

Def. 44



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DE LOS  
EFECTOS DE LA HISTAMINA EN  
HEPATOCITOS DE RATA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
P R E S E N T A:  
**MARIA DEL CARMEN DE LA GARZA GAMERO**



MEXICO, D. F.

1987

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

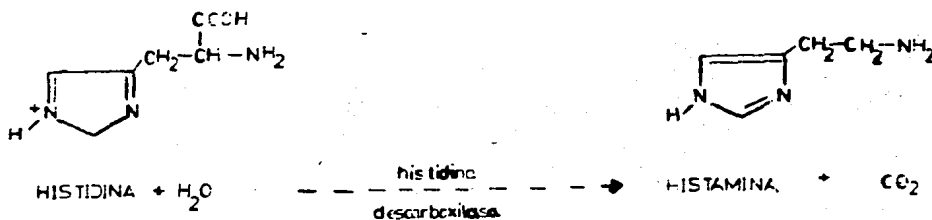
## INDICE

I. Introduccion	1
II. Materiales y Métodos	13
III. Resultados y Discusion	17
IV. Conclusión	24
V. Bibliografía	25

## INTRODUCCION

### 1.1 HISTAMINA; GENERALIDADES

La histamina es una hormona local ó autacoide; se forma en el organismo a partir de la histidina, por acción de la enzima histidina descarboxilasa. Esta enzima se encuentra presente en todos los tejidos del organismo. (1)



La histamina se encuentra en los vertebrados, principalmente localizada en los siguientes depósitos:

- En los gránulos de los mastocitos o células cebadas y en los gránulos de los basófilos. En estos gránulos, la histamina se encuentra debilmente unida por fuerzas iónicas con el complejo heparina-proteína.
- En las células del sistema nervioso central (probablemente en las neuronas) y en algunas células de tejidos en regeneración ó en crecimiento rápido. (2)
- En la capa mucosa del aparato digestivo. (3)

La histamina para que ejerza su acción tiene que ser liberada al medio interno y su liberación es estimulada por una serie de factores como son:

- Algunos polipéptidos y proteínas que ponen en marcha una respuesta secretoria no citolítica (exocitosis).

- b) Algunas otras sustancias que causan daños tisulares y pueden considerarse como estímulos fisiopatológicos que participan en la liberación de la histamina que sigue al daño celular.
- c) Se libera en la piel por estímulos físicos, produciendo la llamada "triple respuesta de Lewis" con dilatación capilar, dilatación arterial y edema.
- d) En la inflamación
- e) En la anafilaxia y en los estados alérgicos.
- f) Por algunos compuestos básicos como amidas, amidinas y diversos alcaloides.

La acción de la histamina es fugaz porque se difunde en los tejidos y se metaboliza rápidamente.

Son dos, las vías principales del catabolismo de la histamina en el hombre. La más importante incluye la metilación del anillo y es catalizada por la enzima histidina-N-metil transferasa (imidazol-N-metil transferasa, INMT). Casi todo el producto, la N-metil histamina, se convierte por acción de la Monoamina Oxidasa (MAO) en ácido-N-metil imidazol acético. En la otra vía la histamina experimenta desaminación oxidativa catalizada principalmente por la Diamina oxidasa (DAO), que realmente esta formada por enzimas no específicas que se encuentran en casi todos los tejidos y desaminan diversas diaminas aromáticas ó alifáticas. Los productos son el ácido imidazol acético y eventualmente el ribósido imidazol acético.

Fig.1.1 .

Los metabolitos, que tienen poca o ninguna actividad farmacológica, se excretan por la orina.

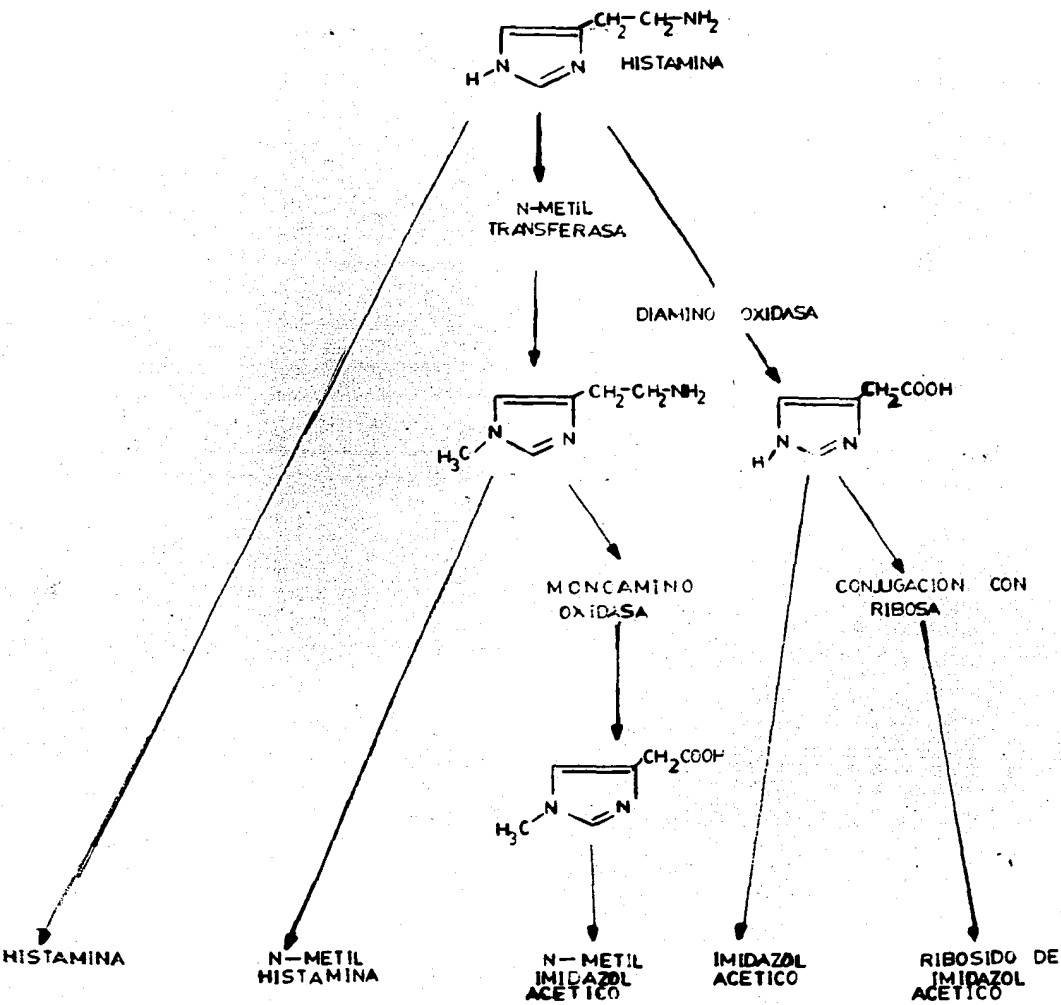


FIG. 1.1

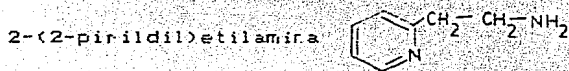
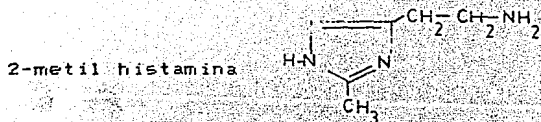
Catabolismo de la histamina en el organismo.

## 1.2 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS HISTAMINERGICOS

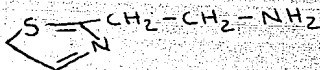
La histamina actúa a través de dos clases definidas de receptores llamados  $H_1$  (4) y  $H_2$  (5), por medio de los cuales ejerce su acción. Estos dos tipos de receptores se han identificado por medio de respuestas diferenciales a diversos agonistas y su bloqueo por antagonistas histaminérgicos. La disponibilidad de estos agonistas  $H_1$  y  $H_2$  histaminérgicos y los respectivos antagonistas han contribuido al conocimiento de la farmacología y de la fisiología de la histamina.

### 1.2.1 Agonistas y Antagonistas $H_1$ .

Algunos agonistas  $H_1$  histaminérgicos se indicarán a continuación con sus respectivas estructuras:



2,2 aminoetiliazol

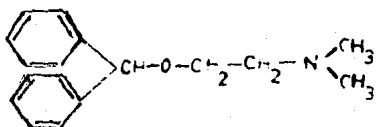


Los antagonistas  $H_1$  suprimen las acciones debidas a estímulo de los receptores  $H_1$  histaminérgicos. Casi todos estos antagonistas tienen acciones farmacológicas y aplicaciones terapéuticas semejantes.

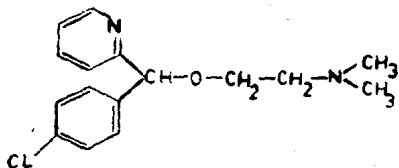
Los antagonistas  $H_1$  se clasifican (2) (6) en:

a) Etanolaminas:

Difenhidramina

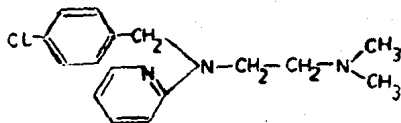


Carboxamina

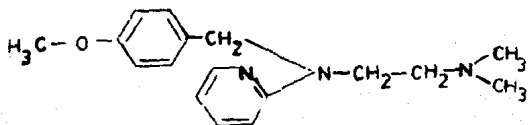


b) Etilendiaminas:

Cloropiramina

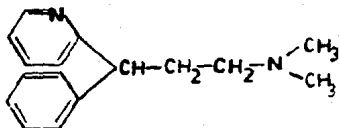


Pirilamina

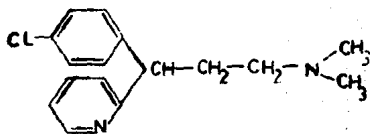


c) Alquilaminas:

Feniramina

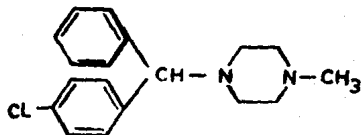


Clorofeniramina

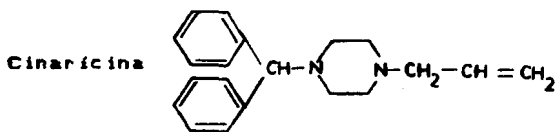


d) Piperazinas:

Clorociclizina

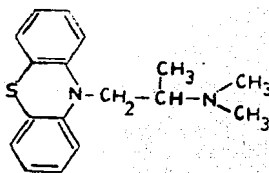




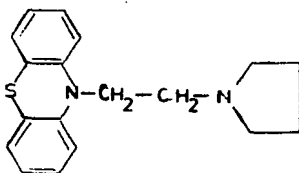


e) Fenotiazinas;

Prometazina



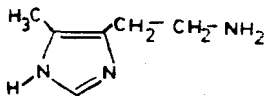
Piratiacina



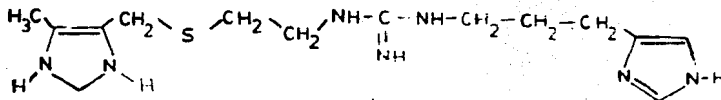
### 1.2.2 Agonistas y Antagonistas $H_2$ .

Algunos agonistas típicos que actúan sobre los receptores  $H_2$  se indican a continuación:

4-metilhistamina



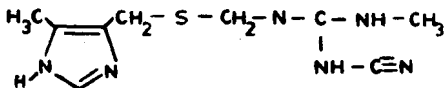
Impromidina

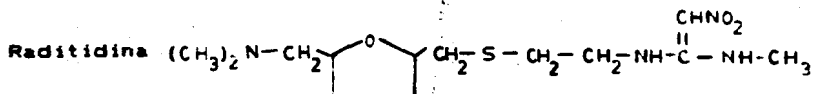


La introducción de los antagonistas  $H_2$  se ha logrado modificando a la molécula de histamina; se conserva el anillo imidazol de la histamina pero se adiciona una cadena lateral mucho más voluminosa. el anillo imidazólico se considera importante para el reconocimiento por los receptores  $H_2$  histaminérgicos. (7)

Entre los antagonistas más empleados se tiene a los siguientes:

Cimetidina





### 1.3 PRINCIPALES ACCIONES DE LA HISTAMINA Y PAPEL DE LOS RECEPTORES $\text{H}_1$ Y $\text{H}_2$ EN DIFERENTES PROCESOS FISIOLÓGICOS.

Las principales acciones de la histamina son las siguientes:

--En el sistema vascular induce dilatación de los vasos sanguíneos produciendo una baja de la presión arterial sistémica, disminuye la resistencia periférica y aumenta la permeabilidad capilar. Aparentemente en estas acciones participan tanto los receptores  $\text{H}_1$  como los  $\text{H}_2$ .

--En el corazón la histamina produce un efecto cronotrópico positivo a través de los receptores  $\text{H}_2$ , un efecto inotrópico positivo a través tanto de receptores  $\text{H}_1$  como  $\text{H}_2$ .

--Cuando se introduce en las capas superficiales de la piel causa prurito, aparentemente estimulando a los receptores  $\text{H}_1$ .

--En el músculo liso extravascular provoca contracción ó relajación según el tipo de músculo y tipo de receptor presente ( $\text{H}_1$  y  $\text{H}_2$  respectivamente).

--La histamina es un poderoso secretagogo gástrico y produce una copiosa secreción de jugo gástrico de gran acidez en dosis inferiores a las que influyen en la presión arterial. Este efecto esta mediado por los receptores  $\text{H}_2$ .

--Tiene efectos estimulantes sobre las células cromafines suprarrenales y los ganglios autónomos.

--Tiene acciones sobre las secreciones exócrinas salivales, lagrimales, pancreáticas, intestinal y bronquial.

Algunos antagonistas  $H_1$  histaminérgicos impiden las respuestas a la acetilcolina que están mediados por receptores muscarínicos, es decir tienen acción anticolinérgica; se utilizan para tratar algunas enfermedades alérgicas, tienen una capacidad para contrarrestar los mareos por cinetosis, poseen actividad anestésica local, inducen la liberación de ACTH (8). El efecto secundario más común en la administración de estos antagonistas es la sedación (9); también afectan al tracto digestivo provocando anorexia, náuseas y vómitos.

#### 1.3.1 Papel de los receptores $H_1$ .

Experimentos farmacológicos han demostrado que al aplicar histamina a diferentes células se elevan los niveles de calcio intracelular, esto en presencia y ausencia de calcio extracelular y que estos cambios están mediados por los receptores  $H_1$  (10,11). Con estos resultados, está claro porque la contracción del músculo liso vascular se encuentra mediado por este receptor, ya que la contracción del músculo liso vascular depende críticamente de calcio intracelular. (12)

Estudios realizados (13-15) han demostrado que la activación de los receptores  $H_1$  estimula el recambio de fosfoinosítidos. También se tienen evidencias de que la estimulación de estos receptores en células de astrocitoma activa a la fosfodiesterasa del AMP cíclico (16).

#### 1.3.2 Papel de los receptores $H_2$ .

Estudios realizados por Hegstrand (17) y Kanof (18) han demostrado que la activación de la adenilato ciclasa está mediada

por este tipo de receptores. Grund y colaboradores (19) mostraron en sus trabajos que la histamina por medio de sus receptores  $H_2$  tienen efectos sobre la lipólisis, incrementándose así los niveles de glicerol y de ácidos grasos libres, principalmente en tejido adiposo de perro, estos cambios están asociados a elevación de los niveles de AMP cíclico.

#### 1.4 MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE LOS RECEPTORES $H_1$ Y $H_2$ .

En general existen dos clases principales de acoplamiento ó transducción estímulo-respuesta para la histamina en la célula.

A) El primero se cree que está mediado por los receptores  $H_1$ , en el que comprende acciones que alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática a iones inorgánicos, particularmente mayor permeabilidad al sodio y al calcio que les permite entrar en la célula por medio de gradientes electroquímicos y movilización de calcio intracelular, lo cual se ve reflejado en incrementos de calcio citosólico. Aún no está completamente claro cual es el sitio intracelular que funciona como depósito donador de calcio y el mecanismo por el cual se efectúa el proceso de la elevación de calcio citosólico. Algunos estudios señalan que los depósitos de calcio intracelular puede ser la mitocondria (20,21) otros sugieren otro depósito como el retículo endoplásmico (22,23) o ambos (24). Con excepción de la membrana plasmática el sitio de donde se movilizará calcio requiere de la intervención de una molécula que actuará como segundo mensajero. Michell (25) propuso desde 1975 que el recambio de fosfatidilinositol (PI) en la membrana plasmática era la respuesta primaria a la intervención de las hormonas dependientes

de calcio con su receptor. Se creía que la interacción de la histamina con sus receptores  $H_1$  activaba a una fosfolipasa, lo cual resulta en un incremento de la degradación del PI en la membrana plasmática convirtiéndolo en 1,2-diacilglicerol y mioinositol-1,2-fosfato cíclico. La fosforilación del grupo hidroxilo libre del diacilglicerol por ATP produce ácido fosfatídico (PA) el cual es resintetizado a PI por una CDP-diacil-glicerol inositol transferasa en el retículo endoplásmico. Hasta esta fecha no se tenían evidencias de cual de estos procesos producía la movilización de calcio.

En 1985 Berridge e Irvine (26) demuestran en la glándula salival de la mosca que la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) en inositol 1,4,5, trifosfato ( $IP_3$ ) y 1,2 diacilglicerol ocurría en 3 segundos, estos resultados dan la idea de que el  $IP_3$  pudiera funcionar como segundo mensajero en la movilización de calcio intracelular. Otros trabajos realizados por ellos demuestran que la adición de  $IP_3$  en el rango micromolar induce la movilización de calcio del retículo endoplásmico, este efecto se podría interpretar como específico de  $IP_3$ . También se cree que una proteína cinasa activada por el diacilglicerol, llamada proteína cinasa C puede tener importancia en este mecanismo de transducción hormonal.(27).

Este tipo de mecanismo también está propuesto para otras hormonas que son dependientes de calcio. figura 1.4.1

B) En el segundo mecanismo que está mediado por los receptores  $H_2$ , se refiere a la activación de la adenilato ciclasa y a la generación de AMP cíclico.

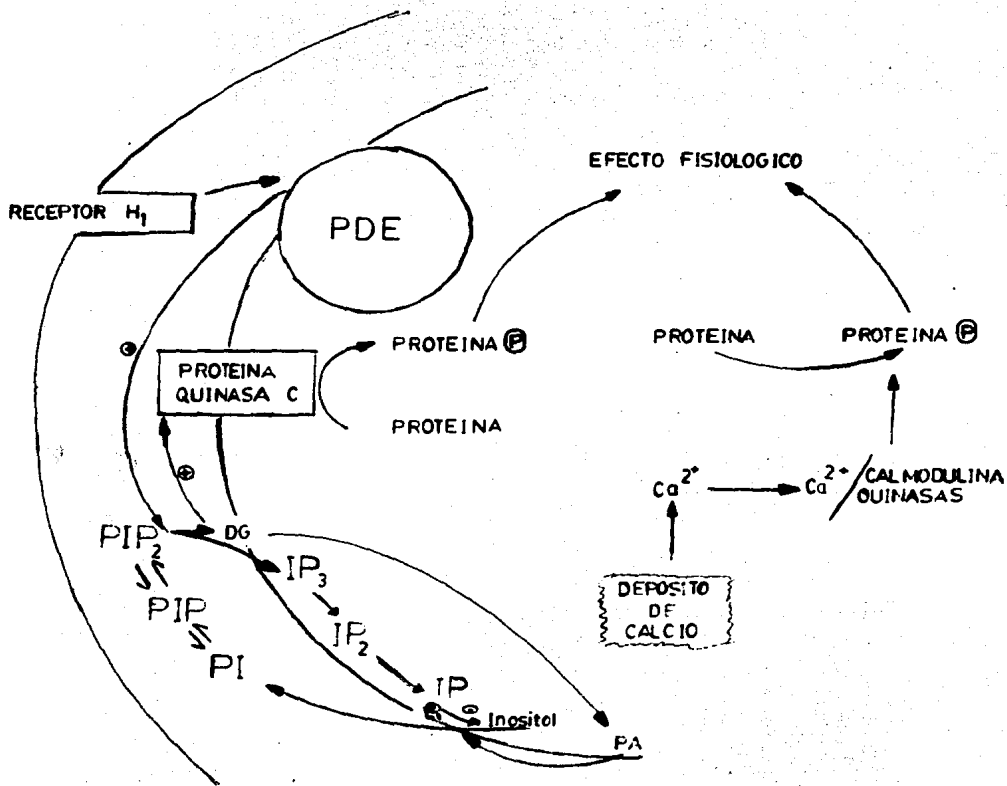


FIG. 1.4.1

PDE= fosfodiesterasa; PIP<sub>2</sub>=fosfatidilinositol 4,5 bifosfato;  
 IP<sub>3</sub>=Inositol 1,4,5, trifosfato; DG= 1,2 diacilglicerol; PA= Acido fosfatidico.

Por estudios realizados (28,29) se sabe que algunos receptores y la adenilato ciclasa forman parte de un complejo integrado por tres entidades; el receptor, una proteína reguladora denominada "N" la cual posee alta afinidad por nucleótidos de guanina y la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Recientemente se ha demostrado que la proteína "N" involucrada en la activación de la adenilato ciclasa es diferente de la que participa en la inhibición (28,30-32). Rodbell en 1980 (28) de acuerdo a la terminología propuesta asigno Ns a la proteínas que estimula a la adenilato ciclasa y Ni a la que la inhibe. Por consiguiente, la respuesta inmediata a la interacción hormona-receptor se inicia con la formación de un complejo oligomérico que controla la actividad de la unidad catalítica de la adenilato ciclasa y transforma el ATP a AMP cíclico, que es el segundo mensajero. Las modificaciones en los niveles de AMP cíclico son detectados por una serie de enzimas llamadas proteínas cinasa (PK), estas están formadas por dos tipos de subunidades: unas de reconocimiento del AMP cíclico o reguladoras y otras con actividad catalítica, las cuales se activan por este proceso y desencadenan una cascada de fosforilación de enzimas reguladoras que resulta en cambios tales como estimulaciones de la glucogenolisis o inhibición de la glucogénesis. Al disminuir los niveles de AMP cíclico se disocia de las subunidades catalíticas deteniendo el proceso. figura 1.4.2

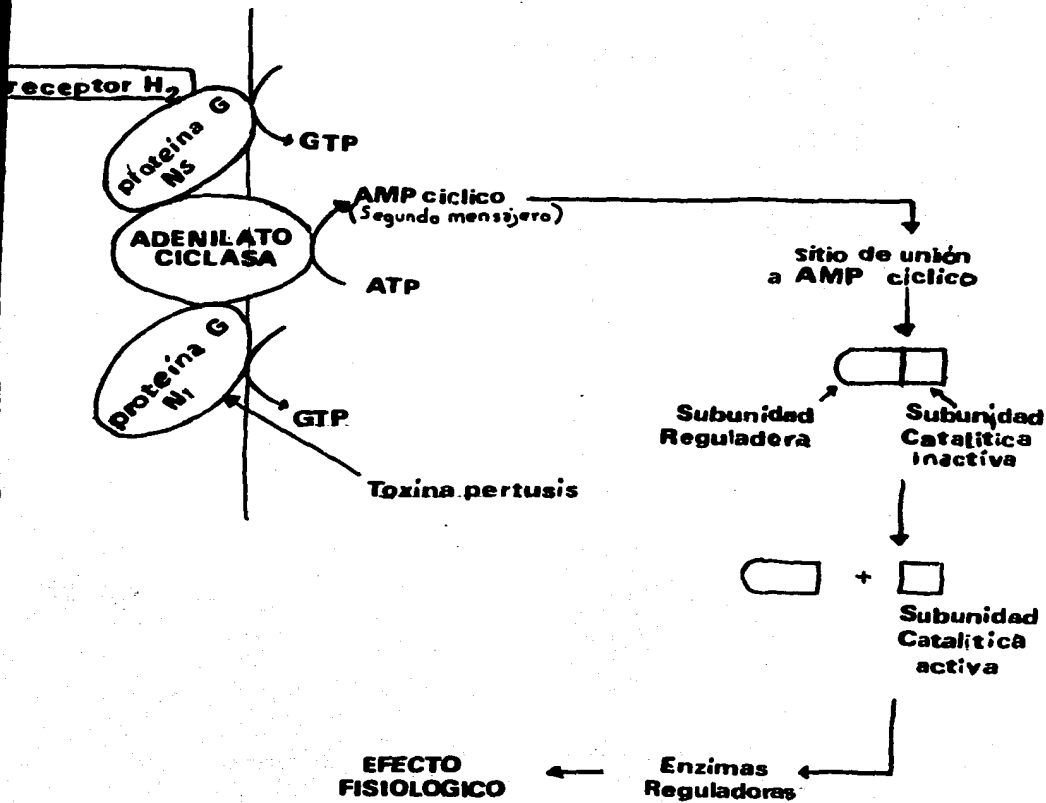


FIG. 1.4.2

Mecanismo de transducción de los receptores  $H_2$  histaminérgicos.



## II OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO: CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DE LOS EFECTOS DE LA HISTAMINA EN HEPATOCITOS DE RATA.

### 2.1 ANTECEDENTES

Imoto et. al (33) reportarán que en la membrana plasmática de hígado de rata se encuentran un gran número de receptores  $H_1$  histaminérgicos, más que otros como los receptores  $H_2$  histaminérgicos, -adrenergicos y prostaglandina  $E_2$ . Trabajos efectuados por Wang et. al (34) han determinado el peso molecular del receptor  $H_1$  histaminérgico hepático en diferentes especies, comprobando que estos pesos son parecidos en las diferentes especies. Sin embargo nada se sabe del papel fisiológico de estos receptores para la histamina.

Estas informaciones nos llevaron a realizar un estudio farmacológico de la respuesta hepática a la histamina.

Se sabe que otras hormonas como la adrenalina, el glucagon, la vasopresina y la angiotensina II estimulan la gluconeogénesis, la glucogenolisis y la ureogénesis en hepatocitos de rata (35-39).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- a) Determinar el efecto de la histamina en las siguientes vías metabólicas: Glucogenolisis, gluconeogénesis y ureogénesis mediante curvas dosis-respuesta en hepatocitos aislados de rata.
- b) Determinar los tipos de receptor histaminérgicos involucrados efectuando curvas dosis-respuesta a histamina con y sin antagonistas de receptores  $H_1$  y  $H_2$  histaminérgicos (Pirilamina y Cimetidina) en hepatocitos aislados de rata utilizando la vía metabólica ureogénesis.

- c) Determinar si el efecto de la histamina esta mediado por calcio extracelular, efectuando curvas dosis-respuesta en las condiciones citadas en b.
- d) Determinar si las acciones de los esteroides de forbol afectan la respuesta de la histamina, efectuando curvas dosis-respuesta en las condiciones citadas en b.
- e) Determinar si los efectos de la histamina son modificados por diversas circunstancias (ratas tratadas con toxina pertusis, ratas hipotiroideas) efectuando curvas dosis-respuesta en las condiciones citadas en b.
- f) Determinar si los efectos de la histamina se encuentran afectados por un agente activador de la Adenilato ciclasa (forskolina) efectuando curvas dosis-respuesta en las condiciones citadas en b.

## MATERIALES Y METODOS

### 1 SUSTANCIAS

Las sustancias utilizadas se obtuvieron de los siguientes laboratorios:

Ureasa, peroxidasa, glucosa oxidasa, glutamina, ornitina, pirilamina, histamina, (-)adrenalina, di-propanolol, forbol 12-ministato 13-acetato (PMA) y 6-n-propil-2-tiouracilo fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. La forskolina (7 $\beta$ -acetoxi-8,13-epoxi-8,9,2 $\beta$ -trihidroxi-13d-14-en-11-uno) fue obtenida de Calbiochem. La toxina pertusis fue purificada de vacuna pertusis concentrada por el método de Sekura et. al. (40). La cimetidina y la impromidina fueron generosamente regaladas por Smith Kline and French. La colagenasa fue obtenida de Cooper Biomedical.

### 2 ANIMALES

Se usaron ratas hembras de la raza Wistar de aproximadamente 200-250g, alimentadas *ad libitum*.

El hipotiroidismo se indujo dando de beber a las ratas agua con 0.030% de 6-n-propil-2-tiouracilo por 40-50 días, esto fue evaluado por decremento del peso, resequedad de la piel y disminución de los niveles de triiodotironina (41).

La toxina pertusis (50 $\mu$ g/100g) fue administrada por vía intraperitoneal a los animales 3 días antes del experimento. (42)

### 3 AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS. Método de Berry and Friend (43).

Los animales fueron anestesiados por inhalación de cloroformo para abrir el abdomen y poder canular la vena porta.

El hígado fue lavado con buffer Krebs-Ringer-bicarbonato sin calcio (pH=7.4) y después se perfundió recirculando por 20

minutos 30 ml de buffer Krebs-Ringer-bicarbonato con calcio y 15mg de collagenasa. Todo el procedimiento se realizó en un aparato de perfusión a 37°C y con gaseo constante con una mezcla 95% oxígeno/5% CO<sub>2</sub>.

El hígado se transfirió a una caja petri de plástico con un poco de buffer Krebs-Ringer-bicarbonato con calcio. Las células se dispersaron cuidadosamente con la boca de un tubo pequeño de plástico. La suspensión de células se filtró con tela de nylon y se centrifugo tres veces por un minuto a baja velocidad en una centrifuga clínica, para lavar las células se utilizó el buffer con calcio, obteniendose 30-40mg de células/ml (peso húmedo), en cada preparación.

#### 4 PARAMETROS METABOLICOS

Para los tres parámetros metabólicos se incubó a 37°C 1 ml de suspensión de células con las sustancias ensayadas en atmósfera 95%oxígeno/5%CO<sub>2</sub> en tubos de plástico tapados y con agitación constante por 60 minutos.

La incubación se termina colocando la suspensión en agua helada. Para la determinación de glucosa o urea se centrifuga la suspensión por 1 minuto en la máxima velocidad en una centrifuga clínica y se toma una muestra del sobrenadante.

##### 4.1 GLUCOGENOLISIS

La incubación de las células se realiza en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato. Para determinar la degradación de glucógeno, las ratas se utilizaron alimentadas ad libitum y los experimentos se realizaron entre las 8 y las 10 de la mañana.

Los niveles de glucógeno en la rata control fueron  $4.5 \pm 0.2$  mg de glucógeno/100 mg de hígado.

La glucogenólisis se detectó ensayando glucosa en el sobrenadante tomando previamente una muestra al tiempo cero de la incubación.

#### 4.2 GLUCONEOGENESIS.

Para determinar la gluconeogénesis, las células se incubaron en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato enriquecido con 1-lactato 10mM como sustrato. La producción de glucosa que no fue a partir de este sustrato y que fue aproximadamente del 10-20% de la producción total, se restó en cada caso de los valores obtenidos con 1-lactato. Los animales utilizados se mantienen en ayuno durante 24 horas antes del experimento.

#### 4.3 UROGENESIS

El medio de incubación Krebs-Ringer-bicarbonato, glucosa 10mM, se suplementó con glutamina 10mM y ornitina 2mM como sustrato para la síntesis de urea. Los animales fueron utilizados a cualquier hora del día, alimentadas *ad libitum*.

### 5 METODOS ANALITICOS

#### 5.1 Determinación de glucosa. Método de Fales (44)

Tomar una alícuota del sobrenadante de 25 ó 50  $\mu$ l directos para gluconeogénesis y 25 ó 50  $\mu$ l diluidos 1:3 para glucogenólisis. Anadir 0.3ml de reactivo de glucosa-oxidasa (glucosa-oxidasa 2.7U/ml, peroxidasa de rábano 5.2 U/ml, diclorhidrato de o-diansidina 0.78mM en buffer glicerol-fosfatos pH=7.0), agitar y esperar 1 hora, después de este tiempo

desarrollar color agregando 2.7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N y leer en el espectrofotómetro a 540 nm.

Los resultados se interpolan en una curva patrón de glucosa y se expresan en nmoles de glucosa/mg de células (peso húmedo). La curva se realiza en cada experimento.

#### 5.2 Determinación de urea. Método de Gutman y Bergmeyer (45).

Tomar una alícuota del sobrenadante de 50  $\mu$ l, añadir 100  $\mu$ l de ureasa (5mg/ml en solución al 50% en glicerol) y 150  $\mu$ l de buffer de fosfatos pH=7.5, agitar y tapar, incubar 20 minutos a 37°C. Desarrollar color agregando 5ml de solución de fenol 0.106 M-nitroprusiato 0.12mM y 5ml de hipoclorito de sodio 11 mM, tapar, agitar y esperar 30 minutos, leer en el espectrofotómetro a 575nm. Las lecturas de absorbencia se interpolan en una curva patrón de urea y se expresan en nmoles de urea/mg de células (peso húmedo). La curva patrón se realiza en cada experimento.

#### 6 METODOS ESTADISTICOS

Los resultados presentados son el promedio de 3-6 preparaciones de células  $\pm$  el error estándar, determinandose cada punto por duplicado en cada una de las preparaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para caracterizar los efectos de la histamina sobre los hepatocitos aislados de rata, se determinaron sus efectos metabólicos, usando tres parámetros metabólicos. (fig. 1)

-- En la ureogénesis (fig. 1, panel A) a concentraciones crecientes de histamina se determino el porciento de estimulación de la síntesis de urea; donde se observa una estimulación máxima en un rango de 40-60% con respecto al basal y la cual se satura en un rango de concentración de  $10^5$  M a  $10^{-4}$  M de histamina, teniendo una dosis efectiva 50 de  $\times 10^1$  M de histamina.

-- En la gluconeogénesis (fig. 1, panel B), a concentraciones crecientes de histamina se midió el porciento de estimulación de la síntesis de glucosa a partir de lactato; donde se obtiene una estimulación máxima en un rango de 50-60% con respecto al basal y su saturación la presenta a una concentración de  $10^{-4}$  M de histamina presentando la misma dosis efectiva 50.

-- En la glucogenolisis (fig. 1, panel C) a concentraciones crecientes de histamina se midió el porciento de estimulación de la liberación de glucosa: donde se obtiene una estimulación máxima en un rango de 60-80% con respecto al basal. Tanto su saturación y su dosis efectiva cincuenta son iguales que las anteriores. Con estos resultados podemos decir que los efectos de la histamina sobre estos tres parámetros metabólicos son similares a los que se presentan con otras hormonas como la adrenalina (46) o el glucagon (47)

El parámetro metabólico ureogénesis fue preferido para

realizar los siguientes estudios, porque las condiciones para obtener la síntesis de urea, como para determinarla se pueden manejar más fácilmente que las otras dos vías metabólicas utilizadas.

Con los resultados anteriores se prosiguió a determinar a través de que tipo de receptor se encuentra mediada la acción de la histamina, para lo cual se utilizaron para este estudio dos antagonistas; La pirilamina ( $H_1$ ) y la cimetidina ( $H_2$ ) (fig. 2) La pirilamina inhibe el 60% del efecto de la histamina y cimetidina sólo el 30%, por lo tanto ambos antagonistas inhiben en forma parcial los efectos de la histamina, siendo la pirilamina más potente y efectiva que la cimetidina. Se estudio el efecto de la histamina a una concentración fija de  $10 \mu M$ , con una concentración saturante de uno de los antagonistas ( $1 \mu M$ ).

Se observó que al mantener fijas las concentraciones tanto de histamina como de cimetidina e incrementar las concentraciones de pirilamina se logra inhibir al 100% la estimulación obtenida. En forma similar los efectos de la histamina ( $10 \mu M$ ) también se inhiben por concentraciones crecientes de cimetidina, teniendo una concentración fija de pirilamina ( $1 \mu M$ ) (ver figura 2).

Con estos resultados se realizó el estudio de las acciones de dos agonistas; el 2,2 aminoetilthiazol ( $H_1$ ) y la impromidina ( $H_2$ ) (fig. 3). el agonista 2,2 aminoetilthiazol estimula aproximadamente 40% la ureogénesis sobre el basal, mientras que el agonista impromidina la estimula sólo el 20% sobre el basal, las dosis efectivas cincuenta para el agonista 2,2 aminoetilthiazol se presenta a una concentración de  $10^{-6} M$ , mientras que la del agonista impromidina se presenta a una concentración de  $10^{-7} M$ .



Los datos indican que el 2,2 aminoetiltiazol es más efectivo y menos potente que la impromidina.

Se pretendió conocer la selectividad de los agonistas 2,2 aminoetiltiazol ( $H_1$ ) e impromidina ( $H_1$ ) al usar antagonistas selectivos como son la pirilamina ( $H_1$ ) y la cimetidina ( $H_2$ ) (fig.4). Se observó que la estimulación obtenida por el 2,2 aminoetiltiazol es inhibida totalmente por la pirilamina y sin embargo dicha estimulación no es inhibida por la cimetidina. Por el contrario el efecto de la impromidina con una estimulación del 20% es inhibida por la cimetidina, pero no por la pirilamina.

Los resultados presentados anteriormente nos indican lo siguiente: ambos receptores actúan para la acción de la histamina y la acción del receptor  $H_1$  predomina sobre del receptor  $H_2$ .

Se tienen evidencias de la acción de algunas hormonas como vasopresina, angiotensina II, es dependiente del calcio extracelular, mientras que las de otras hormonas no (48). Por tal motivo se pensó en estudiar la influencia del calcio extracelular en la acción de la histamina y sus agonistas (figs. 5 y 6). Se observó que en ausencia de calcio extracelular con 25 $\mu$ M de EGTA se produce un descenso en la estimulación de la ureogénesis por la histamina (fig. 5). La estimulación producida por el agonista  $H_1$  histaminérgico, el 2,2 aminoetiltiazol también es disminuida significativamente por la ausencia del calcio extracelular (fig. 6). En contraste, los efectos de la impromidina no son afectados por la ausencia de calcio extracelular (fig. 6).

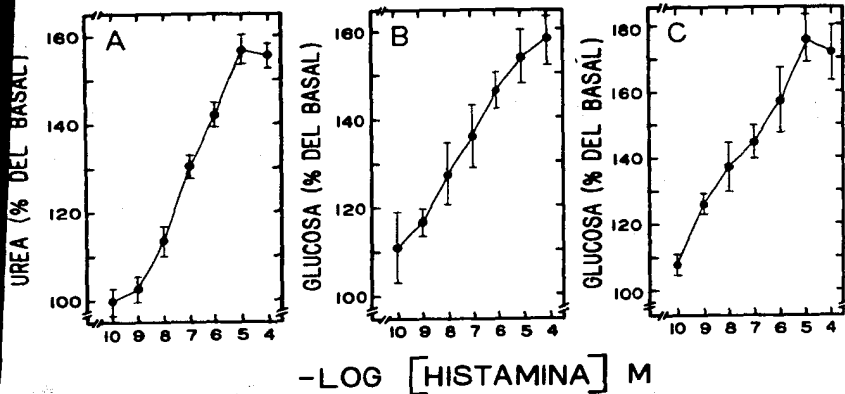


FIG. 1

EFFECTOS DE LA HISTAMINA SOBRE LA UREOGÉNESIS, LA GLUCONEOGÉNESIS Y LA GLUCOGENOLISIS EN HEPATOCITOS DE RATA. Los hepatocitos fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de histamina; ureogénesis (panel A), gluconeogénesis a partir de lactato (panel B) y glucogenólisis (panel C). Los resultados se expresan como el porcentaje del valor basal. La ureogénesis fue de  $26 \pm 1$  nmoles de urea/mg de célula (peso húmedo); la gluconeogénesis a partir de lactato fue de  $15 \pm 1$  nmoles de glucosa/mg de células (peso húmedo) y la glucogenólisis fue de  $44 \pm 2$  nmoles de glucosa/mg de células (peso húmedo). Las líneas verticales representan el error estándar de cada promedio de 10-15 determinaciones usando diferentes preparaciones de células.

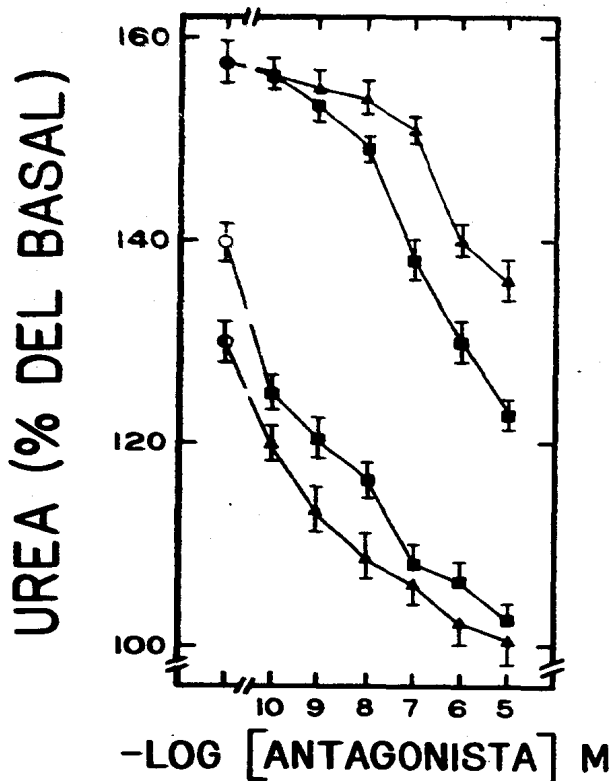


FIG. 2

EFFECTOS DE LA PIRILAMINA (ANTAGONISTA  $H_2$ ) Y LA CIMETIDINA (ANTAGONISTA  $H_2$ ) SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREGENESIS INDUCIDA POR LA HISTAMINA. Los hepatocitos fueron incubados en la presencia de  $10^{-6}$  M de histamina (●),  $10^{-6}$  M de histamina +  $10^{-6}$  M de cimetidina (○) o  $10^{-6}$  M de histamina +  $10^{-6}$  M de pirilamina (●) o cimetidina (▲). Los resultados se expresan como el porcentaje del basal de la síntesis de urea, el cual fue de  $27 \pm 1$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo). Las líneas verticales representan el error estándar de cada promedio de 8 determinaciones usando diferentes preparaciones de células.

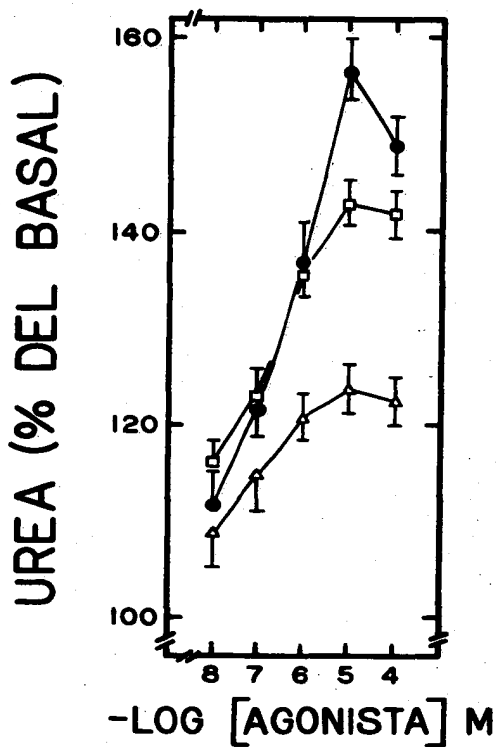


FIG. 3

EFFECTOS DE LA HISTAMINA, EL 2,2 AMINOETILTIAZOL Y LA IMPROMIDINA SOBRE LA UREOGENESIS EN HEPATOCITOS DE RATA. Los hepatocitos fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de histamina (●-●), 2,2 aminoetilthiazol (□-□) o impromidina (Δ-Δ). Los resultados se expresan como el porcentaje del valor basal de la síntesis de urea presentado al pie de la fig. 2 .

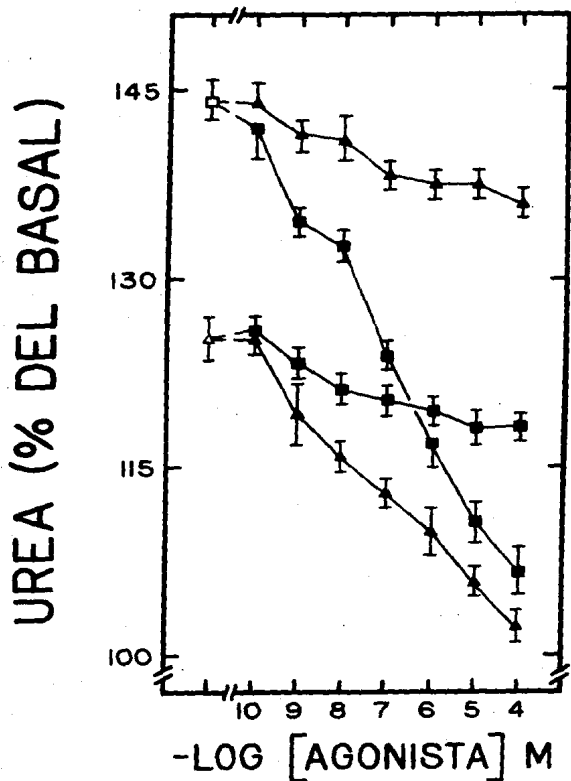


FIG. 4

EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS PIRILAMINA Y CIMETIDINA SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS POR EL 2,2 AMINOETILTHIAZOL Y LA IMPROMIDINA. Los hepatocitos fueron incubados en la presencia de  $10^{-8}$  del 2,2 aminoetilthiazol (□) ó  $10^{-8}$  de impromidina (△) y con diferentes concentraciones de pirilamina (●) ó cimetidina (▲). Otras indicaciones se presentan al pie de la fig. 2.

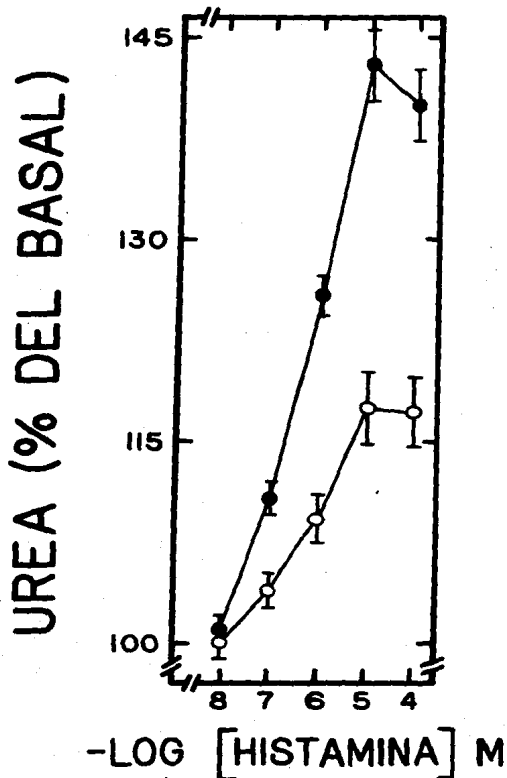


FIG. 5

EFFECTOS DEL CALCIO EXTRACELULAR SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS INDUCIDA POR LA HISTAMINA. Los hepatocitos fueron incubados en buffer regular de Krebs-Ringer bicarbonato conteniendo 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$  (●-●) ó buffer sin  $\text{CaCl}_2$  + 25  $\mu\text{M}$  EGTA (○-○) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de histamina. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor basal de la síntesis de urea el cual fue de  $29 \pm 1$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo) en buffer regular y  $20 \pm 2$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo) en buffer sin  $\text{CaCl}_2$  + 25  $\mu\text{M}$  EGTA. Con líneas verticales se representa el error estándar de cada promedio de 4 determinaciones usando diferentes preparaciones de células.

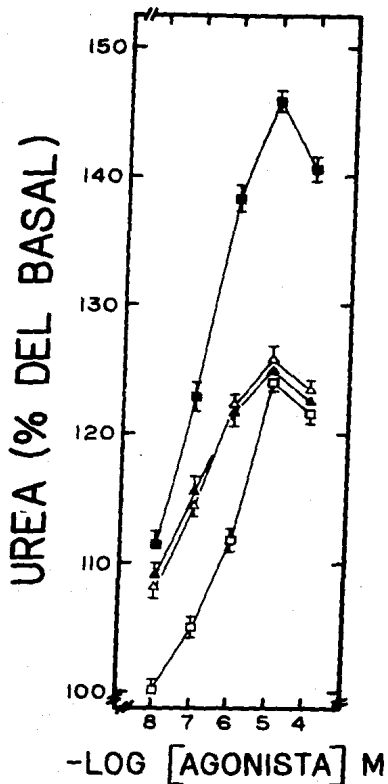


FIG. 6

EFFECTOS DEL CALCIO EXTRACELULAR SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS INDUCIDA POR EL 2,2 AMINOETILTIAZOL O LA IMPROMIDINA. Los hepatocitos fueron incubados en buffer regular de Krebs-Ringer bicarbonato conteniendo 1.2 mM de  $\text{CaCl}_2$  en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de 2,2 aminoetiltiazol (■) e imprimidina (▲), y con buffer de Krebs-Ringer sin  $\text{CaCl}_2$  + 25  $\mu\text{M}$  de EGTA en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de 2,2 aminoetiltiazol (□) e imprimidina (△). Los resultados se presentan como el porcentaje del valor basal de la síntesis de urea presentado al pie de la fig. 2 .

Se tienen evidencias del laboratorio de García-Sáinz de que en hepatocitos de ratas hipotiroideas los efectos de los agentes que estimulan a la adenilato ciclasa como el glucagon o los agentes  $\beta$ -adrenergicos(41,49-51) están aumentados mientras que las acciones de las hormonas como la vasopresina o la angiotensina II que dependen absolutamente de la presencia de calcio extracelular están disminuidas(41,49,52-53) Tomando esto en cuenta se pretendió determinar si la acción de la histamina y sus agonistas se verían afectadas por el estado de hipotiroidismo de las ratas, (fig. 7). La acción del agonista 2,2 aminoetiliazol en hepatocitos de ratas hipotiroideas disminuyo notablemente al compararlo con el obtenido en hepatocitos controles (comparar fig. 3 y fig. 7), mientras que la acción del agonista impromidina aumentó al compararla con la obtenida en hepatocitos controles (fig. 3). Esto sugirió lo siguiente: El efecto del agonista 2,2 aminoetiliazol es similar a la de otras hormonas como la vasopresina o la angiotensina II y la acción del agonista impromidina es parecida a la acción del glucagon y los agentes  $\beta$ -adrenérgicos.

Los ésteres de forbol, son una serie de agentes tumorigénicos; el más potente de ellos es el 4 - forbol-12 miristato -13 acetato (PMA). Este agente es capaz de activar directamente a la proteína cinasa C. Se ha reportado inhibición de la respuesta  $\alpha_1$ -adrenergica por PMA, lo cual se cree que es debido a la fosforilación del receptor  $\alpha_1$ -adrenergico. (54-59). Por lo tanto se pretendió determinar si las acciones del PMA afectaban la respuesta de histamina (fig. 8); se observó que las acciones de la histamina no se afectan ni las de los agonistas



selectivos, el 2,2 aminoetiltiliazol y la impromidina, sin embargo, los efectos de la adrenalina se ven completamente inhibidos por el PMA. Esto nos sugirió pensar que la acción de la histamina y sus agonistas no están modulados a través de la actividad de la proteína cinasa C.

La toxina pertusis es una exotoxina producida por la *Bordetella pertusis*. La toxina bloquea la transferencia de la información inhibitoria del receptor a la adenilato ciclasa (60), catalizando la ADP-ribosilación de la subunidad de la proteína que se encuentra involucrada en la inhibición del adenilato ciclasa. (Ni) (61). Se ha observado que la acción de agentes que estimulan a la adenilato ciclasa es amplificada por la acción de la toxina (42,62-6). Se estudió el efecto de la histamina y sus agonistas en hepatocitos de ratas tratadas con toxina pertusis. (fig. 9). Se observó que los efectos del agonista impromidina se incrementan al ser comparadas con lo obtenido en células controles; los efectos del agonista 2,2 aminoetiltiliazol no se alteran en comparación con los efectos observados en las células controles, obteniendo una estimulación máxima entre 30-40%. En base a estos datos se puede decir que la eficacia del agonista impromidina es mayor en células de ratas tratadas con toxina pertusis que la obtenida en células controles; las acciones del 2,2 aminoetiltiliazol y de la histamina no se ven alterada en células de ratas tratadas con toxina pertusis.

La forskolina es un derivado diterpénico extraído de la planta *Coleum forskohli*. Se ha demostrado por Seamon et. al (65) que es un agente activador de la adenilato ciclasa tanto en

membranas aisladas como en células intactas. Activa a la adenilato ciclasa en concentraciones mayores a  $10^{-7}$  M de este diterpeno, mientras que a concentraciones menores de  $10^{-7}$  M sólo amplifica la acción de agentes que estimulan a la adenilato ciclasa. Se han estudiado las acciones de los agonistas beta adrenérgicos en adipocitos y en hepatocitos aislados en presencia de forskolina observandose una amplificación (66,67). Se realizó el estudio de la acción de la histamina y sus agonistas en presencia de forskolina (fig. 10) obteniendo lo siguiente; la estimulación del agonista impromidina se incrementó un 100% comparado con la acción del mismo agonista en células control, mientras que la estimulación del agonista 2,2 aminoetiliazol y de la histamina es igual a la obtenida en controles. En estas condiciones la eficacia del agonista 2,2 aminoetiliazol y la del agonista impromidina son iguales, pues la estimulación de la impromidina se encuentra amplificada por la acción de la forskolina.

En la figura 11 se muestra un resumen de la acción de la histamina, de sus agonistas y antagonistas en las diversas condiciones estudiadas. Se observa claramente que la eficacia de la activación del receptor  $H_1$  es muy similar en hepatocitos de ratas control, hepatocitos de ratas tratadas con toxina pertusis y con forskolina, mientras que en células de ratas hipotiroidea se encuentra disminuida. Se puede decir que la acción de la estimulación del receptor  $H_2$  es similar en hepatocitos tratados con toxina pertusis, en hepatocitos de ratas hipotiroideas y en hepatocitos incubados con forskolina, la cual es superior a la obtenida en hepatocitos controles.

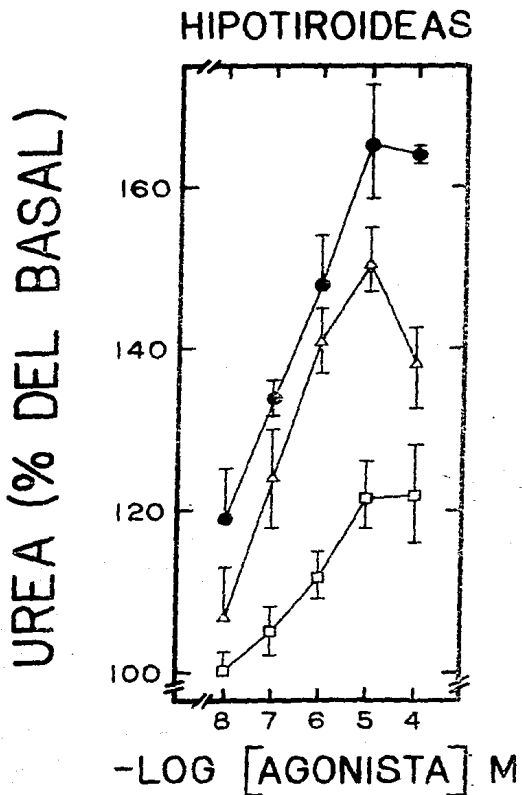


FIG. 7

EFFECTOS DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS POR LA HISTAMINA Y SUS AGONISTAS. Los hepatocitos de ratas hipotiroideas fueron incubados en presencia de histamina (●-●) 2,2 aminoetilthiazol (□-□) o impromidina (△-△). Los resultados se expresan como el porcentaje del valor basal de la síntesis de urea el cual fue de  $33 \pm 2$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo), otras indicaciones están presentadas en el pie de fig. 5.

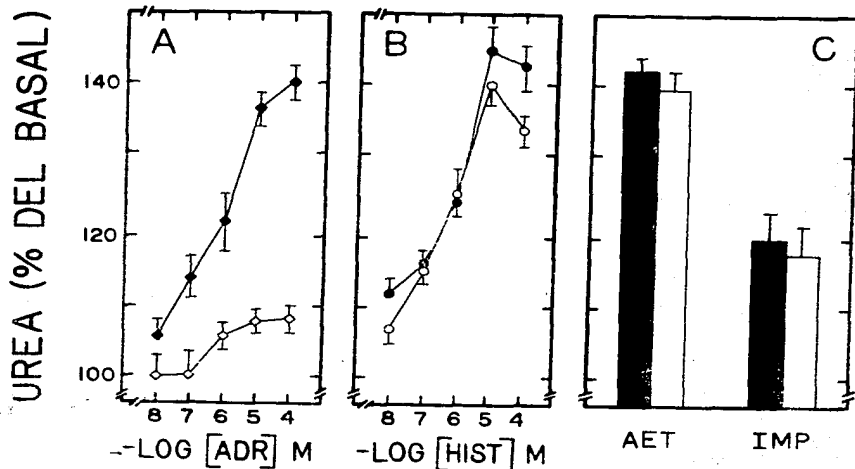


FIG. 8

EFFECTOS DIFERENCIALES DEL PMA SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS POR ACCION ALFA-ADRENERGICA E HISTAMINA Y SUS AGONISTAS. Los hepatocitos fueron incubados en la ausencia (símbolos llenos) ó presencia de  $10^{-7}$ M de PMA (símbolos vacíos) y con diferentes concentraciones de adrenalina +  $10^{-8}$ M de propranolol (ADR) (panel A, rombos) Histamina (HIST) (panel B, círculos),  $10^{-8}$ M 2,2 aminoetiliazol (AET) ó  $10^{-8}$ M de imprimidina (IMP) (panel C). Los resultados se expresan como el porcentaje sobre el valor basal de la síntesis de urea, el cual fue de  $30 \pm 2$  nmoles urea/mg células (peso húmedo). Cada punto es el promedio  $\pm$  su error estándar de 6-8 determinaciones usando diferentes preparaciones de células.

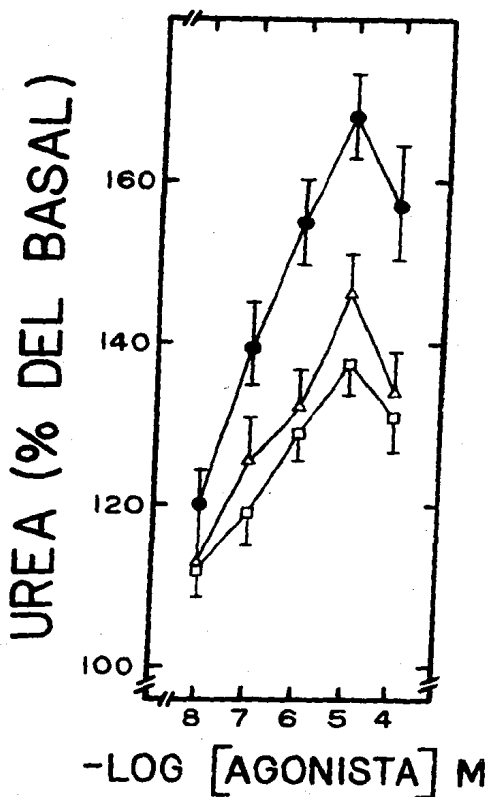


FIG. 9

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON TOXINA PERTUSIS SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UROGENESIS POR LA HISTAMINA Y SUS AGONISTAS. Los hepatocitos fueron incubados en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de histamina (●-●), 2,2 aminoetilthiazol (□-□) ó imipromidina (△-△). Los resultados se expresan como el porcentaje sobre el valor basal de la síntesis de urea el cual fue de 33±2 nmoles de urea/mg células (peso húmedo). Otras indicaciones en el pie de fig. 2.

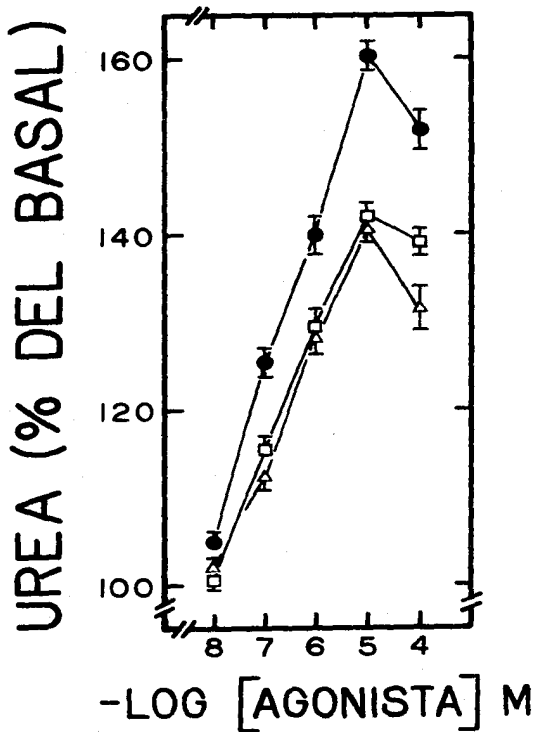


FIG. 10

EFFECTOS DE LA FORSKOLINA SOBRE LA ESTIMULACION DE LA UREOGENESIS POR LA HISTAMINA Y SUS AGONISTAS. Los hepatocitos fueron incubados con diferentes concentraciones de histamina (●-●), 2,2 aminoeiltiazol (□-□) ó impromidina (△-△) en presencia de 10<sup>-7</sup>M de forskolina. Los resultados se expresan como porcentaje del valor basal de la síntesis de urea, el cual fue de 30±1 nmoles/mg células (peso húmedo). Otras indicaciones en el pie de fig. 2.

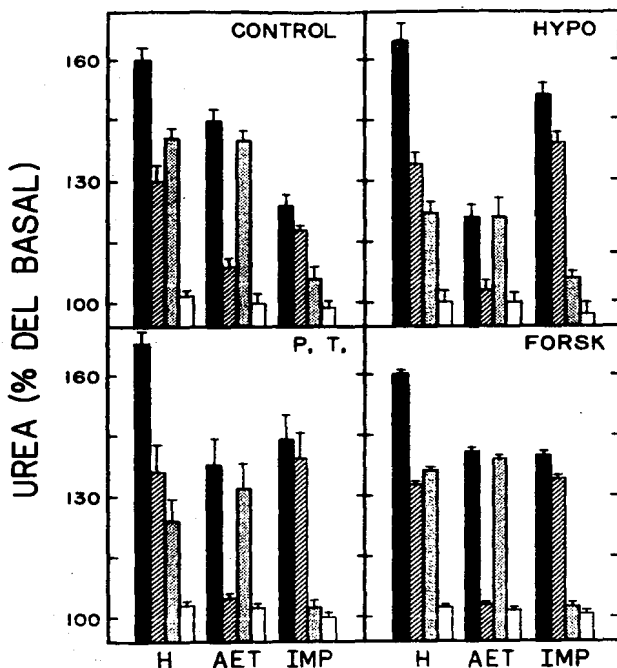


FIG. 11

EFFECTOS Y SELECTIVIDAD DE LA HISTAMINA, SUS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS EN HEPATOCITOS DE RATAS CONTROL (CONTROL) O EN PRESENCIA DE  $10^{-7}M$  DE FORSKOLINA (FORK), HEPATOCITOS OBTENIDOS DE RATAS HIPOTIROIDEAS (HYPO) Y DE RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSIS (P.T.). Los hepatocitos fueron incubados en la presencia de  $10^{-6}M$  de histamina (H),  $10^{-6}M$  del 2,2 aminoetiltiliazol (AET) ó  $10^{-6}M$  de imprimidina (IMP) sin (■) ó con sus antagonistas;  $10^{-6}M$  pirilamina (▨),  $10^{-6}M$  cimetidina (▧) ó  $10^{-6}M$  pirilamina +  $10^{-6}M$  de cimetidina (□). Los resultados se expresan en porcentaje del valor basal de la síntesis de urea, el cual fue para controles  $29 \pm 1$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo), hipotiroideas  $33 \pm 2$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo), toxina pertusis  $33 \pm 2$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo) y  $10^{-7}M$  forskolina  $30 \pm 1$  nmoles de urea/mg células (peso húmedo). Otras indicaciones en el pie de fig. 2.

En base a nuestros datos podemos decir que la acción de la histamina se encuentra mediada por sus dos tipos de receptores  $H_1$  y  $H_2$  para modular el metabolismo hepático.

En otros modelos en donde se conoce el mecanismo de acción de los receptores  $H_1$  se ha observado que se encuentran acoplados al mecanismo de transducción de la fosfolipasa C, mientras que de los receptores  $H_2$  al mecanismo de transducción de la adenilato ciclasa. No hemos estudiado aún el acoplamiento de cada subtipo de receptor ( $H_1$  y  $H_2$ ) a su sistema de transducción. El comportamiento fenomenológico observado sugiere que en hepatocitos, el acoplamiento es similar al observado en otros modelos.



## CONCLUSION

1.- La histamina modula el metabolismo hepático a través de sus receptores  $H_1$  y  $H_2$  histaminérgicos.

2.- La participación de cada tipo de receptor ( $H_1$  y  $H_2$ ) en la acción global de la histamina es variable;

2a) Los datos indican el predominio de la acción mediada por los receptores  $H_1$  en hepatocitos controles. ( $H_1 > H_2$ )

2b) Los datos indican el predominio de la acción mediada por los receptores  $H_2$  en hepatocitos obtenidos de ratas hipotiroides. ( $H_2 > H_1$ )

2c) Los datos indican que en hepatocitos de ratas tratadas con toxina pertusis y en células controles incubadas con forskolina la participación de los receptores  $H_1$  y  $H_2$  es similar ( $H_1 = H_2$ )

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Lehninger, Albert. L. Bioquímica, ediciones Omega, S. A., 2 edición, pag. 728 (1982)
- (2) Meyer H. Frederik, Jawetz Ernest. Manual de Farmacología Clínica, editorial El Manual Moderno, S. A., 3 edición, pag. 202 (1981)
- (3) Douglas, W. W. Histamine and 5-hidroxytryptamine (serotonin) and their antagonists in the Pharmacological Basis of Therapeutics (A. G. Gilman L. S. Goodman and Gilman eds) Macmillan publishing Co., Inc. New York 609-646 (1980)
- (4) Ash. A. S. F. and Schild, H. O. Receptors mediating some actions of histamine Br. J. Pharmacol 27:427-439 (1966)
- (5) Black, J. W. Ducan, W. A.M.; Durant, C. J.; Ganellin and E. M. Parsons, Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptor. Nature 236: 385-390 (1972)
- (6) Hidalgo y Mondragon Ma. del Consuelo. Farmacia Química, editorial Alhambra, S. A., pag. 330-337 (1970)
- (7) Brinblecombe, R. W.; Ducan, W. A. M.; G. J.; Emmett J. C. Characterization and developmet of cimetidine as a histamines H<sub>2</sub>-receptor antagonist. Gastroenterology. 74:339-347 (1978)
- (8) Reilly A. Margaret and Sigg B. Ernest. Suppression of Histamine Induced Adrenocorticotropic Hormona Release by antihistamines and antidepressants. J. Pharmac. and Experimental Therapeutics 233:440-445 (1982).
- (9) Carruther, S. G.; Shoeman. D. W. Hignite, C. E. and Azarnoff D. L. Correlation between plasma diphenhydramine level and sedative and antihistamine effects. Clin. Pharmacol. Ther 23:375-382 (1978)
- (10) Matsumoto Takahiro; Kanaide Hideo. Histamine anantirates H<sub>2</sub>-receptors to induce cytosolic free calcium transients in cultured vasvular smooth muscle cell. From rat Aorta. Biochem. Biophy. Res. Commun. 135:172-177 (1986).
- (11) Brown, R. D.; P. Prenirelle and C. Cain. - adrenergic and H<sub>2</sub>-histamine receptor Control of intracellular Ca<sup>2+</sup> in muscle cell line; the influence of prior agonist exposure on receptor responsiveness. Mol Pharmac. 29:531-539 (1986)
- (12) Dolton, T. D. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physical Rev. 59:706-718 (1979)
- (13) Berridge, M.J.; C.P. Downes and M.R. Hanley. Lithium amplities against. Dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary gland. Biochem. J. 206:587-595 (1982)

- (14) Daum, P. R.; Downes and J.M. Young. Histamine stimulation of inositol 1-phosphate accumulation in Lithium-treated slices from regions of guinea pig brain. *J. Neurochem.* 43:25-32 (1984)
- (15) Villalobos Molina, R. and J. A. Garcia-Sáinz. H<sub>1</sub>-histaminergic activation stimulates phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 90:457-459 (1983)
- (16) Nakahata, N.; N.N. Martin, A. R. Hughes, J. R. Hepler and T. Kendall Harden. H<sub>1</sub>-histamine receptor on human astrocytoma cell. *Mol. Pharmacol.* 29: 188-195 (1986)
- (17) Hegstrad, L. R.; Kanof P. D. and P. Greengard. Histamine sensitive adenylate cyclase in mammalian brain. *Nature (London)* 260:163-165 (1976)
- (18) Kanof, P. D. and P. Greengard. Pharmacological properties of histamine-sensitive adenylate cyclase from guinea pig cardiac ventricular muscle. *Mol. Pharmacol.* 15:445-461 (1979)
- (19) Grund, U. R. Histamine receptors in adipose tissue involvement of cyclic Adenosine Monophosphate and the H<sub>2</sub> receptor in the Lipolytic Response to histamine in isolated canine fat cell. *J. Pharmacol. and Experimental Ther.* 195:176-184 (1975).
- (20) Blackmore, P. E., Dehaye, J. P. and Exton, J. H. Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. *J. Biol. Chem.* 254:6945-6950 (1979)
- (21) Murphy, E., Coll, K. E. Rith, T. L. and Williamson J. R. Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. *J Biol. Chem.* 255:6600-6608 (1980).
- (22) Kimura, S. Kugai, N., Toda, R., Kojima, I., Age, K. and Ogato, E. Sources of calcium mobilized by alpha-adrenergic stimulation in perfused rat liver. *Horm. Metab. Res.* 14:133-138 (1982).
- (23) Shears, S. B. and Kirk, C. J. Determination of mitochondrial calcium content in hepatocytes by a rapid cellular fractionation technique. *Biochem. J.* 219:383-389 (1984).
- (24) Joseph, S. K. and Williamson, J. R. The origin, quantitation and Kinetics of intracellular calcium mobilization by vasopressin and phenylephrine in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259:10425-10432 (1983).
- (25) Michell, R. H. and Kirk, C. J. Why is phosphatidylinositol degraded in response to stimulation of certain receptors, *Trend in Pharmacological Sci.* 2:86-89 (1981).

- (26) Berridge, M. J. and Irvine, R. J. Inositol trisphosphates and calcium mobilization in inositol and phosphoinositides, ed Bleasdale J. E., Eichberg and Hauser G. p 351-366 (1985).
- (27) Nishizuka, Y. The role of protein Kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, (London) 308: 693-698 (1984).
- (28) Rodbell, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284:17-22 (1980).
- (29) Cooper, D. M. F. Schlegel, W., Lin, M. S. and Rodbell, M. The fat cell adenylate cyclase system. *J. Biol. Chem.* 254:8927-8931 (1979).
- (30) Bokoch, G. M., Katada, M. Northup, J. K., Hewlett, E. L. and Gilman, A. G.; Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by Islet-Activating Protein. *J. Biol. Chem.* 258:2072-2075 (1983).
- (31) Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Codina, J., Iyengar, R., Malarck, C. R. and Birnbaumer, L.; Stimulation and inhibition of adenylate cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* 302: 706-709 (1983).
- (32) Smith, S. K. and Limbird, L. E.; Evidence that human platelet alpha-adrenergic receptors coupled to inhibition of adenylate cyclase are not associated with the subunit of adenylate cyclase ADPc-ribosylated by cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 257: 10471-10478 (1982).
- (33) Imoto, M. K. Tusuchie, M. Tanaka, S., Sugiyama and T. Ozawa; Predominance of histamine H<sub>1</sub>-receptors on liver plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 885-889 (1985).
- (34) Wang Ping Na, Fukui Hiroyuk, Matsuoka and Hiroshi Wada.; Determination of the molecular size of hepatic H<sub>1</sub>-receptors by target size analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:593-598 (1986).
- (35) Corvera, S. and Garcia-Sáinz J. A.; Vasopressin and angiotensin II stimulated ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. *Life Sci.* 31: 2493-2498 (1982).
- (36) Corvera, S. and Garcia-Sáinz J. A.;  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes. *European Journal of Pharmacol.* 72:387-390 (1981).
- (37) S. Keepens and H. de Wulf.; The nature of the hepatic receptors involved in Vasopressin-induced glucogenolysis. *Biochem. Biophys. Acta* 588: 63-69 (1979).
- (38) Kneer, N. M., Wagner M. J. and Lardy, H. A., Regulation by

- calcium of hormonal effects on gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 254: 12160-12168 (1979).
- (39) Cárdenas-Tanús, R. J., Huerta-Baena, J. and García-Sáinz, J. A.; Angiotensin II inhibits the accumulation of cyclic AMP produced by glucagon but not its metabolic effects. *FEBS Lett* 143:1-4 (1982).
- (40) Sekura, R. D., F. Fish, C. R. Manclark, B. Meade and Y-L, Zhang. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase.
- (41) Corvera, S., S.M.T. Hernández-Sotomayor and J. A. García-Sáinz. Modulation by thyroid status of cyclic AMP-dependent and Ca-dependent mechanisms of hormone action in rat liver cell. Possible involvement of two different transduction mechanisms in alpha<sub>1</sub>-adrenergic action. *Biochem. Biophys. Acta* 803:95-105 (1984).
- (42) Pushpendran, C. K., S. Corvera and J. A. García-Sáinz. Effect of pertussis toxin on hormonal responsiveness of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 160:198-202 (1983).
- (43) Berry, M. N. and D. S. Friend. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. *J. Cell. Biol.* 43:506-520 (1969).
- (44) Fales, F. W. Glucose (Enzymatic) Standard Methods Clin Chem. 4:101-112 (1963).
- (45) Gutman, I. and H. O. Bergmeyer. UREA in Methods of Enzymatic Analysis. vol. 4 (H. U. Bergmeyer, ed.), Academic Press, New York. 1791-1793 (1974).
- (46) Huerta-Baena, J., R. Villalobos-Molina and J. A. García-Sáinz. Adrenergic responsiveness of liver cells formed after partial hepatectomy; roles of alpha<sub>1</sub> and beta-adrenoceptor. *Biochem. Biophys. Acta* 763:112-119 (1983).
- (47) Corvera, S. J. Huerta-Baena, J. T. Pelton, U. J. Hruby D. Triverdi and J. A. García-Sáinz. Metabolic effects and cyclic AMP levels produced by glucagon, (1-N-alpha-trinitrophenyl)histidine, 12-homoarginine-glucagon and forskolin in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 84:434-441 (1984).
- (48) Corvera, S. and J. A. García-Sáinz. Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. *Life Sci.* 31:2493-2498 (1982).
- (49) Corvera, S. and J. A. García-Sáinz. Hypothyroidism abolishes the glucogenolytic effect of vasopressin, angiotensin II and A-23187 but not that of alpha<sub>1</sub>-adrenergic amines in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 153:366-368 (1983).

- (50) Malbon, C. C., S-Y Li and J. N. Fair. Hormonal activation of glycogen phosphorylase in hepatocytes from hypothyroid rats. *J. Biol. Chem.* 253:8820-8825 (1978).
- (51) Preiksaitis, H. G. and Kunos. Adrenoceptor-mediated activation of liver glycogen phosphorylase: Effects of thyroid state. *Life Sci.* 24:35-42 (1979).
- (52) Preiksaitis, H. G., W. H. Kan and G. Kunos. Decreased  $\alpha_1$ -adrenoceptor responsiveness and density in liver cell of thyroidectomized rats. *J. Biol. Chem.* 257:4321-4327 (1982).
- (53) Storm, H. and C. van Hardeveld. Effects of hypothyroidism on the cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration in rat hepatocytes during rest and following stimulation by noradrenaline or vasopressin. *Biochem. Biophys. Acta* 885:206-215 (1986).
- (54) Cooper, R. H., Coll, K. E. and Williamson, J. R., differential effects of phorbol ester on phenylephrine and vasopressin-induced  $Ca^{2+}$  mobilization in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260:3281-3288 (1985).
- (55) Corvera, S. and García-Sáinz, J. A. Phorbol esters inhibit alpha<sub>1</sub> adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128-1133 (1984).
- (56) García-Sáinz, J. A., R. Villalobos-Molina, S. Corvera, J. Huerta-Bahena, G. Tsujimoto and B. B. Hoffman. Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 112:393-397 (1985).
- (57) Corvera, S., K. R. Schwarz, R. M. Graham and J. A. García-Sáinz. Phorbol esters inhibit alpha<sub>1</sub>-adrenergic effects and decrease the affinity of liver alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors for (-) ephedrine. *J. Biol. Chem.* 261:520-526 (1986).
- (58) Lynch, C. J., r. Charest, S. B. Bocckino, J. H. Exton and P. F. Blackmore. Inhibition of hepatic  $\alpha_1$ -adrenergic effects and binding by phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* 260:2844-2851 (1985).
- (59) Van de Werve, G., J. Proietto and B. Jeanrenaud. Control of glycogen phosphorylase interconversion by phorbol esters, diacylglycerols,  $Ca^{2+}$  and hormones in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 231:511-516 (1985).
- (60) García-Sáinz, J. A. Decreased sensitivity to alpha<sub>2</sub>-adrenergic amines adenosine and prostaglandins in white fat cell from hamster treated with pertussis vaccine. *FEBS Lett.* 126:306-308 (1981).
- (61) Vi, M. Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for

functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends in Pharm. Sci.* 5:277-279 (1984).

- (62) García-Sáinz, J. A. Effect of pertusis toxin on the hormonal responsiveness of different tissues in *Pertusis Toxins* (R. Sekura, J. Moss and M. Vaughan, eds.). Academic Press 205-233 (1985).
- (63) Heyworth, C. M., E. M. Hansky and M. D. Houstlay. Islet-activating protein blocks glucagon desensitization in intact hepatocytes. *Biochem. J.* 222:189-194 (1984).
- (64) Lynch, C. J., V. Prpic, P.F. Blackmore and J. H. Exton. Effect of islet-activating pertusis toxin on the binding characteristics of  $Ca^{2+}$ -mobilizing hormones and on agonist activation of phosphorylase in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 29:196-203 (1985).
- (65) Seamon, K. B., W. Padgett and J. W. Daly. Forskolin: a unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3363-3367 (1981).
- (66) Litosch, I., T. H. Hudson, I. Mills, S-Y. Li and J. N. Fain. Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. *Mol. Pharm.* 22:109-115 (1982).
- (67) Pushpendran, C. K., S. Corvera and J. A. García-Sáinz. Forskolin magnifies the beta-adrenergic responsiveness of rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 33:3089-3101 (1984).

## Effects of Histamine on the Metabolism of Isolated Rat Hepatocytes: Roles of H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-Histamine Receptors

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ, M. CARMEN DE LA GARZA, JUAN LUIS CONTRERAS-RODRÍGUEZ, and ARTURO NÁJERA-ALVARADO

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular (J.A.G.-S., M.C.d.I.G., J.L.C.-R., A.N.-A.), and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (J.L.C.-R., A.N.-A.), Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, 04510 México D.F., México

Received September 22, 1986; Accepted December 17, 1986

### SUMMARY

In isolated rat hepatocytes histamine stimulates in a dose-dependent fashion three of the major metabolic pathways: glycogenolysis (70–80% increase over basal), gluconeogenesis from lactate (50–60%), and ureagenesis (50–60%). It was observed that both H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors mediate the action of histamine and that, in control hepatocytes, the H<sub>1</sub>-mediated action predominates over the H<sub>2</sub>. The H<sub>1</sub>-mediated effect diminished in the absence of extracellular calcium, whereas the H<sub>2</sub>-mediated action did not. Interestingly, in hepatocytes from hypothyroid rats, the H<sub>2</sub> action increased and the H<sub>1</sub>-mediated effect decreased as compared to those in the controls, with an inversion in efficacy

(i.e., H<sub>1</sub> > H<sub>2</sub> in the controls and H<sub>2</sub> > H<sub>1</sub> in cells from hypothyroid rats). Furthermore, it was observed that pertussis toxin treatment and forskolin both enhance the H<sub>2</sub>-mediated effects without altering the H<sub>1</sub>-mediated actions of histamine (i.e., H<sub>1</sub> ≈ H<sub>2</sub>). The active phorbol ester, phorbol 12-myristate 13-acetate, did not alter the effect of the autacoid. In summary, the data show that histamine modulates liver metabolism through H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. The relative importance of the two receptor types in mediating the actions of histamine varies depending on the specific conditions used.

Histamine is one of the so-called local hormones or autacoids. Its role in anaphylaxis and allergy has been known for more than 75 years, and the important role of histamine in the maintenance of homeostasis is increasingly being recognized (see Ref. 1 for a review). The action of histamine is initiated by its interaction with specific receptors located on the external surface of the plasma membrane. Two types of receptors for histamine have been clearly differentiated: the H<sub>1</sub> and the H<sub>2</sub> receptors (2, 3). It has been observed, in a variety of models, that the H<sub>1</sub> receptors are coupled to phosphoinositide turnover and calcium signaling (4–8), whereas the H<sub>2</sub> receptors are coupled to adenylate cyclase in an activatory fashion (9, 10).

Recently, Imoto *et al.* (11) reported the presence of a large number of H<sub>1</sub>-histamine receptors in liver membranes. However, there is no information about the action(s) of histamine on liver metabolism. This prompted us to study whether histamine has any action on the major metabolic pathways of this organ, the receptor(s) involved, and their modulation. The results of this study are the subject of the present report.

### Materials and Methods

Urease, peroxidase, glucose oxidase, glutamine, ornithine, pyrilamine, histamine, (–)-epinephrine, *dl*-propranolol, PMA, and 6-*n*-

propyl-2-thiouracil were obtained from Sigma Chemical Co. Forskolin (7β-acetoxo-8,13 epoxy-1α,6β,9α-trihydroxy-1abd-14-en-11-one) was obtained from Calbiochem. Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates by the method of Sekura *et al.* (12). Cimetidine, impromidine, and AET were generous gifts from Smith Kline and French. Collagenase was obtained from Cooper Biomedical.

Female Wistar rats (200–250 g) were used. The animals were fed *ad libitum* for the studies of ureagenesis and glycogenolysis and were fasted for 24 hr in those of gluconeogenesis. In some experiments hypothyroid animals were used; hypothyroidism was induced by giving the animals water containing 0.030% 6-*n*-propyl-2-thiouracil for 40–50 days and was assessed by decreased weight gain, dryness of the fur, and decreased levels of triiodothyronine (13). When pertussis toxin was used, it was administered intraperitoneally (50 μg/100 g) to the animals 3 days before the experiment was performed (14).

Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (15) and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer saturated with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%:5%), pH 7.4, at 37°. In some experiments no CaCl<sub>2</sub> was added to the buffer; the amount of calcium in this buffer was in the range of 10–40 μM (due to contamination of the reagents and water) as determined by atomic absorption spectroscopy; 25 μM EGTA was added to it. To determine the rate of glycogenolysis, cells obtained from fed animals were incubated for 60 min and reactions were stopped by cooling the cell suspensions in ice water. The cell suspensions were centrifuged for 1 min at top speed in a clinical centrifuge and glucose was determined in the supernatant by the glucose oxidase procedure

This work was partially supported by a grant from Fundación Miguel Alemán.

**ABBREVIATIONS:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; AET, 2-(2-aminoethyl)-thiazole; EGTA, ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid.



(16). For the study of gluconeogenesis, the same procedure as described above for glycogenolysis was employed, but cells were obtained from 24-hr fasted rats, and 10 mM lactate was added to the incubation medium; glucose production from endogenous substrates accounted for 10–20% of the total production and was subtracted from the values obtained in the presence of lactate. For the study of ureogenesis, the incubation medium was supplemented with 10 mM glutamine and 2 mM ornithine. After 60-min incubations, urea was determined enzymatically in cell supernatants (17).

## Results and Discussion

Histamine stimulated in a dose-dependent fashion three of the major metabolic pathways of liver cells: ureagenesis (Fig. 1A), gluconeogenesis (Fig. 1B), and glycogenolysis (Fig. 1C). The  $EC_{50}$  for histamine for glycogenolysis and gluconeogenesis ( $150 \pm 80$  nM) was similar to the  $EC_{50}$  for ureagenesis ( $270 \pm 70$  nM). These  $EC_{50}$  values are within the range observed in other systems (4–10). The maximal stimulations produced were 40–60% for ureagenesis, 50–60% for gluconeogenesis from lactate, and 80–100% for glycogenolysis. Such stimulations are bigger or within the range of those produced by other hormones such as adrenaline (18) or glucagon (19). Ureagenesis was preferred as metabolic parameter for all of the following studies; similar data were obtained when the other metabolic pathways were studied in preliminary experiments. In Fig. 2, urea production as a function of the time of incubation, in the absence and presence of 10  $\mu$ M histamine, is presented. It can be observed that urea synthesis was proportional to the time of incubation and that histamine increased the rate of ureagenesis (Fig. 2). A small but consistent stimulation was observed at 10 min ( $109 \pm 0.5\%$  of basal); however, longer incubations were preferred (60 min) because the magnitude of the effect was bigger and more easily detected.

It has been observed that, to produce a sustained effect, the action of some hormones depends on the presence of extracellular calcium whereas that of other hormones does not (20). The extracellular calcium dependency of histamine action was examined. It was observed that, in the absence of calcium plus 25  $\mu$ M EGTA, the ureagenic action of histamine was markedly reduced (to approximately 30% of its effect in the presence of calcium) but, interestingly, it was not abolished (Fig. 3). In these experiments the  $EC_{50}$  values for histamine were  $290 \pm 75$  nM and  $390 \pm 100$  nM in the presence and absence of calcium, respectively.

In order to determine the type of histamine receptor that

mediates the actions of the autacoid, the selective antagonists pyrilamine ( $H_1$ ) and cimetidine ( $H_2$ ) were used. Surprisingly, it was observed that both antagonists inhibited in a dose-dependent fashion the effect of histamine, but neither blocked it completely (Fig. 4). Pylarilamine was more potent and effective than cimetidine, i.e., pyrilamine blocked 60% of the effect of histamine, whereas cimetidine blocked the effect only 30% (Fig. 4). The possibility that both  $H_1$  and  $H_2$  receptors could mediate the effect of histamine was considered. To test this hypothesis the effects of histamine in the presence of a fixed concentration of one of the antagonists was studied. The effect of 10  $\mu$ M histamine plus 1  $\mu$ M cimetidine was blocked by increasing concentrations of pyrilamine (Fig. 4). Similarly, the effect of 10  $\mu$ M histamine plus 1  $\mu$ M pyrilamine was antagonized by cimetidine (Fig. 4). The antagonists were without effect on basal ureagenesis at the concentrations tested (not shown). The data indicated two points: first, that both  $H_1$  and  $H_2$  receptors mediate the actions of histamine in liver cells, and, second, that the  $H_1$ -mediated action predominates over the  $H_2$ -mediated effect.

In order to confirm this observation, the effect of selective  $H_1$  (AET) and  $H_2$  (impromidine) agonists was studied. AET stimulated ureagenesis  $\approx 40\%$  over basal whereas impromidine did so to a much lesser extent ( $\approx 20\%$  over basal) (Fig. 5). The effect of the  $H_1$  agonist AET was inhibited by the  $H_1$  antagonist pyrilamine but not by cimetidine (Fig. 6). In contrast, the stimulation of ureagenesis induced by the  $H_2$  agonist impromidine was blocked by cimetidine but not by pyrilamine (Fig. 6). The data illustrate the selectivity of the agents employed and confirm the findings described above, i.e., that both  $H_1$  and  $H_2$  receptors mediate the actions of histamine, that the  $H_1$ -mediated effect is predominant, and that the actions are additive (see Figs. 4–6). Interestingly, the effect of the selective  $H_1$  agonist, AET, was markedly reduced in cells incubated in the absence of calcium plus 25  $\mu$ M EGTA, whereas the action of impromidine ( $H_2$  agonist) was not affected by the absence of the cation (results not shown).

In the following experiments, we tried to determine whether the relative participation of the two histamine receptor types in mediating the action of the autacoid was constant or whether it showed plasticity. Four conditions were explored: the action of the active phorbol ester PMA, hypothyroidism, pertussis toxin treatment, and the effect of forskolin.

The active phorbol ester, PMA, blocks the  $\alpha_1$ -adrenergic

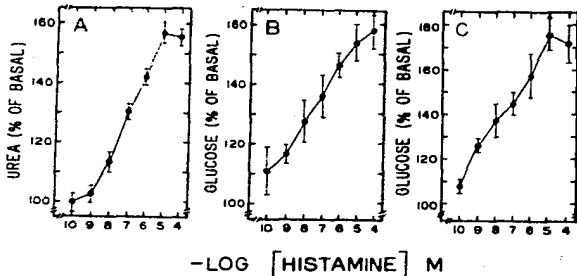


Fig. 1. Effect of histamine on ureagenesis, gluconeogenesis, and glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated as described under Materials and Methods in the absence or presence of different concentrations of histamine, and ureagenesis (A), gluconeogenesis from lactate (B), and glycogenolysis (C) were determined. Results are expressed as percentage of basal values which were  $26 \pm 2$  nmol/mg of cell wet weight for ureagenesis,  $15 \pm 1$  nmol/mg of cells wet weight for gluconeogenesis from lactate, and  $44 \pm 2$  nmol/mg of cell wet weight for glycogenolysis. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of 10–15 determinations using different cell preparations.

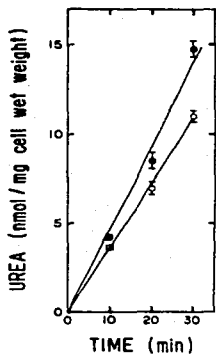


Fig. 2. Time course of the effect of histamine on urea synthesis. Hepatocytes were incubated in the absence (O) or presence (●) of  $10^{-5}$  M histamine. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of six determinations using different cell preparations.

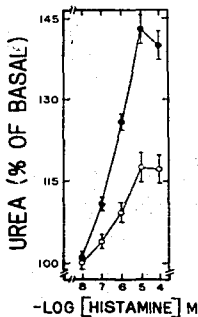


Fig. 3. Effect of extracellular calcium on the stimulation of ureagenesis induced by histamine. Hepatocytes were incubated in regular Krebs-Ringer bicarbonate buffer (1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (●) or buffer without  $\text{CaCl}_2$  supplemented with  $25 \mu\text{M}$  EGTA (O) in the absence or presence of different concentrations of histamine. Results are expressed as percentage of basal values which were  $28 \pm 2$  nmol/mg of cell wet weight in regular buffer and  $20 \pm 2$  nmol/mg of cells wet weight in buffer without calcium containing  $25 \mu\text{M}$  EGTA. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of four determinations using different cell preparations.

action in hepatocytes (21–26). We studied the effect of PMA on the stimulation of ureagenesis by histamine and the selective agonists AET and impromidine (Fig. 7). PMA was without effect on the stimulation of ureagenesis by the histamine agonists, whereas the  $\alpha_1$ -adrenergic action of adrenaline was clearly blocked (Fig. 7). The data indicate that the responsiveness of liver cells to histamine is not modulated through the activity of protein kinase C. It is important to mention that Orellana *et al.* (27) observed in cultured astrocytoma cells that PMA blocks both carbachol- and histamine-stimulated inositol phos-

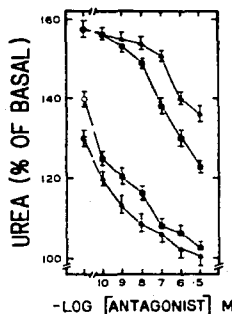


Fig. 4. Effect of pyrilamine ( $\text{H}_1$ -antagonist) and cimetidine ( $\text{H}_2$ -antagonist) on the stimulation of ureagenesis induced by histamine. Hepatocytes were incubated in the presence of  $10^{-5}$  M histamine (●),  $10^{-5}$  M histamine +  $10^{-5}$  M cimetidine (O), or  $10^{-5}$  M histamine +  $10^{-5}$  M pyrilamine (■) alone or with different concentrations of pyrilamine (■) or cimetidine (Δ). Results are expressed as percentage of basal ureagenesis which was  $29 \pm 1$  nmol/mg of cells wet weight. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of eight determinations using different cell preparations.

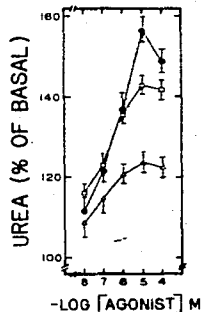


Fig. 5. Effect of histamine, AET, and impromidine on ureagenesis in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of different concentrations of histamine (●), AET (□), and impromidine (Δ).

phate formation. These authors (27) suggested that in these cells phorbol esters may act on some component of the transduction rather than the receptors. Interestingly, the action of PMA in liver cells shows more selectivity (Refs. 21–26 and present paper).

It has been observed that in hepatocytes from hypothyroid rats the effects of agents that act through stimulation of adenylate cyclase such as  $\beta$ -adrenergic agonists or glucagon are greatly enhanced (13, 28–30), whereas the actions of those agents that act through calcium signaling are markedly diminished (13, 27, 31, 32). Taking into account these findings, the effect of the histamine agonists was tested in hepatocytes obtained from hypothyroid rats. Interestingly, it was observed

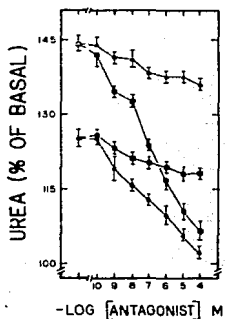


Fig. 6. Effect of the antagonists pyrillamine and cimetieline on the stimulation of ureagenesis induced by AET and impromidine. Hepatocytes were incubated in the presence of  $10^{-5}$  M AET (□) or  $10^{-5}$  M impromidine (△) alone or with different concentrations of pyrillamine (■) or cimetieline (▲). Other indications are as in Fig. 3.

that in these cells the  $H_2$  agonist, impromidine, was more effective than the  $H_1$  agonist, AET (Fig. 8). Again, the effect of histamine seemed to be the addition of both  $H_1$  and  $H_2$  actions (Fig. 8). In other words, the data indicate that in cells from hypothyroid rats the  $H_1$  action is markedly diminished as compared to that in the control cells, whereas the  $H_2$  action is enhanced (Fig. 8).

Pertussis toxin, an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, catalyzes the ADP-ribosylation of the  $\alpha$  subunit of the guanine nucleotide-binding regulatory protein involved in inhibition of adenylate cyclase ( $N_i$ ) (33). It has been observed that such covalent modification of  $N_i$  blocks the action of agents that inhibit adenylate cyclase and enhances the action of agents that stimulate this enzyme (reviewed in Refs. 33 and 34). In hepatocytes, it has been shown that treatment with pertussis toxin blocks the action of angiotensin II on adenylate cyclase (35), enhances the accumulation of cyclic AMP produced by  $\beta$ -adrenergic agonist and glucagon (14, 36), and has no effect on

the action of agents that act through phosphoinositide turnover and calcium signaling (14, 35, 37, 38). The effect of pertussis toxin on the action of histamine is presented in Fig. 9. It can be observed that in cells from rats treated with the toxin, the  $H_2$ -mediated effect is increased whereas the  $H_1$ -mediated effect is not altered as compared to the effects observed in the controls (compare Figs. 9 and 5).

Forskolin is a diterpene derivative found in the Indian plant *Coleus forskohli*. It has been elegantly shown by Seamon et al. (39) that this agent activates adenylate cyclase both in membranes and intact cells. Interestingly, low concentrations (10–100 nM) of this diterpene, which, by itself does not stimulate cyclic AMP accumulation, magnify the action of agents that stimulate adenylate cyclase such as  $\beta$ -adrenergic agonists, both in fat (40) and liver cells (41). Forskolin also enhanced the  $H_2$ -mediated action of histamine in liver cells (Fig. 10). The diterpene was without effect on basal ureagenesis at this concentration (not shown; see Ref. 41).

Imoto et al. (11) showed that the number of [ $^3$ H]pyrilamine-binding sites (putatively  $H_1$ -histamine receptors) is very large (around 4700 fmol/mg of membrane protein) and also detected a small number of  $H_2$ -histamine receptors in liver membranes. The liver contains many cells in addition to hepatocytes and, therefore, membranes obtained from this organ could contain those from nonparenchymal cells. However, our results are totally consistent with the findings of Imoto et al. (11) and indicate that the receptors detected by these authors have functional significance in hepatocytes, especially considering that ureagenesis is a pathway that occurs predominantly in liver cells. Our data also showed consistency with the findings of Imoto et al. (11) in indicating the predominance of the  $H_1$ -over the  $H_2$ -histamine action. In other models the  $H_1$ -histamine receptor is coupled to calcium signaling, whereas the  $H_2$ -histamine is linked to activation of adenylate cyclase (4–10). The results with hepatocytes from hypothyroid rats could be consistent with the observation that, in these cells, the actions of agent that stimulate adenylate cyclase are enhanced, whereas those involving calcium signaling are decreased (13, 28–32). Similarly, the effects of pertussis toxin and forskolin are consistent with the involvement of adenylate cyclase stimulation in the  $H_2$ -mediated action of histamine. However, the coupling

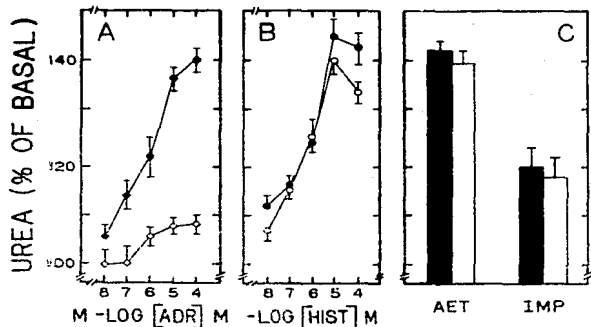


Fig. 7. Differential effect of PMA on the stimulation of ureagenesis by  $\alpha_1$ -adrenergic and histamine agonists. Hepatocytes were incubated in the absence (● (A), ● (B), ● (C)) or presence of  $10^{-7}$  M PMA (○ (A), ○ (B), ○ (C)) and with different concentrations of epinephrine +  $10^{-5}$  M propranolol (ADR) (A, ◆, ◊) histamine (HIST) (B, ●, ○), and  $10^{-5}$  M AET or  $10^{-5}$  M impromidine (IMP) (C). Results are expressed as percentage of basal ureagenesis which was  $30 \pm 2$  nmol/mg of cells wet weight. Plotted are the means  $\pm$  standard errors of six to eight determinations using different cell preparations.

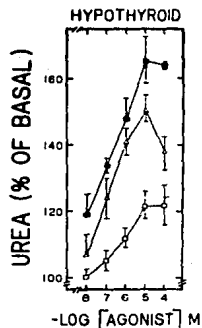


Fig. 8. Effect of hypothyroidism on the stimulation of ureagenesis by histamine agonists. Hepatocytes from hypothyroid rats were incubated in the absence or presence of histamine (●), AET (□), or impropidine (Δ). Results are expressed as percentage of basal ureagenesis which was  $33 \pm 2$  nmol/mg of cells wet weight. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of seven to eight determinations using different cell preparations.

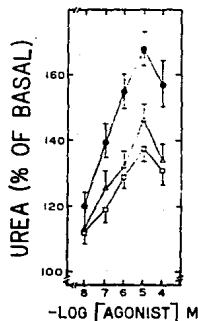


Fig. 9. Effect of pertussis toxin treatment on the stimulation of ureagenesis by histamine agonists. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of different concentrations of histamine (●), AET (□), or impropidine (Δ). Basal ureagenesis was  $33 \pm 2$  nmol/mg cells wet weight. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of seven to eight experiments using different cell preparations.

of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors to their transduction systems (adenylate cyclase and phospholipase C) remains to be directly demonstrated in this cell type. Furthermore, changes at the receptor level (number and/or affinity) may occur during hypothyroidism or pertussis toxin treatment. These aspects are currently being investigated in our laboratory.

In summary, the data clearly indicate, for the first time, the ability of histamine to modulate hepatic metabolism through both H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-histamine receptors. Furthermore, it is shown that the H<sub>1</sub>-mediated action predominates in control hepatocytes, whereas the H<sub>2</sub>-mediated action predominates in hepatocytes obtained from hypothyroid animals; forskolin and pertussis toxin treatment enhance the H<sub>2</sub>-mediated effects. The

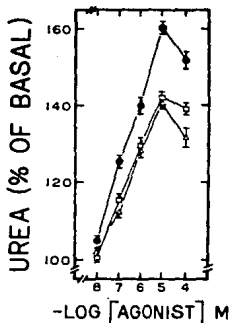


Fig. 10. Effect of forskolin on the stimulation of ureagenesis by histamine agonists. Hepatocytes were incubated in the presence of  $10^{-6}$  M forskolin and with different concentrations of histamine (●), AET (□), or impropidine (Δ). Basal ureagenesis was  $30 \pm 1$  nmol/mg of cells wet weight. Plotted are the means and standard errors (vertical lines) of seven to eight determinations using different cell preparations.

latter results clearly indicate that there is plasticity in the receptor type that mediates the effects of histamine.

#### Acknowledgments

The authors thank Mrs. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript.

#### References

- Douglas, W. W. Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A. G. Gilman, L. S. Goodman, and A. Gilman, eds.), Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 609-646 (1980).
- Ash, A. S., and H. O. Schild. Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmacol.* 27:427-439 (1966).
- Black, J. W., W. A. M. Duncan, C. J. Durant, C. R. Ganellin, and E. M. Parsons. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Nature (Lond.)* 236:385-390 (1972).
- Berridge, M. J., C. P. Downes, and M. R. Hanley. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol response in brain and salivary glands. *Biochem. J.* 206:587-595 (1982).
- Villalobos-Molina, R., and J. A. Garcia-Sáinz. H<sub>1</sub>-histaminergic activation stimulates phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 90:457-459 (1983).
- Daum, P. R., C. P. Downes, and J. M. Young. Histamine stimulation of inositol 1-phosphate accumulation in lithium-treated slices from regions of guinea pig brain. *J. Neurochem.* 43:25-32 (1984).
- Brown, R. D., P. Prendiville, and C. Cain.  $\alpha_1$ -Adrenergic and H<sub>1</sub>-histamine receptor control of intracellular Ca<sup>2+</sup> in a muscle cell line: the influence of prior agonist exposure on receptor responsiveness. *Mol. Pharmacol.* 29:531-539 (1986).
- Nakahata, N., M. W. Martin, A. R. Hughes, J. R. Hepler, and T. K. Harden. H<sub>1</sub>-Histamine receptors on human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* 29:198-195 (1986).
- Hegstrand, L. R., E. D. Kanof, and P. Greengard. Histamine-sensitive adenylylase cyclase in mammalian brain. *Nature (Lond.)* 260:163-165 (1976).
- Kanof, P. D., and P. Greengard. Pharmacological properties of histamine-sensitive adenylylase cyclase from guinea pig cardiac ventricular muscle. *Mol. Pharmacol.* 18:445-461 (1979).
- Imoto, M., K. Tsuchie, M. Tanaka, S. Sugiyama, and T. Ozawa. Predominance of histamine H<sub>1</sub> receptors on liver plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:865-869 (1985).
- Sekura, R. D., F. Fish, C. R. Manclark, B. Meade, and Y.-L. Zhang. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268:14647-14651 (1993).
- Corveza, S., S. M. T. Hernández-Sotomayor, and J. A. Garcia-Sáinz. Modulation by thyroid status of cyclic AMP-dependent and Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of hormone action in rat liver cells. Possible involvement of two different transduction mechanisms in alpha<sub>1</sub>-adrenergic action. *Biochim. Biophys. Acta* 803:95-105 (1984).
- Pushpendran, C. K., S. L. Corveza, and J. A. Garcia-Sáinz. Effect of pertussis

- toxin on hormonal responsiveness of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **160**:198-202 (1983).
15. Berry, M. N., and C. S. Friend. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**:506-520 (1969).
  16. Fales, F. W. Glucose (enzymatic). *Stand. Methods Clin. Chem.* **4**:101-112 (1963).
  17. Guttman, I., and H. U. Bergmeyer. Urea, in *Methods of Enzymatic Analysis*, (H. U. Bergmeyer, ed.), Vol. 4. Academic Press, New York, 1791-1793 (1974).
  18. Huerta-Bahena, J., R. Villalobos-Molina, and J. A. García-Sáinz. Adrenergic responsiveness of liver cells formed after partial hepatectomy: roles of alpha- and beta-adrenoceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **763**:112-119 (1983).
  19. Corvera, S., J. Huerta-Bahena, J. T. Felton, V. J. Hruby, D. Trivedi, and J. A. García-Sáinz. Metabolic effects and cyclic AMP levels produced by glucagon, (1-*N*-alpha-trinitrophenylhistidine, 12-homoarginine)-glucagon, and forskolin in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **84**:434-441 (1984).
  20. Corvera, S., and J. A. García-Sáinz. Vasopressin and angiotensin II stimulate ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production. *Life Sci.* **31**:2493-2498 (1982).
  21. Corvera, S., and J. A. García-Sáinz. Phorbol esters inhibit alpha<sub>1</sub>-adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**:1128-1133 (1984).
  22. García-Sáinz, J. A., R. Villalobos-Molina, S. Corvera, J. Huerta-Bahena, G. Tsujimoto, and B. B. Hoffman. Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **112**:393-397 (1985).
  23. Corvera, S., K. R. Schwarz, R. M. Graham, and J. A. García-Sáinz. Phorbol esters inhibit alpha<sub>1</sub>-adrenergic effects and decrease the affinity of liver alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors for (-) epinephrine. *J. Biol. Chem.* **261**:520-526 (1986).
  24. Cooper, R. H., K. E. Coll, and J. R. Williamson. Differential effects of phorbol ester on phenylephrine and vasopressin-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**:3231-3238 (1985).
  25. Lynch, C. J., R. Charest, S. B. Bockino, J. H. Exton, and P. F. Blackmore. Inhibition of hepatic alpha<sub>1</sub>-adrenergic effects and binding by phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* **260**:2844-2851 (1985).
  26. Van de Werpe, G. J., Proietto, and B. Jeanraud. Control of glycogen phosphorylase interconversion by phorbol esters, diacylglycerols, Ca<sup>2+</sup> and hormones in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **231**:511-516 (1985).
  27. Orellana, S. A., P. A. Solski, and J. H. Brown. Phorbol ester inhibits phosphocystidate hydrolysis and calcium mobilization in cultured astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **260**:5236-5239 (1985).
  28. Corvera, S., and J. A. García-Sáinz. Hypothyroidism abolishes the glycogenolytic effect of vasopressin angiotensin II and A-23187 but not that of alpha<sub>1</sub>-adrenergic amines in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **153**:366-368 (1983).
  29. Malbon, C. C., S.-Y. Li, and J. N. Fain. Hormonal activation of glycogen phosphorylase in hepatocytes from hypothyroid rats. *J. Biol. Chem.* **263**:8090-8093 (1978).
  30. Preikaitis, H. G., and G. Kunos. Adrenoceptor-mediated activation of liver glycogen phosphorylase: effects of thyroid state. *Life Sci.* **24**:35-42 (1979).
  31. Preikaitis, H. G., W. H. Kan, and G. Kunos. Decreased alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor responsiveness and density in liver cells of thyroidectomized rats. *J. Biol. Chem.* **257**:4321-4327 (1982).
  32. Storm, H., and C. van Hardevel. Effect of hypothyroidism on the cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in rat hepatocytes during rest and following stimulation by noradrenaline or vasopressin. *Biochim. Biophys. Acta* **885**:206-215 (1986).
  33. Ui, M. Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* **5**:277-279 (1984).
  34. García-Sáinz, J. A. Effect of pertussis toxin on the hormonal responsiveness of different tissues, in *Pertussis Toxins* (R. Sekura, J. Moss, and M. Vaughan, eds). Academic Press, New York, 205-223 (1985).
  35. Pobiner, B. F., E. L. Hewlett, and J. C. Garrison. Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**:16200-16209 (1985).
  36. Heyworth, C. M., E. M. Hansky, and M. D. Houslay. Islet-activating protein blocks glucagon desensitization in intact hepatocytes. *Biochem. J.* **222**:189-194 (1984).
  37. Johnson, R. M., P. A. Connelly, R. B. Siak, B. F. Pobiner, E. L. Hewlett, and J. C. Garrison. Pertussis toxin or phorbol 12-myristate 13-acetate can distinguish between epidermal growth factor- and angiotensin-stimulated signals in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2032-2036 (1986).
  38. Lynch, C. J., V. Prpic, P. F. Blackmore, and J. H. Exton. Effect of islet-activating pertussis toxin on the binding characteristics of Ca<sup>2+</sup>-mobilizing hormones and on agonist activation of phosphorylase in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **29**:196-203 (1985).
  39. Seamon, K. B., W. Padgett, and J. W. Daly. Forskolin: a unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3363-3367 (1981).
  40. Litoch, I., T. H. Hudson, I. Mills, S.-Y. Li, and J. N. Fain. Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. *Mol. Pharmacol.* **22**:109-115 (1982).
  41. Pushpendran, C. K., S. Corvera, and J. A. García-Sáinz. Forskolin magnifies the beta<sub>1</sub>-adrenergic responsiveness of rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **33**:3099-3102 (1984).

Send reprint requests to: Dr. J. García-Sáinz, IFC, UNAM, Apartado Postal 70-248, 04510 Mexico, D.F.