

Laboratorio de Fisiología Animal Aplicada
Facultad de Farmacia
Barcelona
(Prof. A. Fraile)

Excreción urinaria en histamina en la rata*

por

A. Fraile y E. Goñalons**

(Recibido para publicar el 23 de marzo de 1964)

Los numerosos trabajos realizados en los últimos años sobre el origen y metabolismo de la histamina en el organismo animal han esclarecido muchos aspectos del problema. Se admite hoy que, en la rata, la histamina ingerida con los alimentos, o formada por las bacterias intestinales, es acetilada y se elimina por vía urinaria como tal histamina conjugada o sus metabolitos; mientras que, por el contrario, la histamina procedente de la descarboxilación de la histidina en los tejidos, al igual que la histamina inyectada, se elimina en parte como histamina libre (3). El comportamiento del macho y de la hembra, a este respecto, es muy diferente; la hembra excreta unas diez veces más histamina libre que el macho, tanto en condiciones normales como después de la administración parentérica de la substancia. La causa de esta diferencia parece ser la distinta importancia relativa que tiene en ambos sexos el proceso de metilación de la histamina (7). Tales hechos justifican la opinión de que la excreción urinaria de histamina libre, en la rata hembra, cons-

tituye un índice del grado de liberación o de producción de histamina endógena (8). Y, en efecto, es hoy una práctica muy difundida la de valorar histamina en orina como medio de sorprender alteraciones metabólicas de dicha substancia.

Las técnicas seguidas por los diversos autores son diferentes, y así también varían los datos numéricos y el grado de dispersión de las cifras basales consignadas en la literatura. Hemos creído interesante, por lo tanto, hacer un estudio crítico de las condiciones de trabajo, con ratas normales, a fin de conocer el grado de significación de cualquier diferencia en la eliminación urinaria de histamina libre cuando las condiciones experimentales son distintas.

* Este trabajo ha sido subvencionado por el «Fondo para el fomento de la investigación en la Universidad», del Ministerio de Educación Nacional.

** Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación, del C.S.I.C.

Material y métodos

Trabajamos con ratas albinas Wistar, hembras, no gestantes, de unos 6 meses de edad y pesos comprendidos entre los 170 y 200 g., que se disponen individualmente en jaulas de metabolismo para recoger selectivamente la orina emitida. Los animales consumen la dieta normal para ratas, cuyo contenido en histamina, determinado por el método de CODE (1), es de 4,1 μg HB/g. En dos series de ensayos fueron sometidos a un ayuno previo de 24 horas. El período de recogida de orina fue de 2 horas cuando los animales eran hidratados antes de su distribución en las jaulas, y de 12 horas cuando no mediaba este requisito. La hidratación y la toma de muestras se efectúa de la siguiente manera: Cada rata recibe, a través de una sonda gástrica, un volumen de agua igual al 2,5 % de su peso y, transcurrida una hora, se le vacía la vejiga urinaria por ligera presión sobre el abdomen; se administra seguidamente, de la misma forma, un 5 % de su peso de agua destilada, y es a partir de este momento cuando empieza el período de recogida, al final del cual se

repite la operación de vaciar completamente la vejiga.

La histamina libre presente en las muestras se valora biológicamente sobre fleon de cobayo en baño de órganos de 25 ml. de capacidad, con solución Tyrode atropinizada (0,5 mg/l) como líquido de perfusión, a 32° C. de temperatura y con oxigenación por aire. La orina se ensaya directamente, sin tratamiento previo, pues, de acuerdo con WILSON (9), es evidente que la sustancia activa sobre el fleon de cobayo, presente en las muestras de orina de rata, es histamina. También nosotros hemos comprobado este aserto estudiando la abolición de la respuesta del órgano a la histamina y a la orina y su recuperación paralela, después de añadir al baño una dosis muy pequeña de un antihistamínico.

Resultados

Con objeto de facilitar la comparación de los datos experimentales, expresamos todos los resultados en microgramos de histamina base excretados por rata y por hora.

En la Tabla I se consignan los valores hallados para los 4 grupos de determi-

TABLA I

Excreción urinaria de histamina (μg HB/rata/hora) en ratas ♀ normales; influencia del ayuno y de la hidratación previa.

Grupos		n.º	Media	σ	C_v	ϵ
1) Ratas normales; ayuno	{ a) muestras	20	1,66	0,86	52,0	0,19
	{ b) animales	11	1,50	0,69	46,0	0,20
2) Ratas normales; no ayuno	{ a) muestras	20	2,25	0,94	42,1	0,21
	{ b) animales	11	2,16	0,86	40,1	0,26
3) Ratas hidratadas; ayuno	{ a) muestras	53	1,60	0,70	43,7	0,09
	{ b) animales	11	1,65	0,45	27,6	0,13
4) Ratas hidratadas; no ayuno	{ a) muestras	20	3,55	0,87	24,6	0,19
	{ b) animales	10	3,50	1,05	30,1	0,33

TABLA II

Excreción urinaria de histamina ($\mu\text{g HB/rata/hora}$) en ratas ♀ hidratadas y sometidas a un ayuno previo de 24 horas. (A) = Variabilidad de las muestras totales, tomadas como independientes. (B) = Variabilidad de las muestras correspondientes a un mismo animal. (C) = Variabilidad de los animales.

Rata n.º	N.º muestras	Media	σ	C_v	s	
—	53	1,60	0,70	43,7	0,09	(A)
1	7	1,35	0,59	44,0	—	(B)
2	6	0,95	1,00	105,2	—	
3	7	1,25	0,37	29,6	—	
4	5	2,00	0,75	37,5	—	
5	5	2,10	0,49	23,3	—	
6	3	1,85	0,59	32,1	—	
7	5	1,50	0,59	39,6	—	
8	4	2,00	0,43	21,7	—	
9	3	1,30	0,35	26,9	—	
10	4	2,45	0,69	28,1	—	
11	4	1,40	0,23	16,7	—	
—	11	1,65	0,45	27,6	0,13	(C)

naciones, según las condiciones experimentales. Las muestras de orina de las ratas pertenecientes a los grupos 1 y 2 corresponden a micciones normales de 12 horas, durante las cuales los animales permanecieron en jaulas de metabolismo, privados de comida, pero no de agua. Las ratas de los grupos 3 y 4 fueron hidratadas como se explicó anteriormente, y la orina se recoge durante 2 horas.

Consignamos separadamente, en cada grupo, los resultados medios de las determinaciones correspondientes a todas

las muestras, consideradas como independientes, sin tener en cuenta el hecho de que varias pertenecen al mismo animal (a), y los que resultan de tomar en consideración dicho extremo (b). Como aclaración de lo expuesto se recogen en la Tabla II los datos parciales que han servido para calcular las cifras del grupo 3.

Para el análisis de la significación estadística de las diferencias entre las medias halladas tomamos como criterio la comparación de los valores de t que resultan de aplicar las fórmulas:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}} \quad \text{ó} \quad t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{\sum d_1^2 + \sum d_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right)}}$$

(según que el número de datos sea igual o diferente, respectivamente) con los valores tabulados de la constante para los

diferentes grados de probabilidad (véase FRAILE, 2). Así se obtienen los resultados de la Tabla III.

TABLA III

Significación estadística de las diferencias entre los valores medios de la Tabla I.

Concepto	Grupos	Medias	Significación
Por muestras independientes	1 a — 1 b	1,66—1,50	No significativa
Idem.	2 a — 2 b	2,25—2,16	No significativa
Idem.	3 a — 3 b	1,60—1,65	No significativa
Idem.	4 a — 4 b	3,55—3,50	No significativa
Por ayuno; ratas normales	1 a — 2 a	1,66—2,25	Probab. significat.
Por ayuno; ratas hidratadas	3 a — 4 a	1,60—3,55	Muy significativa
Por hidratación; en ayunas	1 a — 3 a	1,66—1,60	No significativa
Por hidratación; no ayuno	2 a — 4 a	2,25—3,55	Muy significativa

Discusión

Cualquiera que sean las condiciones operatorias, las diferencias que se observan por tomar las muestras de un mismo animal como independientes son estadísticamente no significativas. Se deduce, pues, que las determinaciones hechas en ratas diferentes son tan comparables como pueden serlo los valores obtenidos de un mismo animal en ocasiones distintas.

La ingestión de comida hace aumentar significativamente la excreción urinaria de histamina. Este hecho está en contradicción con la idea, expuesta anteriormente, de que la histamina ingerida sufre acetilación en el tracto digestivo; si bien KAHLSON y *col.* (5) consideran que son los propios procesos digestivos los responsables de tal aumento, al determinar una mayor formación de histamina intraorgánica.

Con objeto de analizar esta cuestión, administramos 250 μg de histamina con el agua de hidratación a 3 ratas, y seguimos su eliminación urinaria durante 6 horas en períodos de 2 horas. Naturalmente, los animales recibieron el 5 % de su peso de agua destilada al comienzo de cada uno de los tres períodos. Los resultados medios fueron:

Primer período 4,8 $\mu\text{gHB/hora}$
 Segundo período 2,7 $\mu\text{gHB/hora}$.
 Tercer período 2,3 $\mu\text{gHB/hora}$.

Es, pues, evidente que no sólo la mayor descarga de histamina endógena, sino también el contenido en histamina de la dieta, hacen aumentar su excreción urinaria durante el proceso digestivo. Pero trabajando con animales en ayunas se obvia este inconveniente, y no es necesario el empleo de dietas exentas de histamina, como acostumbran a hacer los investigadores suecos (4).

La técnica de la hidratación de los animales, empleada por nosotros, había sido ya aplicada por WILSON (8) a la rata, y se ha extendido su uso a otras especies, como el cobayo (6). Son evidentes las ventajas de esta manera de operar, con la que se acorta el tiempo de la experiencia y se estabilizan las condiciones de trabajo. La comparación de las cifras medias obtenidas en condiciones normales y después de la hidratación pone de manifiesto que no hay diferencia significativa cuando se opera con animales en ayunas. La significación de la diferencia cuando no ha mediado el período de ayuno se debe, sin duda, a que durante las 12 horas que las ratas normales permanecen en experiencia no disponen de alimento, y su estado se va acercando progresivamente a las condiciones de ayuno. Cuenta entonces la influencia de la ingestión de comida, y ya vimos que este factor altera significativamente el nivel de excreción de histamina.

Conclusiones

1. La excreción urinaria de histamina libre, en ratas hembras adultas, en ayunas, es del orden de 1,6 μ g HB/hora.
2. Las variaciones que se observan en un mismo animal a lo largo del tiempo son similares a las que presentan los distintos animales entre sí.
3. La ingestión de comida y la administración oral de histamina hacen aumentar la excreción urinaria de histamina libre durante las 2 horas siguientes.
4. La diuresis provocada por hidratación previa de los animales no modifica el nivel normal de excreción de histamina.

Resumen

Se estudia la excreción urinaria de histamina libre en ratas hembras adultas, en condiciones normales y después de haberles administrado un 5 % de agua por sonda gástrica; el estudio estadístico de los resultados demuestra que no hay diferencias significativas entre los valores hallados por uno y otro método. Asimismo se pone de manifiesto que la variabilidad de las muestras correspondientes a una misma rata, tomadas en ocasiones distintas, es similar a la variabilidad de los individuos. Se considera también la influencia de la ingestión de comida y de la administración oral de histamina sobre el nivel de excreción, que se eleva significativamente en ambos casos.

Summary

Urinary excretion of histamine in the rat

The urinary excretion of free histamine in female albino rats was studied. Four groups of rats were tested: urine from rats belonging to groups 1 and 2 was collected directly for a period of 12

hours; rats of groups 3 and 4 were previously hydrated, receiving afterwards a water load of 5 % of their body weight by stomach-tube, and urine collection was carried out during the following 2 hours. Rats of groups 1 and 3 were fasted for 24 hours before the beginning of the test. Assays of histamine were done testing the urine directly on a guinea-pig ileum preparation in a 25 ml bath of atropinized Tyrode solution. Statistical treatment of the mean values obtained showed that hydration does not modify the rate of histamine excretion. The ingestion of food caused an increase of the output of histamine, and so did the oral administration of the amine. From the comparative analysis of the ranges of variation for different samples taken from the same rat, and for those corresponding to different rats, the conclusion is drawn that it is not advantageous to use the same animals throughout an experiment when studying changes in the excretion of histamine.

Bibliografía

- (1) CODE, C. F. : *J. Physiol.*, **87**, 257, 1937.
- (2) FRAILE, A. : *Enciclopedia farmacéutica*, III, **777**, 1963, Barcelona.
- (3) GADDUM, J. H. : *Ciba Foundation Symposium on Histamine*, **36**, 1955.
- (4) GUSTAFSSON, B., G. KAHLSON y E. ROSENGREN : *Acta Physiol. Scand.*, **41**, 217, 1957.
- (5) KAHLSON, G., E. ROSENGREN y R. THUNBERG : *J. Physiol.*, **169**, 467, 1963.
- (6) WATON, N. G. : *J. Physiol.*, **165**, 174, 1963.
- (7) WESTLING, H. : *Brit. J. Pharmacol.*, **13**, 498, 1958.
- (8) WILSON, C. W. M. : *J. Physiol.*, **126**, 141, 1954.
- (9) WILSON, C. W. M. : *J. Physiol.*, **125**, 534, 1954.