

116



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA HISTAMINA SOBRE LA PRODUCCION DE COLAGENASAS Y ACTIVADOR DE PLASMINOGENO TIPO UROGINASA EN LAS LINEAS CELULARES HeLa DE ADENOCARCINOMA DE CERVIX UTERINO Y WRL-68 DE EPITELIO HEPATICO

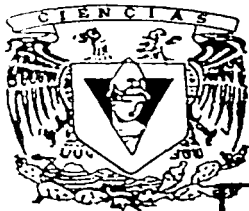
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FRANCISCO RAFAEL JURADO LEON



DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA

RECORD DE TESIS
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE TESIS DE GRADUACION

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Efecto de la histamina sobre la producción de colagenasas y activador de plasminógeno
tipo urocinasa en las líneas celulares HeLa de adenocarcinoma de cervix uterino y WRL-68
de epitelio hepático.

realizado por Francisco Rafael Jurado León

con número de cuenta 8532329-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza

Propietario Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Propietario Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

Suplente M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Suplente Dra. Maria de Lourdes Rodríguez Fragoso

Jorge A. Reyes Esparza
LAH

Miguel Angel Meneses Pérez

Ana Rosa Flores Márquez
Maria de Lourdes Rodríguez Fragoso

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Patricia Ramos Morales
Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**Dedico esta tesis a mis padres
Lumi y Miguel
como un pequeño agradecimiento al
apoyo total que siempre me han dado.**

Agradezco a mis sinodales Dr. Luis Alonso Herrera, M. en C. Ana Rosa Flores y Biol. Miguel Angel Meneses por la cuidadosa revisión de la tesis y sus valiosas sugerencias, a la Dra. Lourdes Rodríguez por su valiosa colaboración desde el inicio de este trabajo y especialmente al Dr. Jorge Reyes por sus invaluable enseñanzas y consejos en todos los ámbitos, no sólo en el académico, así como su disposición y su ayuda.

Agradezco también a mis amigos de la Facultad por su cariño, sus consejos y sus ejemplos, principalmente a Gume, Mauro, Lalo, Ruben, Rafael, Alejandro y los 3 fantásticos; Claudia, Marco y Ulises.

A mis hermanos Liyi y Miguel por su afecto y cuidado.

Y en especial a mi amada esposa Artemisa por su amor y dedicación, y por ser ahora junto con nuestro retoño, la luz que ilumina mis días.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
Antecedentes	9
Hipótesis	20
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
METODOLOGÍA	22
Cultivos Celulares	22
Obtención de los extractos celulares y del medio de cultivo condicionado	23
Actividad proteolítica	24
Cuantificación mediante inmunoensayo	25
Análisis de datos	26
RESULTADOS	28
Efecto de la Histamina Sobre la Producción de Colagenasa IV por Células HeLa	28
Cuantificación de colagenasa IV en células HeLa	28
Actividad Proteolítica de colagenasa IV inducida por histamina en células HeLa	31
Efecto de la Histamina Sobre la Producción de Colagenasa IV por Células WRL-68	34
Cuantificación de la colagenasa IV inducida por histamina en células HeLa	34
Actividad Proteolítica inducida por hista- mina de colagenasa IV en células WRL-68	36
Efecto de la Histamina Sobre la Producción del Activador de Plasminógeno tipo urócinasa por Células HeLa	38
Cuantificación del Activador de Plasminó-	

geno tipo urocinasa inducido por histamina en células HeLa.....	38
Actividad del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa inducido por histamina en células HeLa.....	39
Efecto de la Histamina Sobre la Producción del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa por Células WRL-68	41
Cuantificación del Activador de Plasminó- geno tipo urocinasa inducido por histamina en células WRL-68.....	41
Actividad del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa en células WRL-68.....	43
ANÁLISIS DE DATOS.....	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	57
LITERATURA CITADA	58

RESUMEN

La degradación de la matriz extracelular mediante proteólisis juega un papel primordial en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como la remodelación del tejido, la migración y la invasividad celular.

La producción de proteasas es muy importante para células cancerosas ya que la malignidad de un tumor depende de su habilidad de invadir al tejido normal y producir metástasis. En el hígado, la producción de proteasas es importante en procesos patológicos como el carcinoma. La sobreproducción de proteasas, entre ellas las metaloproteinasas (especialmente las que degradan colágenas intersticiales y colágena IV) y el activador de plasminógeno (APu), que al parecer están más involucradas en la degradación de matriz extracelular, es la parte principal en este proceso.

La histamina es un mediador químico que puede funcionar como factor de crecimiento y quimioatrayente para varios tipos celulares. Se ha reportado que niveles altos de histamina se presentan durante procesos patológicos como la cirrosis y tumores experimentales. También se ha reportado que la adición de histamina exógena produce un incremento en la síntesis de ADN y la división celular.

Durante este trabajo se estudió el efecto de la histamina sobre la producción de las enzimas colagenasa IV y APu, y sobre la acti-

vidad proteolítica de éstas, en las líneas celulares HeLa, y WRL-68. La actividad proteolítica de estas enzimas en dichas líneas celulares se cuantificó mediante zimogramas, lo que mostró que la histamina es capaz de estimular de manera dosis dependiente esta actividad proteolítica. Para estudiar el incremento en la producción de estas enzimas dependiente de histamina, se utilizó el ensayo inmuno-enzimático ELISA, con el cual se cuantificó directamente la cantidad de estas proteínas en los extractos celulares y en los medios de cultivo, ésto mostró que hay un incremento en la producción de estas proteasas. Además al utilizar anticuerpos policlonales que reconocen tanto las enzimas activas como las proenzimas se cuantificaron también estas últimas.

La conclusión obtenida en este trabajo es que la histamina induce la producción de colagenasas de tipo IV (gelatinasas de 72 y 92 kDa) y de APu, así como su secreción en células HeLa y WRL-68.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La degradación tisular se observa en una gran variedad de condiciones normales, como la embriogénesis, la organogénesis y la cicatrización; pero también es un fenómeno que ocurre en eventos patológicos en los que puede haber un incremento en la degradación del tejido, como durante la metástasis, o una disminución de ésta, como en la fibrosis hepática y la cirrosis. La degradación de la matriz extracelular mediante proteólisis enzimática juega un papel primordial en estos procesos ¹⁻³.

La malignidad de un tumor depende de su capacidad de metastatizar, es decir, su habilidad de invadir tejido normal fuera de sus sitios de crecimiento primario; la capacidad invasiva está dada por su eficiencia para disolver estructuras en su vecindad inmediata, como la matriz extracelular, incluyendo a la membrana basal ¹⁻⁴.

La metástasis es el resultado de una secuencia de eventos que inicia cuando las células de un tumor primario invaden el tejido normal que las rodea, mediante la secreción de enzimas proteolíticas que le permiten degradarlo y traspasarlo, entrando a la circulación y diseminándose por todo el cuerpo; posteriormente escapan de la circulación penetrando las paredes de los vasos sanguíneos y finalmente establecen tumores secundarios en sitios distantes. Du-

rante todo este proceso las células manifiestan sus propiedades invasivas¹⁻⁴.

El término invasividad describe la capacidad de las células para degradar la barrera anatómica que separa los tejidos, la matriz extracelular, mediante la secreción de proteasas específicas contra esta¹.

La fibrosis hepática es el proceso degenerativo del órgano hepático, caracterizado por una alteración en la degradación de la matriz extracelular que rodea a los hepatocitos, lo que origina una desorganización de la estructura y una fibrosis progresiva⁵. En el hígado, la cirrosis se complica frecuentemente con cáncer hepatocelular⁶. En estos padecimientos existe un desbalance en la expresión normal de varias enzimas que degradan la matriz extracelular, entre ellas metaloproteinasas y activadores de plasminógeno con sus inhibidores⁷⁻¹⁴.

La matriz extracelular está formada por dos capas histológicamente diferentes: la lamina basal (o membrana basal) y el estroma intersticial¹.

La lámina basal se encuentra situada entre el epitelio y el tejido conectivo. Presenta un grosor de entre 50 a 100 nm., y es sintetizada por las células epiteliales. La mayoría de las láminas basales se forman por dos capas distintas, una lámina lúcida o rara y una lámina densa. En algunos casos se puede observar una tercera capa llamada lámina reticular. La lámina lúcida se presenta adya-

cente a las células epiteliales, está compuesta por laminina. La lámina densa está formada principalmente por colágena tipo IV, rodeada de proteoglicanos, glicosaminglicanos, y glicoproteínas (entactina, nidógeno, laminina y fibronectina). La lámina reticular está formada por colágenas de tipos I, II, III, V, glicosaminglicanos, proteoglicanos, y fibronectinas. La lámina reticular es, probablemente producida por fibroblastos del tejido conectivo ¹.

El estroma intersticial está constituido por componentes fibrilares, además de sustancia amorfa. La parte fibrilar está compuesta por colágenas intersticiales (tipos I, II, III, y V) y elastina. La sustancia amorfa contiene glicosaminglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas ¹.

En resumen, la matriz extracelular está constituida principalmente por colágenas; tipos I, II, III, IV, y V, glicoproteínas; laminina, fibronectina, entactina, y nidógeno, y glicosaminglicanos; elastina, ácido hialurónico, condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparin sulfato, y queratan sulfato ¹.

Las proteasas más importantes que participan en la degradación de matriz extracelular en los tejidos conectivos son proteinasas o endopeptidasas. Hay 4 clases de proteinasas que están relacionadas a la degradación de la matriz extracelular; según su mecanismo catalítico se clasifican en: metaloproteinasas (colagenasa, estromelisin, gelatinasas, y colagenasa polimorfonuclear (PMN)), serin proteinasas (plasmina, trombina, activadores de plasminóge-

no tipo urocinasa (APu) y tipo tisular (APt), elastasa polimorfonuclear, y cathepsina G, cisteína proteinasas (catepsinas B y L), y proteinasas aspárticas (catepsina D)^{3,15,17}. De estas proteinasas, la plasmina, el APu, y las metaloproteinazas, están más involucradas en los procesos invasivos^{13,18,19}.

La plasmina es la serin proteasa más importante en la degradación de la matriz extracelular; es una enzima con una amplia especificidad de sustrato capaz de degradar varios componentes de la matriz extracelular como fibronectinas, laminina, y la proteína central de los proteoglicanos; sin embargo, no puede degradar colagenasas nativas ni elastina, pero sí gelatinas. Además, la plasmina también activa algunas prometaloproteinazas y elastasas latentes^{1,2}. El espectro de especificidad de la plasmina es semejante al de la tripsina; hidroliza proteínas y péptidos en las uniones lisina-arginina. La plasmina es inhibida por varias proteínas presentes en el plasma, las dos más importantes son la antiplasmina- α_2 , y la macroglobulina α_2 ². Los activadores de plasminógeno convierten al zimógeno plasminógeno, el cual es una proteína plasmática, en plasmina.

Aunque una gran cantidad de proteínas de bacterias y de vertebrados son capaces de activar al plasminógeno transformándolo en plasmina, el término activador de plasminógeno generalmente se restringe para dos enzimas que son activadores muy eficientes del plasminógeno, el APu y el activador de plasminógeno tipo ti-

sular (APt) ².

Estos dos tipos de activadores de plasminógeno, se diferencian en su peso molecular y su reactividad inmunológica. El APu tiene un peso de 50 kDa, mientras que el del APt es de 70 kDa.

Existen otras serin proteasas capaces de activar plasminógeno, entre ellas están la calicreina y los factores de coagulación XI y XII; sin embargo, su especificidad es alrededor de 10,000 veces menor que la del APu por lo que estas enzimas juegan un papel fisiológicamente menos importante.

Los dos activadores de plasminógeno tienen diferentes papeles fisiológicos. El APu media el proceso de remodelación de los tejidos en situaciones normales como el crecimiento y en las patológicas como el cáncer, mientras que el APt esta involucrado en el proceso de fibrinolisis.

El APu es parte de una cascada enzimática que además de degradar directamente la matriz extracelular activa proenzimas de otras proteasas aumentando el potencial invasivo ².

Las metaloproteinasas producidas por células invasivas incluyen enzimas capaces de degradar diferentes tipos de colágenas, laminina, fibronectinas, elastina, y la parte protéica de los proteoglicanos. Estas metaloproteinasas presentan características específicas; contienen un ión zinc en su sitio activo, son secretadas en su forma inactiva, presentan secuencias muy parecidas y son inhibidas por proteínas tisulares específicas (TIMPs).

La activación de metaloproteinasas al parecer requiere una serie de reacciones proteolíticas con varias enzimas incluyendo a la plasmina. Esta activación permite un incremento de 5 a 8 veces en la actividad de las colagenasas. Las metaloproteinas pueden activarse no solo por plasmina; se ha descrito que otras proteínas son capaces de funcionar como activadores de procolagenasas, también la autoactivación ha sido descrita ²⁰.

De las metaloproteinasas, las colagenasas y especialmente las que degradan colágena IV como las gelatinasas de 72 y 92 kDa, están implicadas mas importantemente en la invasividad y metástasis ^{15,18,21}. La catepsina B también está implicada, ya que es capaz de degradar dos de los principales constituyentes de la matriz extracelular como son colágena y proteoglicanos, además de elastina y laminina ¹⁷. Otra proteasa que parece ser particularmente importante en ciertos tipos de cáncer es el precursor de la catepsina D, el cual es inducido por estrógenos y factores de crecimiento. Se ha reportado que la catepsina D en ciertos tumores está correlacionada con el APu y además su presencia es un buen factor predictivo para la metástasis ²²⁻²⁴.

La actividad de estas enzimas está controlada a tres niveles; transcripción del gen, activación de las proenzimas y la inhibición por parte de moléculas específicas. En la mayoría de los tipos celulares, los genes de éstas proteasas parecen no estar expresándose pero un gran número de agentes pueden inducir la transcripción.

entre ellos los promotores del tumor, factores de crecimiento y productos de oncogenes ^{1,25}.

Una característica de los tumores es la sobreproducción de estas proteasas en respuesta a diferentes señales generadas por las propias células tumorales o por las células normales adyacentes ²⁵. Sin embargo, no se conocen los factores que estimulen a esta sobreproducción.

La histamina es un mediador químico ampliamente distribuido en el organismo, conocido desde hace tiempo por sus funciones como neurotransmisor, modulador de la inflamación y mediador de algunas funciones gastrointestinales ^{26,27}. Se ha sugerido también que algunos tumores promueven el incremento de la histamina tisular, aunque no se conocen los mecanismos involucrados ²⁸.

La histamina además puede funcionar como un factor de crecimiento y quimioatrayente para tipos celulares que expresen receptores H₁ ²⁹. Hay varios reportes indicando que niveles altos de histamina aparecen en muchos tejidos bajo crecimiento celular acelerado, como ocurre durante la reparación, incluyendo regeneración de hígado, médula ósea, tejido embrionario, y tumores experimentales ²⁹, aún en tejidos distantes y diferentes al sitio del tumor ²⁸, incluyendo una sobreexpresión de la enzima histidin descarboxilasa, la cual es la única enzima capaz de sintetizar histamina, en muchos tumores ³⁰⁻³⁴; más aún, al inhibir esta enzima, se inhibe el crecimiento tumoral ³⁵ y al inhibir directamente al re-

ceptor de histamina se suprime el crecimiento tumoral ³⁶.

Se ha reportado que la administración de histamina exógena no solo estimula la síntesis de DNA y la división celular, sino que provoca también la respuesta quimiotáctica en células de carcinoma humano HeLa y A431 y en células de melanoma A875 ²⁹. Nuestro grupo además reportó que la histamina funciona como factor de crecimiento en algunas otras líneas celulares ³⁷.

La histamina produce también vasodilatación capilar, así como un incremento en la permeabilidad vascular ²⁶, lo cual pudiera favorecer la angiogénesis. Por otro lado la histamina es capaz de inhibir la actividad citolítica de los linfocitos T a las concentraciones de histamina encontradas en ciertos tipos de cáncer (cáncer de mama humano, mastocitoma en ratón, etc.); este efecto es mediado por los receptores H₂; lo anterior puede ser importante al provocar la histamina una respuesta deficiente por parte del sistema inmune ante el tumor ^{38,39}.

La histamina es una amina que se produce a partir del aminoácido histidina mediante una descarboxilación por la enzima L-histidina descarboxilasa. La histamina se almacena en gránulos en los mastocitos o células cebadas y en los basófilos. En estas células, al unirse la IgE al antígeno se produce la activación de la fosfolipasa C y la generación de inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol con un aumento en el Ca⁺⁺ intracelular, esto induce la secreción del contenido de los gránulos en la sangre periférica o en los tejidos ²⁶.

tejidos ²⁶.

La histamina actúa sobre 4 tipos de receptores: H₁, H₂, H₃, y H_{1C}. Los receptores H₁ y H₂ se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, los receptores tipo H₃ se han reportado exclusivamente en el sistema nervioso central (en las terminaciones nerviosas histaminérgicas donde pueden regular la síntesis y liberación de histamina) y en las células cebadas, los receptores H_{1C} son intracelulares y se encuentran asociados a los sitios de unión de los antiestrógenos, se han identificado en membranas de células cerebrales, microsomas y núcleos de hepatocitos ^{26,40}.

El gene del receptor H₁ humano se encuentra en el cromosoma 3 ⁴¹, el receptor H₁ es una proteína de 491 aminoácidos y 56 kDa ⁴². El gene del receptor de H₂ se encuentra en el cromosoma 5, el receptor es una proteína de 359 aminoácidos ⁴³.

La unión de histamina a un receptor tipo H₁ estimula a la enzima fosfolipasa C, que cataliza la formación de trifosfato de inositol y 1,2 diacilglicerol. La unión de histamina a un receptor tipo H₂ estimula una proteína G que activa a la adenilato ciclasa con lo que se activa el sistema del AMP cíclico. El receptor H₃ al parecer estimula una proteína G, sin embargo, las bases bioquímicas de esta unión son aun desconocidas ⁴⁴. El acople de la histamina a su receptor intracelular actuará como un mensajero intracelular, favoreciendo la proliferación celular ^{36,40}.

Resulta interesante estudiar el efecto de la histamina sobre la

producción de proteasas en células en las cuales la sobreproducción de estas enzimas induce o facilita entidades patológicas y además la presencia de esta amina se encuentra incrementada, por ejemplo en células cancerosas como la línea celular de HeLa, originalmente derivada de adenocarcinoma uterino humano, u otros tipos celulares como las células hepáticas, en las cuales la producción de estas enzimas es muy importante en procesos como el carcinoma. Estas líneas celulares además pueden crecer libres de suero, lo que facilita observar el efecto debido al tratamiento y no a algún factor del suero.

Modelos experimentales para el estudio de la actividad proteolítica.

La línea celular HeLa constituye un buen modelo para estudiar los efectos potenciales de la histamina, ya que estas células pueden crecer bajo condiciones libres de suero sin modificar su crecimiento ⁴⁵. Cuando se mantiene a las células HeLa en medio libre de suero, pero conteniendo transferrina, se observa que permanecen viables y duplican su población en 72 horas. Adicionando histamina a estos cultivos libres de suero, se encontró que estimulan síntesis de DNA y división celular en una manera dosis dependiente. La insulina es igualmente potente en estimular la proliferación de células HeLa. Cuando se adicionan histamina e insulina juntas, se observa una respuesta proliferativa aditiva.

Esta estimulación por la histamina, parece ser mediada por los

receptores H_1 , ya que el antagonista de H_1 , pirilamina, bloquea la síntesis inducida de DNA mientras que el antagonista de H_2 , cimetidina, no tiene un efecto detectable ^{29,46}. La actividad mitogénica de la histamina no es exclusiva en células HeLa, por lo que resulta igualmente interesante utilizar otros tipos celulares.

Tomando en cuenta que: 1) la histamina funciona como factor de crecimiento y quimioatrayente, 2) se presenta en niveles elevados en muchos tumores, y 3) para que pueda funcionar como un quimioatrayente sobre células tumorales es necesario que se eleve la producción de proteasas que permitan degradar la matriz extracelular que las rodea y liberarse; creemos que pudiera ser también un factor inductivo de metástasis. Sin embargo, no hay hasta el momento ningún trabajo que reporte si la histamina es capaz o no de provocar esta invasividad celular. Con base en estos antecedentes, se propuso la hipótesis siguiente:

HIPÓTESIS:

Puesto que la histamina esta presente en niveles elevados en muchos tumores, actúa como factor de crecimiento y agente quimiotáctico, además la inhibición de esta amina o la enzima que la sintetiza detiene el crecimiento celular en varios tipos tumorales, es posible que esta amina también induzca un aumento en la producción y secreción de proteasas relacionadas con la invasividad como colagenasa IV y APu y con ello facilite la diseminación tumoral.

Para someter a prueba esta hipótesis, se propuso el objetivo siguiente:

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar si la histamina es capaz de inducir un aumento en la producción y/o secreción de proteasas en las líneas celulares HeLa de adenocarcinoma de cuello uterino y WRL-68 de epitelio hepático.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar si la histamina induce la producción y/o secreción de colagenasa IV y APu en la línea celular HeLa.

- Determinar si la histamina induce la producción y/o secreción de colagenasa IV y APu en la línea celular WRL-68.

- Determinar si la histamina modifica la actividad proteolítica de colagenasa IV y APu en la línea celular HeLa.

- Determinar si la histamina modifica la actividad proteolítica de colagenasa IV y APu en la línea celular WRL-68.

METODOLOGÍA:

Para conocer el efecto de la histamina sobre la cantidad de las proteasas APU y colagenasa IV producidas o secretadas por las células, se utilizaron las líneas celulares humanas HeLa (de adenocarcinoma de cervix), la cual se sabe tiene receptores H_1 , y WRL-68 (de epitelio hepático). Se cuantificó la proteína por ensayo inmunoenzimático y la actividad de estas enzimas mediante zimogramas.

Cultivos Celulares

Las células se cultivaron en cajas de 10 cm de diámetro, en medio mínimo esencial de Dulbecco enriquecido con 10 % de suero bovino fetal y glutamina 4 mM, además de ampicilina 100 ug/ml, a 37 ° C de temperatura, 5 % de CO_2 , y una humedad del 90 %. Cuando las células cubrieron el 75 % de la caja se lavaron y se les agregó medio libre de suero conteniendo 10 μ g/ml de transferrina. Además se les adicionó histamina en diferentes concentraciones: 0, 1, 10, 50, 75, 100, 150 y 200 μ M. Se incluyeron también grupos con pirilamina y cimetidina, que son bloqueadores de los receptores H_1 y H_2 , respectivamente, para identificar al receptor involucrado. Pirilamina 1 μ M, cimetidina 1 mM, pirilamina 1 μ M + histamina 100 μ M, cimetidina 1 mM + histamina 100 μ M. Además se utilizó insulina como control positivo. Permanecieron en este tra-

tamiento durante 24 h, posteriormente se obtuvo el medio de cultivo condicionado y los extractos celulares.

Obtención de los extractos celulares y del medio de cultivo condicionado

Los medios de los cultivos celulares se colocaron en tubos, y se centrifugaron 10 min a 1000 rpm a 4 ° C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se almacenó a -20 ° C hasta procesarse.

Para obtener el extracto celular, las células fueron cosechadas después de retirado el medio y de dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) raspando las cajas de cultivo con una espátula de hule, se colocaron en tubos y se centrifugaron 10 min a 1000 rpm a 4 ° C, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregó tritón X-100 al 0.1 %, y se agitó mecánicamente (con el vortex). Se guardó a -20 ° C hasta utilizarse.

Para poder analizar las muestras de medio de cultivo, se les disminuyó el pH a 2 durante una hora para inactivar a los inhibidores de colagenasas, posteriormente se realizó una diálisis para eliminar el exceso de sales. Esta diálisis se llevó a cabo en amortiguador Tris-HCl 0.01 M pH 7.2 durante 4 h con un cambio de esta solución a las 2 h. Las muestras fueron, enseguida, concentradas hasta deshidratación en un concentrador de vacío, y resuspendidas en 50 µl de agua bidestilada.

A las muestras de medio de cultivo obtenidas como anterior-

mente se describe, y a las muestras de extracto celular, se les cuantificó proteínas para poder igualar la cantidad de proteínas en todas las muestras. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford ⁴⁸, en placas de 96 pozos, en cada ensayo se realizó una curva standard, y se cuantificó en un lector de placa a 595 nm.

Actividad proteolítica

La actividad enzimática de las muestras así obtenidas, se analizó mediante zimogramas, en geles de poliacrilamida, los cuales proporcionan evidencia cualitativa detectable mediante la observación de bandas de degradación diferenciales de acuerdo al tratamiento del grupo experimental.

Los zimogramas se llevaron a cabo según la técnica de Heussen C. y Dowdle E ⁴⁹. Se realizaron dos tipos de ensayo zimográfico para cada grupo experimental en geles de poliacrilamida al 10 % conteniendo Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), ambos contenían como sustrato gelatina al 1 % y a uno de ellos se le agregó también plasminógeno. El gel que contenía plasminógeno fue para detectar actividad de APu, mientras que el que no contenía plasminógeno detectó actividad de colagenasas que podrían haber sido enmascaradas por la tinción del plasminógeno en el otro gel. La cantidad de proteínas para cada muestra fue la misma. Se utilizaron 3 µg de colagenasa y 3 µg de urocinasa (APu) como control

positivo. La electroforesis se llevó a cabo a 50 volts y 12.5 mAmp. Los geles fueron lavados en una solución de Triton X-100 al 12.5 % para eliminar el SDS y restaurar la actividad catalítica de las enzimas. Para permitir que las enzimas de las muestras presenten su actividad mediante la lisis de su sustrato, se incubaron con glicina a 37 °C de temperatura durante 15 h. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de coomasie. Después de secados los zimogramas, se calculó el área de degradación de las bandas mediante un analizador de imágenes computarizado.

Cuantificación mediante inmunoensayo

La evaluación de la cantidad total de las enzimas APu y colagenasa IV se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos, ELISAs, utilizando anticuerpos policlonales contra APu y contra una mezcla de colagenasas. Estos anticuerpos fueron obtenidos mediante la inmunización programada en conejos blancos de Nueva Zelanda. Dicha cuantificación se llevó a cabo tanto en los extractos celulares como en los medios de cultivo condicionados para cada uno de los tratamientos y tipos celulares.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos para ELISA por el método de competición directa para detectar antígenos solubles^{50,51}, sembrando en los pozos 0.2 µg de antígeno diluido en amortiguador de carbonatos (de unión) e incubando 2 h a 37 °C. Enseguida se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con al-

búmina sérica bovina diluída en PBS (solución bloqueadora) y se incubó toda la noche a 4 °C. Junto con cada ensayo se preparó una curva estándar de competición mediante diluciones seriales de antígeno en solución bloqueadora mas su respectivo anticuerpo (suero) previamente mezclados e incubados 30 min a temperatura ambiente y se utilizó como curva patrón. Al mismo tiempo se trataron las muestras a cuantificar con 100 µg de proteínas totales por cada una y mezclándolas con suero anti-colagenasa o anti-APu, e incubando 30 min. a temperatura ambiente al igual que con la curva de competición. Una vez preparadas la curva de competición y las muestras problema, se procedió a sembrarlas en la placa con el antígeno fijado anteriormente y se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo) peroxidado y se incubó nuevamente a 37 °C durante 2 h. Finalmente se agregó el sustrato cromógeno y después de 10 min se detuvo la reacción con HCL 6N. Se leyó en un lector de placa a una longitud de onda de 492 nm.

Análisis de datos

En los zimogramas se midió el área de degradación mediante un analizador de imágenes computarizado (Hewlett Packard Vectra VL2 con el software PC_IMAGE versión 2.1).

Para cada tratamiento se obtuvo el porcentaje correspondiente al extracto celular y al medio condicionado y se comparó con el

total (suma de ambos) para este mismo tratamiento (tabla 1 columnas 1 y 2).

El área total para cada tratamiento, correspondiente al área del medio sumada a la del extracto celular, se comparó con el área total control y se sustrajo esta para obtener el porcentaje de incremento total. En la tabla 1 columna 3 se muestra el tratamiento que presentó mayor incremento total.

El área correspondiente al grupo control tanto para el extracto celular como para el medio condicionado se normalizó al 100 %, y el área de los grupos experimentales se comparó con ésta sustrayéndole el 100 % del control para obtener el porcentaje de incremento (Tabla 1 columnas 4 y 5).

Durante la cuantificación de enzimas por medio de ELISAs se llevó a cabo una curva de competición de antígenos solubles utilizando concentraciones conocidas de APu y colagenasa IV. A los datos así obtenidos, se les aplicó un análisis de regresión de tipo logarítmico, con el fin de obtener la ecuación que describe el comportamiento de las curvas de competición, y poder interpolar los datos obtenidos para las muestras a cuantificar.

RESULTADOS

Efecto de la Histamina Sobre la Producción de Colagenasa IV por Células HeLa

Cuantificación de colagenasa IV en células HeLa

La obtención de colagenasa se llevó a cabo por el método inmunoenzimático ELISA para cuantificar antígenos solubles. Para ello se realizó una curva de competición tanto de colagenasa como de APu (Fig. 1).

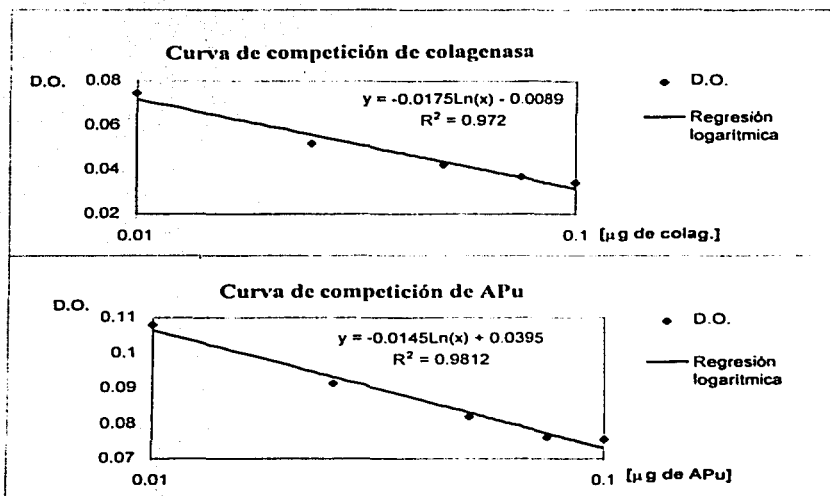


Fig. 1 Curvas estándar de competición de antígenos solubles para colagenasa IV (A) y APu (B). Distintas concentraciones del antígeno se hicieron reaccionar con la misma cantidad de suero. D.O.=Densidad óptica.

En la figura 2 se muestra que la histamina produce un incremento en la cantidad de colagenasa en el extracto celular, con un máximo de estimulación a la concentración 10 nM de histamina. A concentraciones mayores de esta amina el incremento en la producción de colagenasa disminuye, aunque sigue siendo considerable. En el medio condicionado (Fig. 3), se observa un ligero incremento en la cantidad de colagenasa, este incremento es dosis dependiente aumentando conforme se incrementa la concentración de histamina hasta llegar al máximo nivel a la dosis de histamina entre 10 y 50 μ M. A partir de la dosis de 100 μ M la cantidad de colagenasa disminuye pero es siempre superior al control. Por otro lado, se observó que la pirilamina y la cimetidina solas, no tienen ningún efecto en la producción o secreción de colagenasas, mientras que cuando se administran pirilamina o cimetidina junto con histamina 100 μ M, la pirilamina inhibe la estimulación por esta, no así la cimetidina. La insulina también incrementa la cantidad de colagenasa.

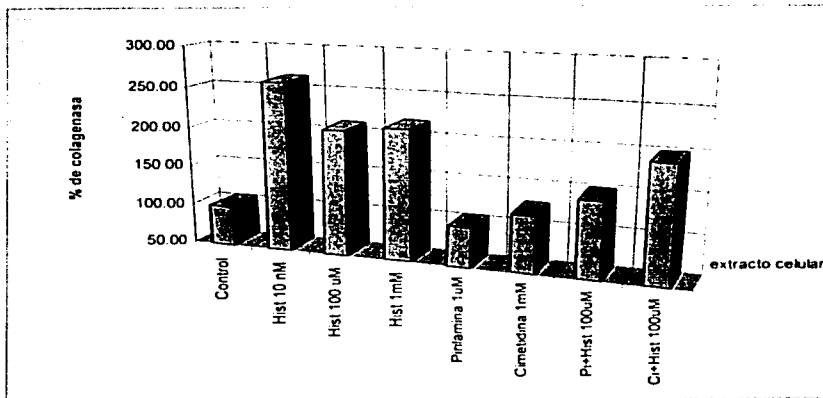


Fig. 2. Efecto de la histamina sobre la cantidad de colagenasa del extracto de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %. Pi=pirilamina, Ci=cimetidina.

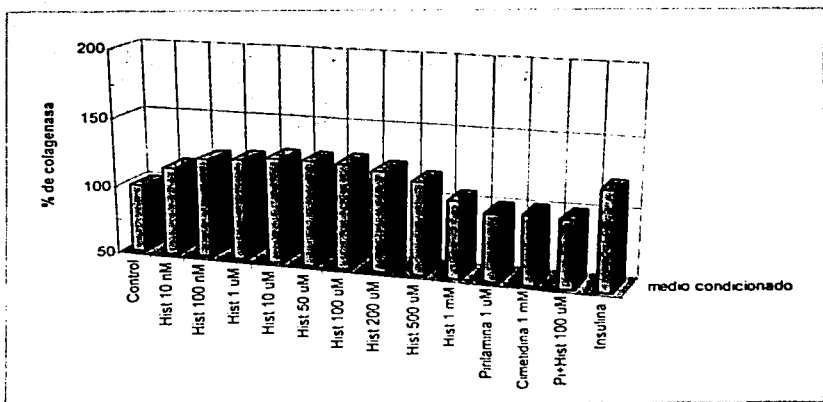


Fig. 3. Efecto de la histamina sobre la cantidad de colagenasa del medio condicionado de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

Actividad Proteolítica de-colagenasa IV inducida por histamina en células HeLa

Para medir la actividad proteolítica de colagenasa IV se utilizaron zimogramas. La identificación de esta enzima se realizó mediante su peso molecular además del sustrato que degradó (Fig. 4).

En la figura 5 se observa que las células HeLa mostraron una secreción basal de colagenasa IV. También se observó que la histamina produjo un incremento en la actividad de colagenasas en el extracto celular con respecto al control. Este incremento inicia a partir de la concentración 10 μM de histamina, aumentando de manera dosis dependiente, y llega a su máximo a la concentración 50 μM de histamina, a partir de esta concentración disminuye hasta llegar al nivel basal a la dosis 150 μM de histamina. La pirilamina y la cimetidina cuando se administran con histamina 100 μM , ambas inhiben la producción de proteasas inducida por histamina, manteniéndose al mismo nivel que el control. La insulina incrementa la actividad de esta proteasa.

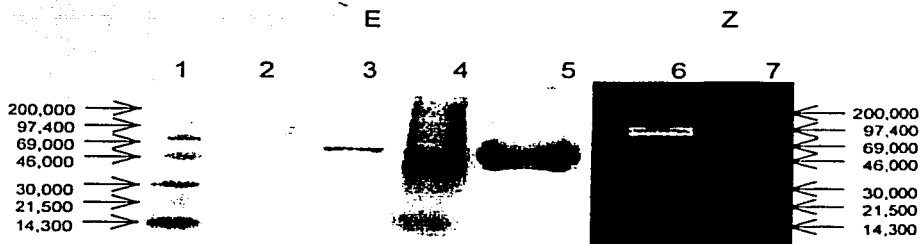


Fig. 4.- Electroforesis (E) y zimograma (Z) de colagenasa IV (72 kDa) y uPA (50 kDa). Electroforesis: Línea 1 Marcadores de peso molecular, Línea 2 Colagenasas, Línea 3 APu, Línea 4 muestra de extracto celular, Línea 5 medio condicionado. Zimograma: Línea 6 Colagenasas y APu, Línea 7 MPM.

El medio condicionado (Fig. 6) también presenta actividad proteolítica en el grupo control. Así mismo, se observa una diferencia dosis dependiente en la actividad similar a la observada en el extracto celular, aunque en este caso la máxima actividad se presenta a la concentración 10 μM de histamina y regresa al nivel basal en la concentración 200 μM de histamina, el grupo de pirlamina 1 μM más histamina 100 μM , se mantiene similar al control, mientras que cimetidina más histamina 100 μM , produce un ligero incremento en la actividad de esta enzima, aunque menor que la dosis 100 μM de histamina. La insulina incrementa la actividad de colagenasas, al igual que ocurre con el extracto celular.

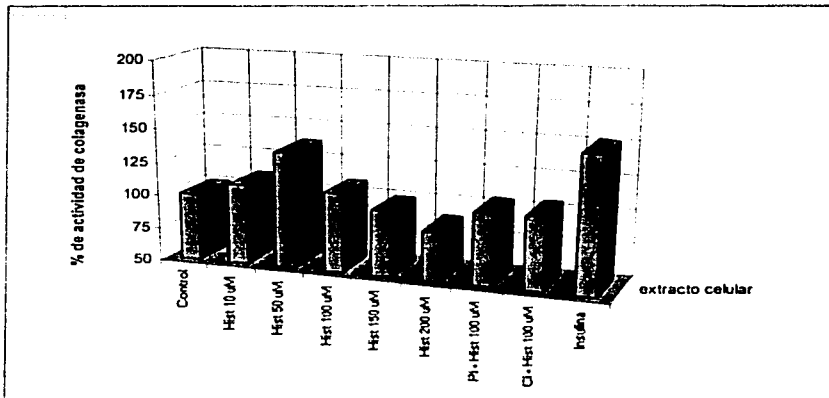


Figura 5. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de colagenasa del extracto de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

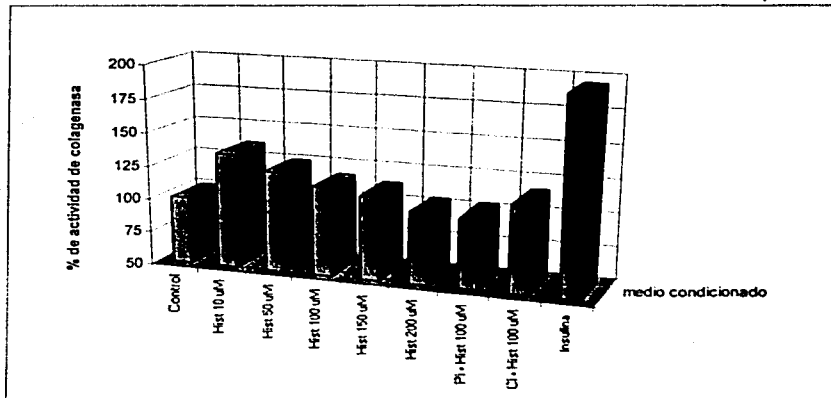


Figura 6. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de colagenasa del medio condicionado de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

Cuantificación de la colagenasa IV inducida por histamina en células HeLa

Por lo que respecta a las células WRL-68, la histamina produjo un incremento en la cantidad de colagenasa en el extracto celular (fig.7). Este incremento es dosis dependiente hasta la concentración 100 μ M de ésta amina. A partir de esta concentración, la cantidad de colagenasa empieza a disminuir. La cimetidina y la pirilamina administradas junto con histamina no son capaces de bloquear totalmente la estimulación por ésta. Por otro lado, en el medio condicionado (fig. 8) se presenta el mismo patrón de estimulación de la producción de colagenasa por histamina que en el extracto celular. Sin embargo, el incremento en la cantidad de colagenasa secretada es ligeramente menor (310 % más para el extracto contra 240 % más para el medio). Además en este caso la pirilamina inhibe casi totalmente la estimulación.

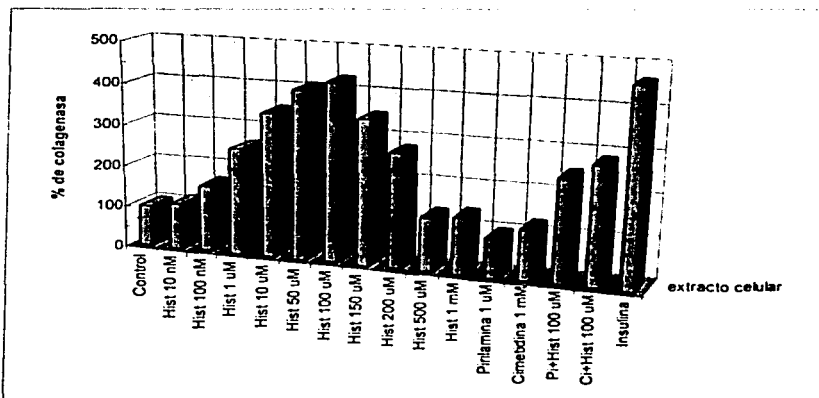


Fig. 7. Efecto de la histamina sobre la cantidad de colagenasa del extracto de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

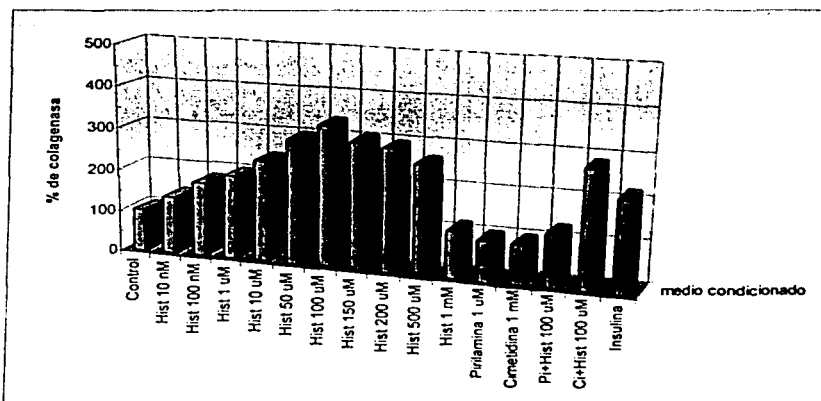


Fig. 8. Efecto de la histamina sobre la cantidad de colagenasa del medio condicionado de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

Actividad Proteolítica inducida por histamina de colagenasa IV en células WRL-68

En el extracto celular (fig 9) y en el medio condicionado (fig 10) obtenidos de éstas células se presentó una actividad basal de colagenasas. Además se observó que la histamina es capaz de producir un incremento en la actividad de colagenasa IV en los extractos celulares. Este efecto, es dosis dependiente y presenta un máximo a la dosis de 200 μM de histamina. La cimetidina incrementó la actividad de colagenasa IV en los extractos celulares en un 20 %, mientras que la insulina no produjo aumento alguno en la actividad proteolítica. En los medios condicionados también se observa que la histamina produjo un incremento en la actividad de la colagenasa IV, pero en este caso la máxima actividad fue a una concentración 75 μM de histamina, a partir de esta dosis la actividad disminuye aunque se mantiene superior al nivel basal. La pirlamina, en este caso inhibe la estimulación en la actividad de colagenasa IV producida por histamina 100 μM , mientras que la insulina no provoca incremento en la actividad de colagenasa IV en estas células.

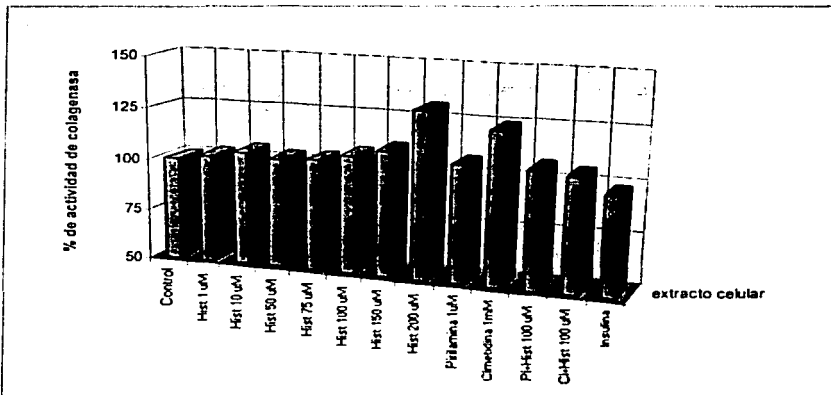


Figura 9. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de colagenasa del extracto de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de el área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

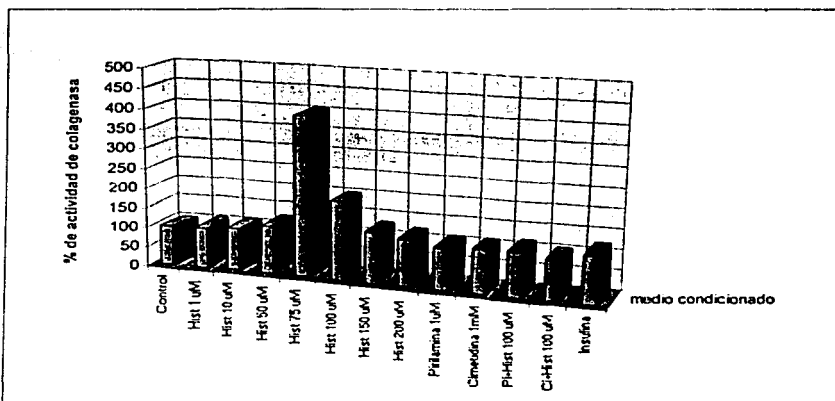


Figura 10. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de colagenasa del medio condicionado de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de el área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

Efecto de la Histamina Sobre la Producción del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa por Células HeLa

Cuantificación del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa inducido por histamina en células HeLa

La cuantificación mediante ELISA de APu en células HeLa tratadas con histamina, muestra, que esta amina no induce incremento en la cantidad de APu (fig. 11), ni su secreción (fig. 12), ya que el ligero aumento observado no es significativo. La insulina tampoco produce un incremento en la producción de esta proteasa por células HeLa.

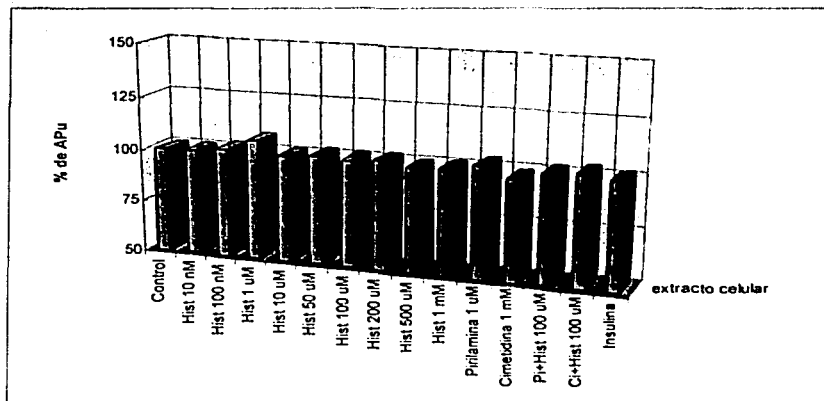


Fig. 11. Efecto de la histamina sobre la cantidad de activador de plasminógeno tipo urocinasa del extracto de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

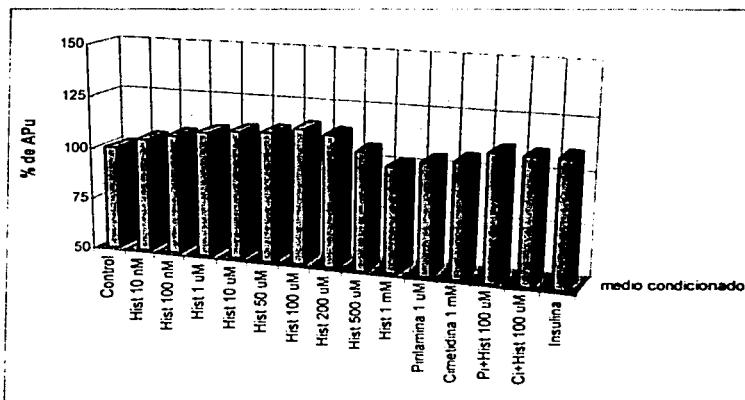


Fig. 12. Efecto de la histamina sobre la cantidad de activador de plasminógeno tipo urocinasa del medio condicionado de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

Actividad del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa inducido por histamina en células HeLa

Por lo que respecta a la actividad del APu (Figs. 13y14), las células HeLa presentaron una actividad basal, tanto en el extracto celular como en el medio condicionado. La actividad proteolítica en los extractos celulares no fué modificada por la histamina a las concentraciones empleadas, por lo que se considera que toda la producción de APu inducida por histamina es secretada. En el medio condicionado se observó un incremento de la actividad, este

incremento es dosis dependiente con una estimulación máxima a la concentración 100 mM de histamina. La cimetidina y la pirilamina por si solas no modifican la actividad de la colagenasa IV ya sean las del extracto celular o las secretadas, mientras que cuando se administran con histamina 100 μ M, ambas inhiben esta estimulación. Respecto a la insulina esta no incrementa la actividad de APu, ni en el extracto celular ni en el medio condicionado.

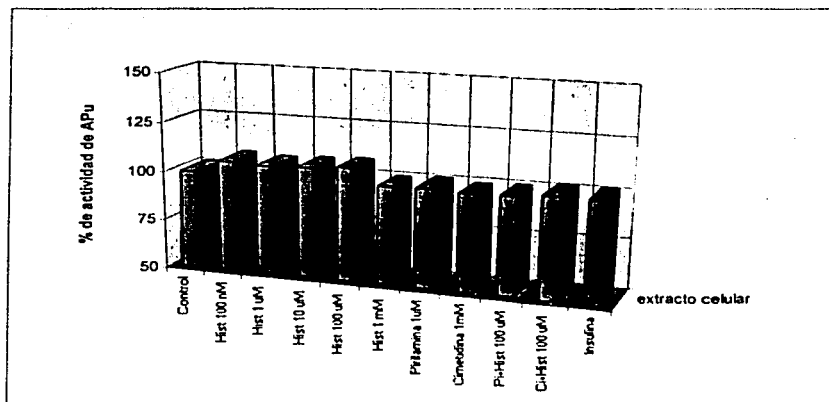


Fig. 13. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de activador de plasminógeno tipo urocinasa del extracto de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del Área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

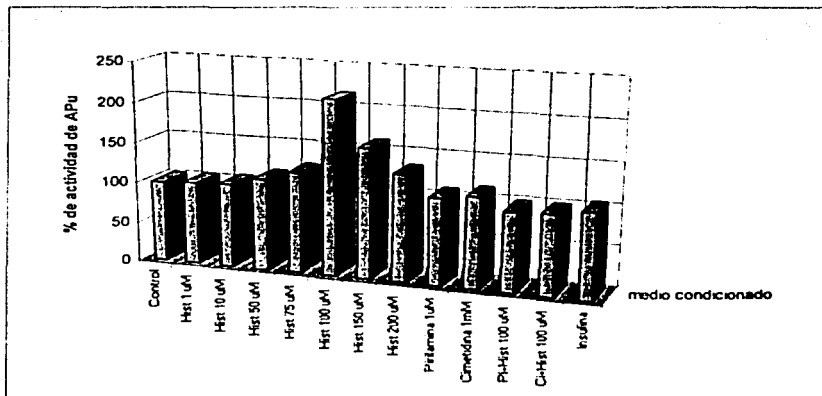


Fig. 14 Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de activador de plasminógeno tipo urocinasa del medio condicionado de células HeLa. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del Área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

Efecto de la Histamina Sobre la Producción del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa por Células WRL-68

Cuantificación del Activador de Plasminógeno tipo urocinasa inducido por histamina en células WRL-68

En las células WRL-68 la histamina estimuló la producción y secreción de APu (Figs. 15 y 16), incrementándolas también de manera dosis dependiente hasta la concentración 100 μM a la que se alcanza la máxima estimulación. Este efecto se observó tanto en el extracto celular como en el medio condicionado. A partir de esta dosis, el incremento disminuye. En cuanto a la cimetidina, tanto

en el extracto celular como en el medio condicionado solo se observa una inhibición parcial, mientras que la pirilamina inhibe totalmente. Por otro lado la insulina incrementa la producción de APU, pero no su secreción, ya que se observa incremento en el extracto celular pero no en el medio.

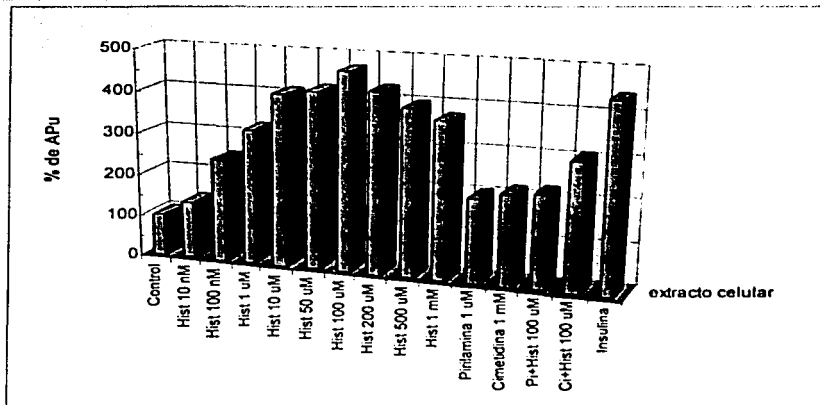


Fig. 15. Efecto de la histamina sobre la cantidad de activador de plasminógeno tipo urocinasa del extracto de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

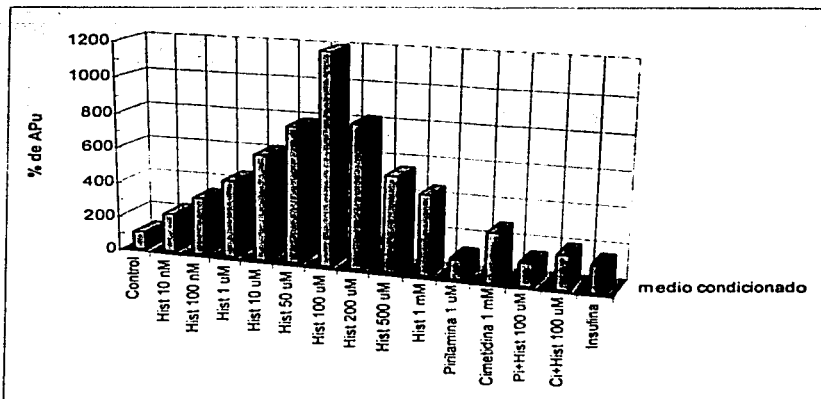


Fig. 16. Efecto de la histamina sobre la cantidad de activador de plasminógeno tipo urocinasas del medio condicionado de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir de la cantidad de enzima en μg por mg de proteína, igualando la cantidad del control a 100 %.

Actividad del Activador de Plasminógeno tipo urocinasas en células WRL-68

Estas células también presentaron una actividad basal de APU tanto en los extractos celulares como en los medios condicionados. En cuanto al efecto de la histamina sobre la actividad de esta enzima, en el extracto celular (fig. 17) se observó un incremento dosis dependiente y la mayor estimulación se presenta a la concentración 200 μM de histamina. La cimetidina y la pirlamina inhiben la estimulación por histamina aunque la pirlamina lo hace en mayor medida. La insulina produce una ligera estimulación en la actividad de APU. En el medio condicionado (fig. 18), los gru-

pos estimulados con histamina incrementan la actividad proteolítica de APu de manera dosis dependiente hasta una concentración de 75 μM de histamina, a partir de esta concentración hay una disminución de la actividad, manteniéndose sin embargo superior al control. La pirilamina a una concentración 1 μM inhibe la actividad estimulatoria de la histamina, mientras que la cimetidina a una concentración 1 mM no modifica totalmente esta actividad. Similarmente a lo que ocurre en el extracto celular, la insulina no produjo un incremento apreciable en la actividad de APu.

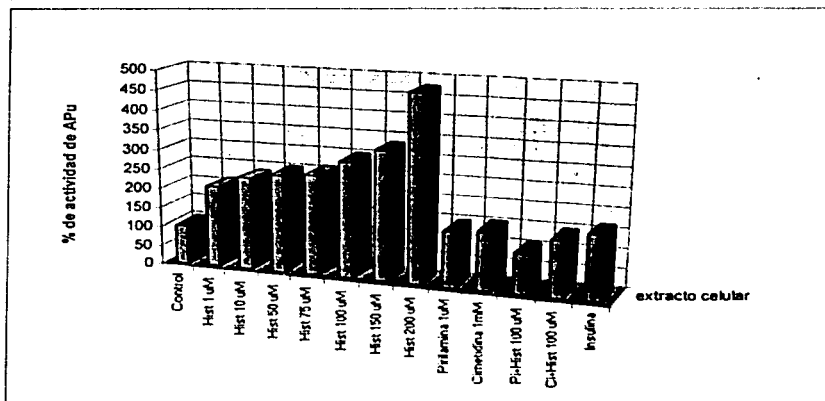


Figura 17. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de activador de plasminógeno tipo urocinas del extracto de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

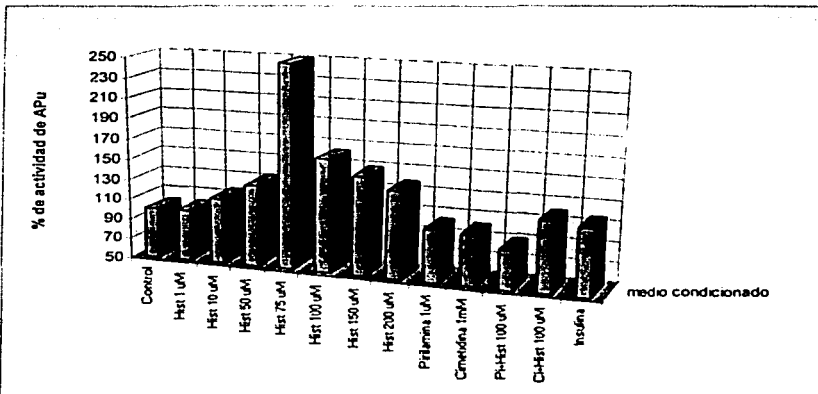


Figura 18. Efecto de la histamina sobre la actividad proteolítica de activador de plasminógeno tipo urocinasa del medio condicionado de células WRL-68. Cada barra representa el porcentaje que se obtuvo a partir del área de degradación en mm^2 , igualando la cantidad del control a 100 %.

ANÁLISIS DE DATOS

Tabla I. Análisis de datos.

	% de incremento en el extracto celular con respecto al total	% de incremento en el medio con respecto al total	Concentración de histamina a la que se obtuvo mayor porcentaje de incremento total (de APU o de CIV)	Concentración de histamina con mayor porcentaje de incremento en el extracto celular (con respecto al extracto control)	Concentración de histamina con mayor porcentaje de incremento en el medio (con respecto al medio control)
Cantidad de APU en células HeLa	53.12 ± 1.99	46.88 ± 1.99	100 µM 11.0 %	1 µM 6.58 %	100 µM 22.42 %
Actividad de APU en células HeLa	64.65 ± 5.0	35.35 ± 5.0	100 µM 43.58 %	100 µM 7.22 %	100 µM 116.02 %
Cantidad de CIV en células HeLa	62.69 ± 7.4	37.30 ± 7.4	10 nM 93.88 %	10 nM 169.34 %	100 µM 26.65 %
Actividad de CIV en células HeLa	89.1 ± 1.0	10.89 ± 1.0	50 µM 35.19 %	50 µM 36.37 %	10 µM 35.24 %
Cantidad de APU en células WRL	0.75 ± 0.55	99.25 ± 0.55	100 µM 1092.7 %	100 µM 369.36 %	100 µM 1097.4 %
Actividad de APU en células WRL	29.95 ± 7.56	70.05 ± 7.56	75 µM 152.83 %	200 µM 375.12 %	75 µM 151.73 %
Cantidad de CIV en células WRL	8.62 ± 2.12	91.38 ± 2.12	100 µM 261.0 %	100 µM 184.7 %	100 µM 203.63 %
Actividad de CIV en células WRL	43.43 ± 8.6	56.57 ± 8.6	75 µM 160.36 %	200 µM 31.03 %	75 µM 300.94 %

Tabla I. Las columnas 1 y 2 muestran el porcentaje de incremento del extracto celular y el medio condicionado con respecto al total para cada grupo experimental (la proporción del incremento extracto/medio es similar en todos los tratamientos). Las columnas 3, 4 y 5 muestran la concentración de histamina a la que se presentó el mayor incremento total, en el extracto celular, o en el medio condicionado respectivamente.

Como se observa en la tabla I, las dos primeras columnas nos indican en que porcentaje contribuye el extracto celular o el medio condicionado al incremento total en la producción tanto de colagenasa IV como de APU, es por ello que la suma de estas dos columnas nos da el 100 %. Las siguientes tres columnas nos indican las

concentraciones de histamina a las que: 1) hay un mayor incremento total de APu o de CIV con respecto al total control, 2) hay un mayor incremento de dichas enzimas en el extracto celular con respecto al extracto celular control y 3) hay un mayor incremento de éstas enzimas en el medio condicionado con respecto al medio control. Aquí se puede notar que, como se menciono anteriormente, la concentración de histamina a la que se observo mayor incremento en la producción de las enzimas no es la misma (en algunos casos si) para el medio, el extracto celular o la suma de estos.

DISCUSIÓN:

La producción de enzimas que degradan la matriz extracelular es muy importante en varios procesos fisiológicos, y muchas patologías se presentan cuando ocurre una desregulación, tanto en la producción de estas enzimas como en la modificación de su actividad. Tal es el caso del cáncer, en el cual, un incremento en la cantidad de enzimas que degradan la matriz extracelular como APu y colagenasas, así como en su actividad producen degradación de la matriz extracelular que rodea a las células tumorales, lo cual lleva finalmente a la invasión y a la producción de metástasis.^{1-4,19,25.}

Pero ¿Qué es lo que produce esta desregulación? Hay muchos reportes indicando que una inflamación de tipo crónica, independientemente si está dada por agentes infecciosos o no, produce una activación crónica del sistema inmune y que esta activación está relacionada con el desarrollo de tumores: cistitis asociada a esquistosomiasis y cáncer de vejiga⁵², gastritis por Helicobacter pylori y cáncer de estómago⁵³, hepatitis por virus de la hepatitis B y C y cáncer de hígado⁵⁴, cervicitis asociada a papilomavirus y cáncer de cervix⁵⁵, virus de Epstein-Barr y linfoma de Burkitt⁵⁶ o cáncer naso-faríngeo⁵⁷, exposición a asbestos y mesotelioma⁵⁸.

Una característica de cualquier tipo de inflamación es el aumento de los niveles tisulares de histamina y dado que esta amina presenta varias características que pudieran implicarla en el pro-

ceso carcinogénico, como presentarse en niveles altos en tejidos en crecimiento acelerado^{28,31,32,34}, estimular la síntesis de ADN^{29,37}, inhibir la actividad citolítica de linfocitos T^{38,39} e incrementar la permeabilidad vascular favoreciendo la angiogénesis²⁶, nuestra hipótesis fue que la histamina también participa en la regulación de enzimas que participan en el proceso metastásico.

Tomando en cuenta que la actividad de las enzimas se regula principalmente a tres niveles: en su expresión (transcripción del gen), en la activación de las proenzimas, y durante la inhibición de las enzimas activas²⁰, además que no se conocen los factores que llevan a la sobreproducción de estas enzimas, determinamos que la histamina si es capaz de incrementar la cantidad de colagenasa IV y APU en células HeLa de adenocarcinoma de cervix uterino y en células WRL-68 de epitelio hepático, con lo que está regulando la actividad de estas enzimas.

Dado que el incremento en la cantidad de estas enzimas producidas en presencia de histamina se estudió mediante el ensayo de ELISA, utilizando anticuerpos policlonales, se pudo cuantificar la cantidad total de enzima de manera sencilla, ya que éstos reconocen tanto la enzima activa como la inactiva, y aún la unida a TIMPs.

Como se mencionó anteriormente, la regulación post-traducciona l de las enzimas, también se da a través de su activación, por lo que era importante evaluar si al tratar las células con

histamina existía modificación de la actividad de las enzimas estudiadas. Esto se realizó mediante el ensayo de actividad enzimática o zimograma; seleccionamos este método, debido a que es uno de los más sencillos y es posible hacerlo semicuantitativo mediante la ayuda de la densitometría.

Como se observa en los resultados, la histamina es capaz de incrementar de manera dosis dependiente la producción de estas enzimas, tanto para las células HeLa como para las WRL-68.

Este incremento en la producción es dosis dependiente tanto para el extracto celular como para el medio condicionado, sin embargo, la proporción de incremento entre el extracto celular y el medio condicionado no es igual para diferentes concentraciones de histamina; es decir que, si a cierta concentración de histamina el extracto celular incrementa la cantidad de enzimas en 10 %, el medio condicionado no necesariamente las incrementa en este mismo porcentaje. Debido a esta variación en la proporción de enzima extracto/medio, la curva dosis-respuesta de histamina contra producción de enzima total es diferente a las curvas dosis-respuesta de histamina contra producción de enzima en el extracto celular y dosis-respuesta de histamina contra producción de enzima en el medio condicionado. Es por ello, que la concentración de histamina en el punto de máxima producción de colagenasa IV o APu puede ser diferente si hablamos del extracto celular, del medio condicionado, o de la producción total para cada tipo celular.

Para asegurarnos que los resultados de los experimentos no se deben a artificios y que la falta de estimulación no se debe a una falla en el experimento, se utilizó insulina como control positivo, la cual incrementó la producción de colagenasa en células HeLa y de APu en células HeLa y WRL-68, indicando que el modelo es adecuado.

Para saber cual es el receptor de histamina que está siendo estimulado se utilizaron pirilamina y cimetidina, los cuales son antagonistas de los receptores H_1 y H_2 respectivamente. Como se esperaba, estos fármacos por si solos no produjeron efecto alguno sobre la producción de estas enzimas, ya que bloquean estos receptores más no los estimulan, es decir, no modifican la producción basal ya que ésta no es dependiente de histamina. En cambio cuando se administran con histamina (100 μ M), al bloquear los receptores H_1 y H_2 , no permiten que la histamina los estimule por lo cual el aumento en la producción de estas enzimas se observa solo en uno de estos dos tratamientos, en el que no se está bloqueando el receptor que participa en la estimulación de la producción de las enzimas en cuestión. Siguiendo este razonamiento, el receptor que está mediando el incremento en la producción de las enzimas fue el H_1 , ya que cuando se administró pirilamina + histamina (100 μ M), no hubo incremento en la producción de estas enzimas con respecto al control, mientras que cuando se administró cimetidina + histamina (100 μ M) si hubo incremento, y aunque este incremen-

to fue menor que si se administra histamina (100 μ M) sola. creemos que esto se debe a que la concentración de cimetidina fue muy alta (al rededor de 100 veces mayor de lo necesario para bloquear el receptor H_2) por lo que se produjo una inhibición inespecífica al bloquearse también el receptor H_1 .

En los experimentos realizados para detectar el receptor involucrado, utilizamos la concentración de 100 μ M de histamina para estimular la producción de CIV y APu porque esta es la concentración reportada que induce mayor incremento en la proliferación^{29,37}, y de acuerdo a nuestra hipótesis de que la histamina es un factor que puede contribuir en la generación de metástasis al incrementar la proliferación de las células tumorales y producción de enzimas que degradan la matriz extracelular por parte de estas células, probablemente es la misma concentración o una concentración similar la que participa en el incremento en la producción de las enzimas, al menos en el mismo tipo celular.

Nuestros resultados indican que el receptor involucrado en el incremento de la proliferación (H_1)^{29,37}, es el mismo que media el incremento en la producción de las enzimas CIV y APu, y la concentración de histamina que produjo el mayor incremento en la producción de éstas enzimas aunque no fue 100 μ M en todos los casos, si fue una concentración cercana a esta.

Por otro lado, el incremento en la actividad de las enzimas en células HeLa o WRL-68 también ocurrió de manera dosis-

dependiente a la concentración de histamina administrada, similarmente al aumento en la cantidad de enzima, el cambio en la actividad enzimática es muy variable dependiendo del tipo celular o de la enzima en cuestión. Esto probablemente se debe a la naturaleza intrínseca del tipo celular analizado y aunque en general estas son las enzimas más importantes en la degradación de la matriz extracelular, diferentes tipos celulares las producen en distinta proporción y cantidad, y algunas células generan además otras enzimas que pueden incluso suplir las funciones de CIV y APu, sobretodo en condiciones patológicas, por lo que posteriormente sería interesante estudiar otras enzimas que participan en la degradación de matriz extracelular.

Esta variabilidad en cuanto a la enzima que cada tipo celular produce en mayor o menor cantidad, también ocurre para secretar o no la enzima producida, es así que mientras las células WRL-68 secretan el 99 % del APu producido, las células Hela secretan solo el 46 %, y esto está influenciado por la concentración de histamina utilizada.

El incremento en la actividad de las enzimas, observado en este trabajo, probablemente se debe a que el aumento en la cantidad de enzimas genera por sí mismo un aumento en tasa de activación de estas por un mecanismo de retroalimentación positiva, más que a un mecanismo directo dependiente de histamina, es decir, que la histamina induce directamente un incremento en la producción de

las enzimas, e indirectamente un aumento en la actividad de estas. Esto, en los resultados aquí presentados se puede observar en parte, por el hecho de que para todos los casos (con excepción de la producción y activación de APu en células HeLa), cuando se presenta el mayor incremento en la producción de las enzimas en el extracto celular o en el medio condicionado, es cuando existe el pico de activación de las enzimas. En la excepción mencionada anteriormente no se observó producción de APu, sin embargo, si un aumento en la actividad proteolítica de esta enzima en el medio condicionado. Este incremento en la activación de APu puede ser dado por otras enzimas como colagenasa IV u otras enzimas que activen Apu y que si sean incrementadas por efecto de la histamina generando indirectamente el aumento en la actividad de APu al activar la pro-enzima.

En el contexto del cáncer, estos resultados concuerdan y apuntan en dirección del modelo de generación de metástasis, en el cual las células tumorales requieren proliferar para incrementar la masa tumoral, que entonces ejerce presión positiva y aunado a la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular produce la salida de las células tumorales de su sitio de crecimiento primario. La histamina al producir vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular²⁶ facilita que el tumor en crecimiento siga nutriéndose y produzca factores angiogénicos. Al mismo tiempo la histamina inhibe la actividad citolítica de linfocitos T,

con lo que evita una respuesta eficiente por parte del sistema inmune ante el tumor.^{38,39} Esta inhibición esta mediada por el receptor H2, lo que sugiere que el efecto de la histamina en una célula no necesariamente se limita a la estimulación de un solo receptor. Es decir que mientras la proliferación y la producción de proteasas se deben a una estimulación del receptor H1, la inhibición de la respuesta inmune se da por la estimulación del receptor H2. La literatura ha descrito que el receptor H1 no es el unico involucrado en el incremento de la proliferación, también el receptor H2 y los receptores intracelulares están involucrados en la proliferación celular, pero aún falta mucho por conocer en un sistema tan amplio en el que la histamina juega un papel multifuncional aún por terminar de dilucidar.

Una consecuencia de la inflamación crónica que ocurre durante la cirrosis o algun otro padecimiento hepático, es el aumento en la cantidad de histamina, lo que a su vez incrementa la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular por parte de las células epiteliales hepáticas y esto puede ser un factor que facilita el proceso de la inducción de cáncer y / o metástasis^{7,9,10,14}. Por otro lado, los factores que están implicados como causa de cirrosis, también se han asociado con el desarrollo de hepatocarcinoma. Así, la hepatitis viral de tipos B y C que producen cirrosis, también están asociadas con carcinoma hepatocelular y ambas cursan con un incremento en los niveles de histamina, probablemente co-

mo respuesta a la inflamación⁶.

De acuerdo a los resultados la histamina induce un incremento más drástico en la producción y activación tanto de CIV como de APu en las células WRL-68 que en células Hela, y esto probablemente correlaciona con la mayor agresividad de un hepatocarcinoma que de cáncer de cervix uterino (solo unos pocos pacientes con tumores hepáticos en estadio III sobreviven un año, mientras que al menos el 80 % de los pacientes con carcinoma invasivo del cervix en estadio III sobreviven dos años, y el 42 % sobrevive nueve años ⁵⁹), aunque esto depende también de muchos otros factores aún por dilucidar.

CONCLUSIONES:

- Tanto en células HeLa como en células WRL-68 existe una producción basal de CIV y de APu
- La histamina induce un incremento dosis dependiente en la producción y en la secreción de CIV y APu con máximo a diferentes dosis tanto para las células HeLa como para las WRL-68.
- Tanto en células HeLa como en células WRL-68, pirilamina bloquea la estimulación por histamina, no así cimetidina (no totalmente), por lo que se considera que el receptor involucrado es H₁ y no H₂.
- En células HeLa la histamina induce una mayor producción de CIV pero una mayor secreción de APu.
- En células WRL-68 la histamina induce una mayor producción y también una mayor secreción de APu que de CIV.
- La histamina induce una sobreexpresión de APu de manera dosis dependiente en células WRL-68.
- La histamina a dosis entre 1 y 200 μ M induce la producción y secreción de APu y colagenasa IV, mientras que a dosis mayores esta inducción disminuye.

LITERATURA CITADA:

1. Mignatti P. y Rifkin D.B. 1993. Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiological Reviews*. 73, 161-195.
2. Dano K. , Andreassen P. A. , Grondahl-Hansen J. , Kristensen P. , Nielsen L.S. y Skriver L. 1985. Plasminogen Activators, Tissue Degradation, and Cancer. *Adv.Cancer Res.* 44, 139-266.
3. Alexander C.M. y Werb Z. 1989. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 974-82.
4. Liota L.A. 1992. Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Scientific American.* 266(2):54-9, 62-63.
5. Cormack D.H. 1988. Histología de Ham. Novena Edición. Editorial Harla. México, D. F. 892 pp.
6. Johnson, P. J. 1993. Hepatitis Viruses, Cirrhosis, and Liver Cancer. *Journal of Surgical Oncology.* Supplement 3:28-33.
7. Kossakowska A.E., Edwards D.R., Lee S., Urbanski L.S., Stabbler A.L., Zhang C.L., Phillips B.W., Zhang Y. y Urbanski S.J. 1998. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 153(6):1895-902.
8. Sakamoto Y. , Mafune K. , Mori M. , Shimishi T. , Imamura H. , Takayama T. y Makuuchi M. 2000. Overexpression of MMP-9 correlates with growth of small hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 17(2):237-43.
9. Murawaki Y. , Yamada S. , Ikuta Y. y Kawasaki H. 1999. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol.* 30(6):1090-8.
10. Preactux A.M. , Mallat A. , Nhieu J.T. , D'Ortho M.P. , Hembry R.M. y Mavier P. 1999. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology.* 30(4):944-50.
11. Kim J.H. , Kim T.H. , Jang J.W. , Jang Y.J. , Lee K.H. y Lee S.T. 2001. Analysis of matrix metalloproteinase mRNAs expressed in hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Cells.* 31;12(1):32-40
12. Tavian D. , De Petro G. , Benetti A. , Portolani N. , Giulini S.M. y Barlati S. 2000. u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 87(5):644-9.
13. Zhou L. , Hayashi Y. , Itoh T. , Wang W. , Rui J. y Itoh H. 2000. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int.* 50(5):392-7.
14. Zhang L.P. , Takahara T. , Yata Y. , Furui K. , Jin B. , Kawada N. y Watanabe A. 1999. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol.* 31(4):703-11.
15. Matrisian L. M. 1992. The Matrix-Degrading Metalloproteinases. *BioEssays.* 14, 455- 463.
16. Shyam S. 1991. Expression of Cathepsin L in Human Tumors. *Cancer Research.* 51, 1478-1481.
17. Sloane B. F. , Dunn J. R. y Honn K.V. 1981. Lysosomal Cathepsin B: Correlación with Metastatic Potential. *Science* 212, 1151-1153.

18. Duffy M.J. 1990. Urokinasa-Plasminogen Activator, a New and Independent Prognostic Marker in Breast Cancer. *Cancer Reserch* 50, 6827-6829.
19. Evers J.L. 1982. Plasminogen Activator Activity and Composition in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 42, 219-226.
20. Murphy G. 1994. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann NY Acad Sci.* 732:31-41.
21. Rodríguez-Fragoso L. , Jurado-León F.R. y Reyes-Esparza J.A. 2000. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología.* México, D.F. Vol.46, Núm.1.
22. Spiratos F. 1989. Cathepsin D: An Independent Prognostic Factor For Metastasis of Breast Cancer. *The Lancet.* 8672, 1115-1118.
23. Duffy M.J. 1991. Cathepsin D Concentration in Breast Cancer Cytosols: Correlación with Biochemical, Histological, and Clinical Findings. *Clin. Chem.* 37, 101-104.
24. Visscher D.W. 1993. Immunohistologic Evaluation of Invasion-associated Proteases in Breast Carcinoma. *Modern Pathology* 6, 302-306.
25. Rodríguez L. 1995. Relación entre el activador del plasminógeno tipo urocinasa y el cáncer: Mecanismo de regulación y control. *Revista del Instituto Nal. de Cancerología.* 44,159-163.
26. Garrison J.C. 1991. Histamina, Bradiquinina, 5-hidroxitriptamina y sus antagonistas. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. A. Goodman. Medica Panamericana. Octava Edición. 565-587.
27. Brunton L. 1991. Agentes para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de la úlcera péptica. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. A. Goodman. Medica Panamericana. Octava Edición. 873-888.
28. Burtin C. 1981. Increased tissue histamine in tumour-bearing mice and rats. *Br. J. Cancer.* 43, 684-688.
29. Tilly B. C. 1990. Histamina as a Growth factor and Chemoattractant for Human Carcinoma and Melanoma Cells: Action through Ca²⁺- Mobilizing H1 Receptors. *The Journal of cell Biology* 110, 1211-1215.
30. Bencsath M. , Paloczi K. , Szalai C. , Szenthe A. , Szeberenyi J. y Falus A. 1998. Histidine decarboxylase in peripheral lymphocytes of healthy individuals and chronic lymphoid leukemia patients. *Pathol Oncol Res.* 4(2):121-4
31. Kolby L. , Wangberg B. , Ahlman H. , Modlin I. M. , Granerus G. , Theodorsson E. y Nilsson O. 1996. Histidine decarboxylase expression and histamine metabolism in gastric oxynticumosa during hypergastrinemia and carcinoid tumor formation. *Endocrinology.* 137(10):4435-42
32. Ishii N. , Murakami H. , Matsushima T. , Tamura J. , Sawamura M., Morita K. , Karasawa M. , Naruse T. , Kubota K. y Tsuchiya J. 1995. Histamine excess symptoms in basophilic crisis of chronic myelogenous leukemia. *J Med.* 26(5-6):235-40
33. Garcia-Caballero M. , Neugebauer E. , Rodriguez F. , Nunez de Castro I. y Vara-Thorbeck C. 1994. Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues. *Surg Oncol.* 3(3):167-73.
34. Garcia-Caballero M. , Neugebauer E. , Rodriguez F. , Nunez de Castro I. , Heredia A. , Oosting E. y Vara Thorbeck C. 1989. Changes in histamine synthesis, tissue content and catabolism in human breast cancer. *Agents Actions.* 27(1-2):227-31
35. Cricco G. , Engel N. , Croci M. , Davio C. , Martin G. , Fitzimons C. , Bergoc R. y Rivera E. 1997. Fluoromethylhistidine inhibits tumor growth without producing depletion of endogenous histamine. *Inflamm Res.* 46 Suppl 1:S59-60

36. Suonio E. , Tuomisto L. y Alhava E. . 1994. Effects of histamine, H1, H2 and Hic receptor antagonists and alpha fluoromethylhistidine on the growth of human colorectal cancer in the subrenal capsule assay. *Agents Actions*. 41 Spec No:C118-20.
37. Reyes-Esparza J.A. , Espinosa A. , Valdez R. y Rodríguez L. "Histamine as a growth factor for some tumoral cell lines" (1996) *FASEB J*. Vol. 10 (3) Abst. 3224
38. Plaut M. 1973. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology*. 111:389-394.
39. Reynolds J.L. , Akhter J.A. , Magarey C.J. , Schwartz P. , Adams W.J. y Morris D.L. 1998. Histamine in human breast cancer. *Br J Surg*. 85(4):538-41
40. Brandes Lorne J. 1991. Stimulation of in vivo tumor growth and phorbol ester-induced inflammation by n,n-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine HCl, a potent ligand for intracellular histamine receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179 (3) : 1297-1304.
41. Leconiat M. 1994. Chromosomal localization of the human histamine H₁- receptor gene. *Hum. Genet*. 94 186.
42. Fukui H. 1994. Molecular cloning of the human histamine H₁ receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 201 894.
43. Gantz L. 1991. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 88 429.
44. Leurs M. 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol.Ther*. 66 413.
45. Hutchings Sharon E. y Sato Gordon H. 1978. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75 (2) :901-904.
46. Bristow D.R. 1991. Histamine-induced inositol phosphate accumulation in HeLa cells: lithium sensitivity. *Br. J. Pharmacol*. 104, 677-684.
48. Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive for the Quantitation of ug Quantities of Protein. *Analytical Biochemistry*. 72, 117-125.
49. Heussen C. y Dowdle E. B. 1980. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. *Analytical Biochemistry* 102, 196-202.
50. Coligan J.E. 1994. Current Protocols in Immunology. Publicado por John Eiley & Sons, Inc. Vol. 1 pag. 2.1.2-2.1.20.
51. Rapley R. y Walker J.M. 1998. Molecular Biomethods Handbook. 1a ed. Humana Press Totowa New Jersey. 725pp.
52. Raziuddin S. , Shetty S. y Ibrain A. 1991. T-cell abnormality and defective interleukin-2 production in patients with carcinoma of the urinary bladder with schistosomiasis. *J Clin Immunol* 11: 103-113.
53. Williams M.P. y Pounder R.E. 1999. Helicobacter pylori: from the benign to the malignant. *Am J Gastroenterol*. 94: S11-S16.
54. Imperial J. C. 1999. Natural history of chronic hepatitis B and C. *J Gastroenterol Hepatol*. 14: S1-S5.
55. Le Buanec H. 1999. HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed Pharmacother*. 53: 424-431.
56. Kitagawa N. 2000. Epstein-Barr virus-encoded poly (A) (-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J*. 19:6742-6750.

57. Liu M Y. 2000. Expression of the Epstein-Barr virus BHRF1 gene, a homologue of Bcl-2, in nasopharyngeal carcinoma tissue. *J Med Virol.* 61:241-250.
58. Bielefeldt-Ohmann H. 1996. Molecular pathobiology and immunology of malignant mesotelioma. *J Pathol.* 178:369-378.
59. Kavanagh J. 1993. Retinoids and Cervical Cancer. In: Retinoids in Oncology. Edited by Waun Ki Hong and Reuben Lotan. Marcel Dekker, Inc. 423pp.