REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 22, n.º 4, págs. 141-146, 1966

Cátedra de Fisiología Animal Aplicada
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica del
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica (C.S.I.C.)
Madrid

Influencia de las cápsulas suprarrenales en la eliminación de histamina por el riñón en ratas machos

por

J. L. Rey de Viñas y J. Lucas Gallego

(Recibido para publicar el 11 de mayo de 1966)

Hemos efectuado estudios previos comparativos de los distintos métodos para valorar histamina; entre los de mayor porcentaje de recuperación podemos citar los métodos de ANREP y col. (1), BARSOUM y GADUM (3), BEST y MAC HENRY (4), BERGSTROM y HANSON (5), CODE (6), DUNERY y col. (8), LE BLANC (11) y ROBERT y ADAM (13).

De estos estudios hemos conseguido un método original aplicable a la histamina total eliminada en la orina de ratas, que describiremos.

La adaptación al frío produce en las ratas un aumento en la eliminación de histamina siete veces superior a los valores encontrados en las ratas a la temperatura de 22° C. La suprarrenalectomía aumenta la histamina en la pared intestinal, hígado, pero no en el riñón, bazo y sangre. ROSE y BROWNE (14) y BARLET y LOCKET (2) estudiaron si la suprarrenalectomía aumentaba el contenido de histamina en los tejidos ricos en histaminasa (pared del intestino), o si afecta a tejidos que no contienen histaminasa, como la piel; los resultados demuestran que aumenta el contenido de histamina en los tejidos con o sin histaminasa y la actividad histaminásica es reducida. En 1962 KAMESBARAN (10) sostiene que la facilidad que tiene el feto en formar histamina está poco afectada por la suprarrenalectomía u ovarioectomía de la madre o por inhibición de la histaminasa de los tejidos o histaminodecarboxilasa.

Todo esto nos hizo pensar que la hipotermia produciría una activación de la histidinadecarboxilasa o una inactivación de la histaminasa, fermentos que producen un aumento o disminución en la formación de histamina.

Una de las glándulas más afectadas en la hipotermia durante el primer mes de la adaptación son las cápsulas suprarrenales; así que empezamos a valorar la histamina total excretada por la orina en un lote de ratas machos normales a la temperatura ambiente, porque com-

probamos que la diferencia de sexo afectaba de un modo notable los valores hallados en la orina, produciendo las hembras cantidades muy superiores a las ratas machos, aserto que fue confirmado por NETTER (12).

Material y métodos

Hemos empleado un lote de ratas machos jóvenes de la raza «Wistar», con un peso comprendido entre 165-200 g en todos los experimentos.

Se las adaptaba durante tres días consecutivos en la caja de metabolismo, para recoger la orina lo más limpiamente posible, y por otra parte, se las habituaba a la alimentación preparada en forma de papilla, con suficiente cantidad de agua para suministrar la necesaria, sin poner bebederos.

La orina excretada en 24 horas fue recogida en jaulas de metabolismo apropiadas poniendo en el matraz colector un ml de ClH 10 N, que impide la fermentación de la orina eliminada en 24 horas y sirve luego para hidrolizarla. Una vez recogida se filtra y ajusta el *p*H a 2, con papel indicador universal medimos el volumen y se hidroliza a ebullición en baño de arena y con refrigerante de aire, barilla de vidrio hueca de 1,5 m de longitud.

Finalizada la hidrólisis se neutraliza con NaOH 0,1 N, con lo cual queda en condiciones de ser valorada la histamina total (libre y combinada) (13) sobre íleon terminal de cobayo, en un baño de 10 ml de capacidad con solución Tyrode atropinizada con 0,02 µg/ml de sulfato de atropina, que impide las contracciones espontáneas. A veces no es necesario neutralizar la orina hidrolizada si contiene histamina en cantidad, porque se pueden diluir 5 ml de la orina problema en Tyrode con *p*H 7,2-7,4, en un volumen de 50 ml; de este modo el Buffer neutraliza la acidez de la muestra, sin necesidad de añadir NaOH 0,1 N.

Se comparan las contracciones producidas por la histamina contenida en la orina problema sobre el íleon terminal de cobayo con las producidas con una solución standard de diclorhidrato de histamina que lleva 0,2 µg/ml. Se emplea en la valoración el método estadístico del cuadrado latino 4 × 4. Al final de las valoraciones las contracciones fueron bloqueadas con un antihistamínico de síntesis, añadiendo al baño 0,05 µg del ClH-1-p-clorobenzil-2-4-pirrolidil-metil-bencimidazol. La temperatura del baño fue en todos los experimentos de 37° C, el tiempo entre dosis fue de tres minutos, el tiempo de subida treinta segundos; se hacen dos lavados entre dosis.

Las ratas fueron alimentadas con una dieta constante en composición y pobre en el contenido de histamina, formada por una mezcla de harina de trigo y salvado a partes iguales con harina de avena y salvado. En estas ratas fueron posteriormente extirpadas las cápsulas suprarrenales, dejándolas veinte días de recuperación, al fin de lo cuales se determinó el contenido de histamina en la orina eliminada en 24 horas, del mismo modo como se hizo en las ratas normales.

Resultados

Empleamos un lote de cuatro ratas machos normales, y después de determinar el contenido de histamina total en la orina eliminada en 24 horas, procedemos a extirpar las cápsulas suprarrenales y después de veinte días de recuperación se valora la histamina aplicando el método descrito y haciendo 4 ó 5 determinaciones en cada rata se calcula la media de los valores encontrados en ambas determinaciones. Los resultados están reflejados en la tabla I para las ratas normales y en la tabla II para las ratas adrenalectomizadas, expresando los resultados en µg de diclorhidrato de histamina en la orina eliminada en 24 horas.

TABLA I

Ratas machos normales, histamina (μg) en orina en 24 horas.

Rata 1: peso, 146 g			Rata 2: peso, 148 g			Rata 3: peso, 134 g			Rata 4: peso, 200 g		
L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.
1.6455	0.7872	0.6751	3.0496	2.5600	2.5326	3.969	2.6540	1.3129	7.2994	6.3322	5.4012
1.4333	0.9924	0.6547	11.2506	3.8535	1.8338	4.1007	3.5744	3.0162	5.7381	5.1000	4.5328
8.5870	6.8441	6.0653	4.6122	3.9101	2.3805	2.3664	1.8373	1.3393	9.3048	6.8340	1.6440
11.7812	3.7311	1.6225	2.0497	1.2720	0.8077	13.9189	11.6288	9.0242	13.8045	9.1344	6.2007
67.7978	6.8626	5.9895	—	—	—	12.0604	4.4640	2.3942	—	—	—
31.2448	19.2174	15.0071	90.9621	11.5956	7.5546	36.4154	36.4154	24.1585	17.0868	36.1468	17.7787
$\bar{x}$: 6.2489	3.8434	3.0014	5.2405	2.8989	1.8886	7.2830	4.8317	3.4173	9.0367	6.8501	4.4446

X = 4.6060 μg/orina de rata en 24 horas.
Ls = 6.9522 » » » » » »
Li = 3.1879 » » » » »

TABLA II

Ratas machos (adrenoprivas), histamina (μg) en orina en 24 horas.

Rata 1: peso, 146 g			Rata 2: peso, 148 g			Rata 3: peso, 134 g			Rata 4: peso, 200 g		
L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.	L. sup.	Pot. M	L. inf.
6.9580	5.6359	4.4495	49.0923	39.9186	30.6342	40.8856	34.9245	28.6792	16.8896	9.4679	2.6125
34.3250	21.184	10.7584	20.7298	16.0313	10.8943	51.7238	39.5926	29.3252	17.0097	10.6638	7.4849
97.7473	56.9273	6.7555	84.5754	75.2973	66.9045	41.4786	40.2539	38.9514	6.8375	4.9214	2.8595
47.9920	34.8681	24.7508	28.0602	26.1332	24.1928	47.1744	24.9237	11.9745	7.1067	5.3184	4.2023
—	—	—	39.4081	25.3680	22.5927	152.9999	37.7542	9.1883	15.5886	11.7252	8.3601
187.0223	118.6153	46.7142	221.8658	182.7484	155.2185	334.2653	117.4489	118.1186	63.4321	42.0998	25.5193
$\bar{x}$: 46.7555	29.6538	11.6785	44.3731	36.5496	31.0437	66.8524	35.4897	23.6237	12.6864	8.4199	51038

X = 27.5282 μg/orina de rata en 24 horas.
Ls = 42.6868 » » » » » »
Li = 17.8624 » » » » » »

Se comprueba en todos los casos que las contracciones del íleon provocadas por la adición de las muestras de orina tratadas son debidas a la histamina, por ser bloqueadas estas respuestas por el ClH-1-para-cloro-benzil-2-N-pirrolidil-metil-bencimidazol.

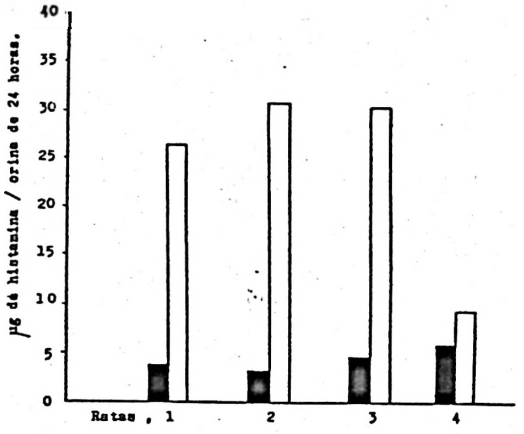

FIG. 1. En ordenadas histamina excretada en µg. por ratas machos en la orina de 24 horas. En abscisas ratas, 1, 2, 3, 4. Normales en negro y biadrenalectomizadas en blanco.

Discusión

En estos experimentos hemos determinado únicamente la eliminación de histamina por la orina en ratas machos, por cuanto que, según NETTER (12), hay una eliminación de histamina diferente según el sexo, hecho anotado por FRAILE (7).

La técnica empleada por nosotros difiere de la de LE BLANC (10) en que sometemos la orina ácida a ebullición en baño de arena que alcanza los 300° C y permite descomponer la acetil-histamina; de este modo las cantidades que se acusan en las valoraciones son superiores.

Por otra parte, el empleo del cuadrado latino permite unos resultados más exactos que la simple determinación con dosis standard y problemas que se valoran por interpolación, por cuanto que el método del cuadrado latino nos indica si el experimento es válido, lo que no sucede con el de interpolación.

En cada rata se hacen al menos 4 valoraciones en días distintos: en las ratas 1 y 3 se han efectuado cinco valoraciones. Cada valoración está representada en la tabla por un límite superior, un límite inferior y una potencia media. Del conjunto de límites de confianza y potencias realizadas en cada rata en los distintos días hacemos un cálculo para obtener una media de los límites y la potencia.

Con las potencias medias de cada rata obtenemos los resultados: de la misma manera deducimos los límites medio, superior e inferior del conjunto de las determinaciones realizadas.

Observamos que los resultados obtenidos en cada rata, en los distintos días, acusan unos valores muy diferentes que no influyen en el resultado final, por cuanto se realiza un cálculo estadístico.

Hemos de poner de manifiesto que el peso de la rata no influye en la valoración de la histamina, por cuanto que la rata número 3, con peso de 134 g, acusa una potencia media de 2.8989 µg y, sin embargo, la rata 6, con peso de 200 g, tiene una potencia de 6.8501 µg.

La alimentación de las ratas en estos experimentos no influye, por cuanto que todas las ratas han sido alimentadas con una dieta uniforme.

En relación a la influencia de la temperatura observamos un discreto aumento en todas las determinaciones realizadas con la rata 4. que interpretamos como consecuencia de la menor actividad de las hormonas corticales en el proceso metabólico de la histamina durante la época de calor, ya que las pruebas fueron realizadas en días de temperatura alta.

El cálculo estadístico por el método del cuadrado latino nos permite en cada experimento determinar si el resultado obtenido está dentro de los límites de error con una probabilidad inferior al

5 % y, en consecuencia, deducir si el experimento es aceptable.

En las ratas normales obtenemos unos resultados de 4.6060 µg de histamina-orina eliminada en 24 horas, con unos límites de confianza comprendidos entre 6.9522 µg y 3.1879 µg y en las adrenalectomizadas 27.5282 µg histamina-orina de 24 horas, con un límite superior de 42.6868 µg y un límite inferior de 17.8624 µg de histamina en la orina eliminada en 24 horas.

En la gráfica número 1, comparativa de los resultados en ratas machos normales y biadrenalectomizados, se observa en todas ellas un aumento en la eliminación de histamina, especialmente en las ratas 1, 2 y 3, en donse ve que, después de la adrenalectomía, la eliminación de histamina es de 6 a 7 veces superior.

Consideramos que la técnica de LE BLANC, modificada por nosotros, es superior en resultados a las técnicas empleadas por otros autores, ya que se aprovecha la histamina de los derivados acetilados al ser hidrolizados en baño de arena a la temperatura de 300° C y permite obtener las contracciones intestinales, sin provocar inhibición alguna durante el proceso de valoración.

Conclusiones

El método empleado por nosotros acusa valores más altos de histamina en la orina por hidrolizar todos los derivados acetilados, dejando libre la histamina al operar en baño de arena, que alcanza la temperatura de 300° C.

En las ratas normales obtenemos unos resultados de 4.6060 µg/orina eliminada en 24 horas, con unos límites de confianza entre 6.9522 µg y 3.1879 µg. El peso de la rata no influye en la cantidad de histamina.

No podemos determinar la influencia de la alimentación, porque todas las ratas han sido sometidas al mismo régimen dietético.

En las ratas machos adrenoprivas la cantidad de histamnia eliminada en 24 horas es de 27.5282µg, con unos límites de confianza comprendidos entre 42.6868 y 17.8624 µg, de donde resulta evidente el aumento de excreción de histamina en las ratas adrenoprivas.

En las ratas machos adrenoprivas disminuye la eliminación de histamina con el aumento de la temperatura ambiente, en tanto que en las ratas machos normales en la misma época sucede un discreto aumento.

Resumen

Hemos ensayado varios métodos para valorar la histamina eliminada por la orina y de ellos hemos podido conseguir un método que nos permite con gran precisión determinar la cantidad total de histamina en la orina de ratas. Los resultados que hemos obtenido en ratas normales, en la orina eliminada durante 24 horas son de 4.6060 µg. con unos límites de confianza comprendidos entre 6.9522 µg. y 3.1879 µg.

Los resultados obtenidos para ratas machos adrenalectomizadas son de 27.5282 µg. de histamina en la orina eliminada en 24 horas con unos límites de confianza comprendidos entre 42.6868 µg. y 17.7624 µg.

La alimentación de las ratas no interfiere con nuestros resultados porque ambos lotes, normales y operadas, fueron sometidas a la misma dieta.

La temperatura es un importante factor que debe ser controlado, en ambos lotes de ratas, porque los resultados están sujetos a variaciones.

Todos los resultados experimentales fueron bloqueados con un antihistamínico de síntesis.

Summary

Influence of the adrenal capsules in the elimination of histamine through the kidneys of male rats

We test many methods to measure the amount of histamine in urine and we take from each known method a part and form a new and original method

which allows us to determine with great accuracy the total amount of histamine in the urine of rats. The results that we have obtained by testing normal rats in the elimination of urine over a period of 24 h was 4.6060 µg with a fluctuation between 6.9522 µg and 3.1879 µg.

The results in rats operated on for adrenal capsules was 27.5282 µg of histamine for a period of 24 h of urine with a fluctuation between 42.6868 µg and 17.8624 µg.

The food of the rats does not interfere with our results because both the normal and the operated rats had the same diet.

The temperature ist a very important factor to be checked, both in normal and in adrenalectomizades rats, beacause the results are subject to variations.

In all experiments the results were blocked with an antihistamine of sintesis.

Bibliografía

(1) ANREP, G. V., AYADI, G. S., BARSOUM, J. R., SMITH y TALLAT, M. M. : *J. Physiol.*, **103**, 155. 1944.

(2) BATLET, A. L., y LOCKET, F. : *J. Physiol*, **147**, 51--57, 1959.

(3) BARSOUM ,G. S., y GADDUM, J. H. : *J. Physiol.*, **85**, 1, 1935.

(4) BEST, C. H., y MAC HENRY, E. W. : *J. Physiol.*, **70**, 349, 1930.

(5) BERGSTRON, S., y HANSSON, G. : *Acta Physiol. Scand.*, **22**, 77, 1951.

(6) CODE, C. F. : *Physiol.*, **89**, 257, 1937.

(7) FRAILE, A., y GOÑALONS, E. : *R. esp. Fisiol.*, **20**, 2, 53, 1964.

(8) DUNER, H., y PERNOOW, B. : *Clin. Lab. Inv. Journal, Scand.*, **8**, 296, 1956.

(9) KARADY, y BROWNE, R. : *J. Physiol.*, **130**, 539-542, 1940.

(10) KAMESBARAN, L. : *J. Physiol.*, **154**, 138-149, 1949.

(11) LE BLANC, J. : *Am. J. Physiol.*, **204**, 3, 520-522, 1963.

(12) NETTER, K. L. : *Am. J. Physiol.*, **224**, 202, 1961.

(13) ROBERTS, M., y ADAM, H. M. : *Brit. J. Pharmacol.*, **5**, 526-541, 1950.

(14) ROSE, B., y BROWNE, J.S.L. : *Am. J. Physiol.*, **131**, 589-600, 1940.

(15) WATON, N. G. : *Brit. J. Pharmacology*, **11**, 119-127, 1956.