la uPA en las células, pero este incremento no fue estadísticamente significativo.

En contraste con los resultados en los extractos celulares, en los medios condicionados se observó que solamente hubo incremento de la actividad de la uPA (1.2 veces), con la concentración de 75 µM de histamina, p<0.05 (Figura 3). En relación con el efecto de los antagonistas, hubo una reducción del 100% de la actividad proteolítica en los medios condicionados de las células tratadas con pirilamina 1 µM e histamina 75 µM, p<0.05.

24. Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. Is histamine involved in ethanol-induced inflammation Agents Actions 1998;23: 321-3.

25. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Shibata H, Kiso Y, Tanaka T, Yao XS. Influence of histamine in a liver injury model induced by propionibacterium acnes and lipopolysaccharide. Biol Pharm Bull 2003;26(10):1393-7.

26. Umezu K, Yuasa S, Sudoh A. Change of hepatic histamine content during hepatic fibrosis. Biochem Pharmacol 1998; 1:2007-11.

27. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. Thromb Haemost 2005;93(4): 657-54.

28. Montuori N, Carriero MV, Salzano S, Rossi G, Ragno P. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. J Biol Chem 2002;277(49): 46932-9.

29. Wang XB, Liu P, Tang ZP, Lu X, Liu CH, Hu YY *et al.* [The role of changes of MMP-2, 9 activity in the development of liver fibrosis in rats]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2004;12(5):267-70.

30. Knittel T, Fellmar P, Ramadori G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. Gastroenterology 1996; 111:745-54.

31. Miskin R, Soreq H. Sensitive autoradiographic quantitation of electrophoretically separated proteases. Anal Biochem 1981;118:252-8.

32. Coligan JE. Current Protocols in Immunology. Publicado por John Wiley & Sons, Inc; Vol. 1. p. 2.1.2-2.1.20.

Inmunoensayos de colagenasa IV en células hepáticas y medios condicionados

El inmunoensayo muestra que la histamina incrementó la cantidad de colagenasa IV con todas las concentraciones empleadas, tanto en las células hepáticas como en el medio condicionado. Los niveles de colagenasa en los extractos celulares estuvieron incrementados entre 3.5 y 4 veces los valores de las células control, $p < 0.05$. Los niveles más altos se observaron también con concentraciones de 75 μM de histamina. La cantidad de proteína en el medio condicionado aumentó entre 2.5 y 3.8 veces, comparado con las células control, $p < 0.05$ (Figura 4). En relación con el efecto de los antagonistas, la pirilamina inhibió solo el 50% del efecto de la histamina en los extractos celulares, pero en el medio condicionado inhibió el 100%, $p < 0.05$. Este efecto no se observó con la cimetidina.

Inmunoensayos de uPA en las células hepáticas y los medios condicionados

Los resultados muestran una cantidad de proteína uPA en las células hepáticas WRL-68 diferente que en los medios condicionados. Los niveles de uPA en los extractos celulares estuvieron incrementados con todas las concentraciones de histamina empleadas (4.2 veces del control). La cantidad de proteína en el medio condicionado se elevó por encima de 4 veces, $p < 0.05$ (Figura 5). Los niveles más altos fueron con concentraciones de 75 μM de histamina (12 veces). En relación con el efecto de los antagonistas, se observó que la pirilamina inhibió completamente (100%) el efecto inducido por la histamina tanto en los extractos celulares como en el medio condicionado, $p < 0.05$. Este efecto no se observó con la cimetidina, ya que al igual que en la actividad proteolítica de la uPA, tanto la pirilamina como la cimetidina tienden a incrementar la cantidad de proteína de uPA por sí mismas, $p < 0.05$.

Es importante señalar que, aunque los niveles de la proteína uPA y de la colagenasa IV fueron marcadamente incrementados en los extractos y en el medio condicionado de las células hepáticas WRL-68, esta proteína no fue activa, como se demostró en los ensayos zimográficos.

Discusión

Durante la enfermedad hepática crónica ocurre una pérdida de los mecanismos homeostáticos que controlan no solo la producción y el depósito de la matriz (fibrogénesis), sino también su degradación y remoción (fibrólisis) [33]. La fibrosis hepática representa una compleja reacción fisiopatológica en la cual participan las células parenquimatosas y las no parenquimatosas, las células inflamatorias, los componentes de la matriz extracelular y varios mecanismos de transferencia de señales autocrinos, paracrinos y yuxtacrinos [34-36].

Uno de los problemas actuales en el campo de la hepatología es elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la fibrosis hepática. Por lo tanto, fue de interés para este grupo estudiar la función de la histamina en la modulación de la producción, secreción y actividad de la colagenasa tipo IV y la uPA en la línea celular hepática WRL-68 de tejido hepático normal humano, la cual expresa algunas de las propiedades funcionales semejantes al hepatocito en condiciones *in vivo* [37].

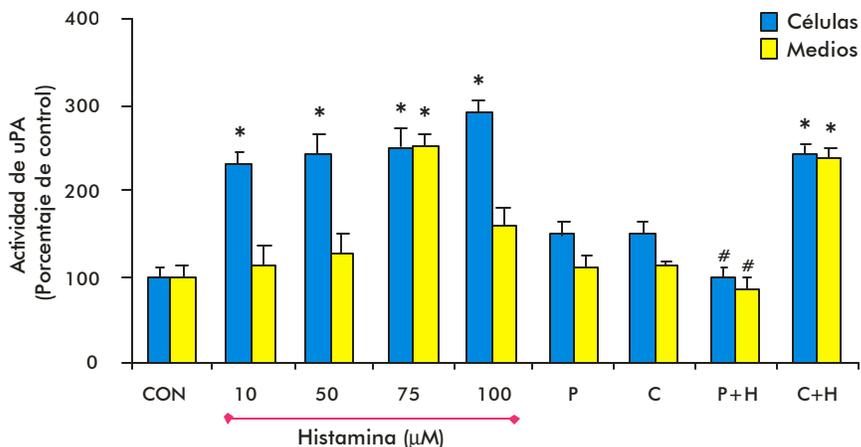


Figura 3. Efecto de la histamina sobre la actividad de uPA. Las células se trataron con diferentes concentraciones de histamina durante 24 h. Simultáneamente se adicionaron 1 μM de pirilamina (P) o 1 μM de cimetidina (C), antagonistas H1 y H2 respectivamente, con 75 μM de histamina (H) y solos. Muestras de 20 mg de proteína se sometieron a una electroforesis y se analizaron por zimografía. La densidad de las bandas correspondientes fue determinada con un programa para imágenes, y los resultados se expresaron como porcentaje del control. Las barras con diferente símbolo son significativamente diferentes comparado con el grupo control (* $p < 0.05$) o con 75 μM de histamina (# $p < 0.05$).

Desde hace más de una década se sabe que la histamina puede influir en el funcionamiento del hígado normal. La histamina forma un complejo con el citocromo P450 y actúa como modulador intracelular de este complejo enzimático en la célula hepática [38]. Además, se ha mostrado la presencia de depósitos de histamina en el núcleo de células hepáticas y su participación en la síntesis de ADN [39]. La histamina modula también el metabolismo de células hepáticas al incrementar la actividad de la fosforilasa y la producción del fosfo-tidilinositol, por vía de los receptores H1 [40]. Además, estimula la glucogenólisis por activar el mensajero de calcio [41].

33. Rockey DC. The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis. Clinical and therapeutic implications. Clin Liver Dis 2000;4:319-55.
 34. Gressner AM. Mediators of hepatic fibrogenesis. Hepatogastroenterology 1996;43:92-103
 35. Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. Alcoholism Clin Exp Res 1999;23:911-6.
 36. Gutiérrez Ruiz MC. Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture. In Vitro Cell Dev Biol 1994;30A:366-71.

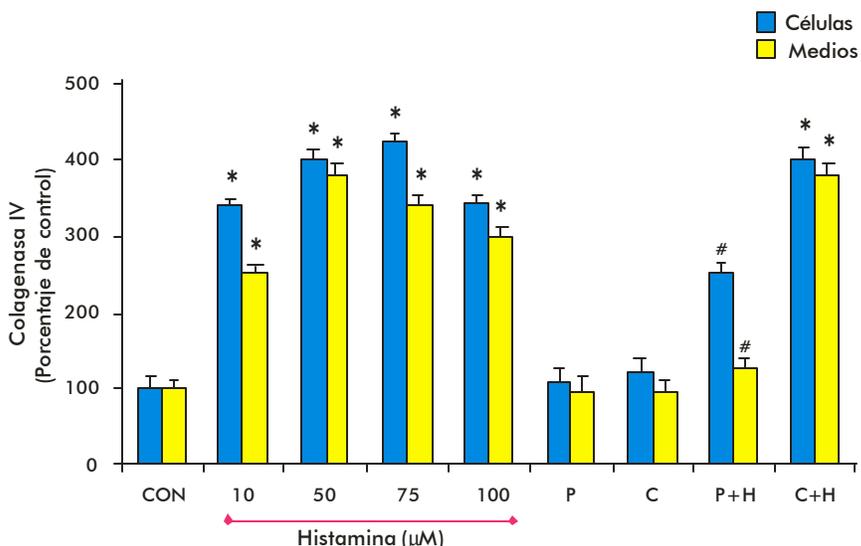


Figura 4. Efecto de la histamina sobre la cantidad de proteína colagenasa IV. Las células se trataron con diferentes concentraciones de histamina durante 24 h. Se adicionaron simultáneamente 1 μM de pirilamina (P) o 1 μM de cimetidina (C), antagonistas H1 y H2 respectivamente, con 75 μM de histamina (H) y solos. Muestras de células y medio condicionado se sometieron a un inmunoensayo utilizando anticuerpos policlonales para colagenasa IV. Los resultados se expresaron como porcentaje del control. Las barras con diferente símbolo son significativamente diferentes comparado con el grupo control (* $p < 0.05$) o con 75 μM de histamina (# $p < 0.05$).

La participación de la histamina en la enfermedad hepática crónica ha sido documentada desde hace varias décadas. Primero, se observaron cambios en el contenido de histamina durante la fibrosis experimental, presumiblemente derivada de un incremento de macrófagos en el área inflamada del hígado [42, 43]. Luego, el aumento de hidroxiprolina ocurre días después de que se incrementa el contenido de histamina en el hígado. Esto también sugiere que la histamina pueda participar en la biosíntesis de la colágena [18]. Tercero, se han encontrado niveles elevados de histamina plasmática en pacientes con varias formas de enfermedad hepática; existen cambios significativos en los receptores para histamina y elevadas concentraciones con histamina endógena en pacientes y en modelos animales con cirrosis hepática [44-47].

La histamina regula varios eventos del proceso de inflamación, no solo como un mediador químico que participa en las etapas tempranas de este proceso [48-50], sino también como un modulador de la biosíntesis y la reparación de heridas en la inflamación crónica [51].

Estudios previos han mostrado la modulación de la actividad proteolítica por parte de la histamina en la enfermedad inflamatoria crónica. Por ejemplo, se conoce que la histamina estimula la producción de metaloproteasa-1 de matriz en fibroblastos en la enfermedad reumatoide humana [52]; así como también, que induce la producción de metaloproteasa-3, metaloproteasa-13, FNT alfa y prostaglandina E₂ de matriz en condrocitos; mientras que en fibroblastos sinoviales incrementa la producción de metaloproteasa-1, metaloproteasa-3 y prostaglandina E₂. Esto sugiere que la histamina desempeña una función fisiopatológica en la remodelación hística en la osteoartritis [53]. Se ha demostrado que los leucocitos PMN de ratas tratadas con etanol tienen una gran capacidad para activar la colagenasa latente y este efecto es parcialmente inhibido por antagonistas de receptor de histamina, lo cual sugiere que la histamina podría estar implicada en el proceso de generación de actividad de la colagenasa latente [54]. Aunque la histamina es capaz de modificar la actividad de la colagenasa en el hígado mediante los leucocitos PMN, hasta el presente no hay reportes acerca de su función en la regulación de la actividad proteolítica en las células hepáticas.

Estudios previos han mostrado que los hepatocitos expresan receptores para histamina: H1 y H2 [55, 56]. Sin embargo, se plantea que la membrana plasmática del hepatocito tiene un mayor predominancia de receptores H1, y se ha mostrado que la [H³]-pirilamina es un antagonista representativo de receptores H1 con elevada afinidad [57]. Los resultados del presente estudio mostraron que la pirilamina previno completamente la producción y la actividad tanto de la colagenasa IV como de la uPA, pero de la cimetidina, no. Por lo tanto, ello indica que la histamina podría mediar sus efectos sobre las células hepáticas a través de la vía del receptor H1, más que por la H2. Estos resultados fueron congruentes con trabajos previos en los que se ha demostrado que la histamina estimula la actividad proteolítica en condrocitos y fibroblastos por medio del receptor H1 [49, 53].

En este estudio, se demuestra que la histamina incrementa la actividad proteolítica en una línea celular de hepatocitos humanos (células WRL-68). Aunque

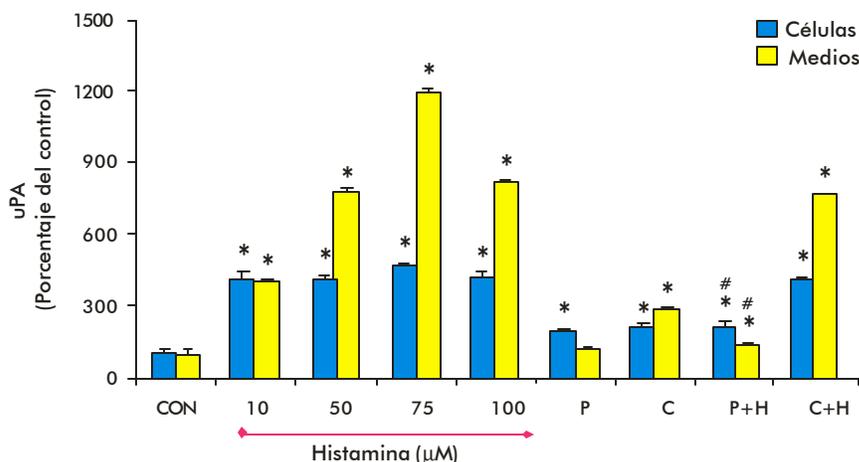


Figura 5. Efecto de la histamina sobre la cantidad de proteína uPA. Las células se trataron con diferentes concentraciones de histamina durante 24 h. Se adicionados simultáneamente 1 μM de pirilamina (P) o 1 μM de cimetidina (C), antagonistas H1 y H2 respectivamente, con 75 μM de histamina (H) y solos. Muestras de células y medio condicionado fueron sometidos a un inmunoensayo utilizando anticuerpo policlonales para colagenasa IV. Los resultados se expresaron como porcentaje del control. Las barras con diferente símbolo son significativamente diferentes comparado con el grupo control (*p<0.05) o con 75 μM de histamina (# p<0.05).

solo se incrementó la actividad de la colagenasa IV con 75μM de histamina, mientras que la actividad de la uPA se incrementó con todas las concentraciones. Aunque la histamina induce la producción, la actividad y la secreción de la colagenasa IV y la uPA en las células WRL-68, es capaz de secretar gran cantidad de proteína al medio condicionado, pero esta no es funcionalmente activa. Los resultados mostraron la expresión de gran cantidad de las proteínas de colágena IV y uPA, tanto en los extractos celulares como en los medios condicionados. Esos datos sugieren que la histamina tiene, además, el potencial de regular la producción, actividad y secreción de proteasas en las células hepáticas WRL-68.

Al inducir tanto la síntesis como la actividad proteolítica, la histamina podría regular un mecanismo completo y poderoso de degradación de la matriz extracelular durante el daño hepático. Sin embargo, la ausencia de actividad proteolítica en los medios condicionados sugiere que la histamina podría también inducir la producción de inhibidores para colagenasa y uPA, u otras moléculas en las células hepáticas WRL-68. Hellstrand y cols. señalaron que los niveles bajos de histamina en sangre determinan una pobre respuesta al tratamiento con interferón en la hepatitis C [58]. Esos datos sugieren que la perpetuación de la fibrosis puede ser una consecuencia de los efectos de la histamina sobre las células hepáticas.

La histamina es un mediador versátil que, según estudios *in vitro*, afecta la síntesis de citoquinas inflamatorias y de proteínas de fase aguda, mediante el receptor H1 [59-62]. Se sabe que luego del daño hepático, varios tipos celulares residentes o presentes en el infiltrado inflamatorio, pueden estar involucrados en la síntesis y liberación de factores solubles que repercuten en la función biológica de diferentes estirpes celulares. Esto significa que algunos grupos de factores solubles (citoquinas y/o factores de crecimiento), específicamente dirigidos a diferentes células blanco, de manera temporal están presentes en el tejido dañado.

37. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-50.

38. Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cyochrome P450, nuclei and chromatin from rat hepatocytes. *J Cell Biochem* 1998;1(69): 233-43.

39. Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochromes P450. *J Cell Biochem* 2002; 85(4):820-4.

40. García-Sainz JA, Macías-Silva M, Olivares-Reyes A, Romero-Avila MT. Histamine activates phosphorylase and inositol phosphate production in guinea pig hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1992; 227(3):325-31.

41. Mine T, Kojima I, Ogata E. Mechanism of glycogenolytic action of histamine in rat hepatocyte. *Am J Ohysiol* 1991; 261(6):G1000-G100439.

42. Suzuki M, Nakano K. Increase in histamine synthesis by liver macrophages CC14-injured mast cell-deficient W/Wv mice. *Biochem Pharmacol* 1996;52: 809-13.

43. Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995;22:1175-81.

44. Suzuki O, Ishii K, Nagata H, Miyairi M, Mizuno Y, Kiryu Y, Tsuchiya M. Role of plasma histamine in liver injury clinical and experimental investigations *Gastroenterol Jpn* 1979;14:336-43.

45. Stopik D, Hampel KE, Beger HG. Plasma histamine concentration and hemodynamic changes in liver cirrhosis. *Leber Magen Darm* 1978;8:91-3.

46. Peng J, Leng X, Wei Y. Changes of histamine receptors in the liver of the rat during the development of experimental cirrhosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1996; 4:113-6.

Es probable que ninguno de esos factores actué solo y que una compleja red de interacciones ocurra entre esos mediadores y sus blanco. Por esa razón, no puede ser descartada la posibilidad de que ocurra una interacción entre la histamina y otros mediadores *in*

vivo, los cuales pueden tener repercusiones en la actividad proteolítica, en el hepatocito y, en particular, en la célula estrellada hepática.

Son necesarios estudios posteriores para comprender mejor la función de la histamina en la fibrogénesis.

47. Gittlen SD, Schulman ES, Maddrey WC. Raised histamine concentrations in chronic cholestatic liver disease. *Gut* 1990;31:96-9.
48. Brandes LJ, LaBella FS, Glavin GB, Paraskevas F, Saxena SP, McNicol A, Gerrard JM. Histamine as an intracellular messenger. *Biochem Pharmacol* 1990;15:1677-81.
49. Tetlow LC, Adam DJ, Wooley DE. Matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:585-94.
50. Schneider E, Rolli-Derkinderen R, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *TRENDS in immunology* 2002; 23(5):255-63.
51. Buckley M.G, Walters C, Wong WM, Cawley MD, Ren S. Mast cell activation in arthritis: detection of alpha and beta tryptase, histamine and eosinophilic cation protein in synovial fluid. *Clin Sci* 1997;93:363-70.
52. Zenmyo M, Hiraoka K, Komiya S, Morimatsu M, Sasaguri Y. Histamine-stimulated production of matrix metalloproteinase 1 by human rheumatoid synovial fibroblast is mediated by histamine H1 receptors. *Virchows Arch* 1995;427:437-44.
53. Tetlow LC, Wooley DE. Effect of histamine on the production of matrix metalloproteinase-1, -3, -8 and 13, and TNF alpha and PGE2 by human articular chondrocytes and synovial fibroblasts *in vitro*: a comparative study. *Virchows Arch* 2004;445(5):485-90.
54. Zhang Z, Leng X, Feng H. Histamine-1 and 2 receptors in hepatic tissue of cirrhotic patients with portal hypertension. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1998;36:348-9.
55. Imoto M, Tsuchie K, Tanaka M, Sugiyama S, Ozawa T. Predominance of histamine H1 receptors on liver plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 27:885-9.
56. Delvalle J, Wang L, Gantz I, Yamada T. Characterization of H2 histamine receptor: linkage to both adenylate cyclase and [Ca²⁺] signaling systems. *Am J Physiol* 1992; 263:G967-72.
57. Garcia-Sainz JA, De la Garza MC, Contreras-Rodríguez JL, Najera-Alvarado A. Effects of histamine on the metabolism of isolated rat hepatocytes: roles of H1- and H2-histamine receptors. *Mol Pharmacol* 1987;31:253-8.
58. Hellstrand K, Brune M, Mellqvist UH, Norkrans G, Lundberg PA, Hermodsson S, Wejstal R. Histamine and the response to IFN-alpha in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18(1):21-2.
59. Meretey K, Falus A, Taga T, Kishimoto T. Histamine influences the expression of the interleukin-6 receptor on human lymphoid, monocytoid and hepatoma cell lines. *Agents Actions* 1991;33:189-91.
60. Donaszi-Ivanov A, Scharek P, Falus A, Fulop AK. Hepatic acute reaction in histamine-deficient gene targeted mice. *Inflammopharmacology* 2004;12(1):47-55.
61. Giustizieri ML, Albanesi C, Fluhr J, Gisondi P, Norgauer J, Girilomoni G. H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):1176-82.
62. Matsubara M, Tamura T, Ohmori K, Hasegawa K. Histamine H1 receptor antagonists blocked histamine-induced proinflammatory cytokines production through inhibition of Ca²⁺ dependent protein kinase C, Raf/MEK/ERK and IKK/I kappa B/NF-kappa B signal cascade. *Biochemical Pharmacol* 2005; 69(3):433-49.

Recibido en octubre de 2004. Aprobado en julio de 2005.