

Laboratorio de Fisiología Animal Aplicada
Facultad de Farmacia
Barcelona

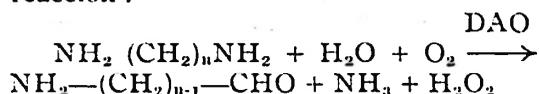
Determinación manométrica de la histaminasa

por

M. Morales (*) y A. Fraile

(Recibido para publicar el 27 de julio de 1965)

Se sabe hoy que la principal vía metabólica de la histamina en la rata es su destrucción por la histaminasa (diaminoxidasa: DAO) (13-12). La reacción química catalizada por la DAO se explica, según ZELLER (18), por la siguiente reacción:



La posible identidad entre la histaminasa y la DAO ha sido muy debatida; GORYACHENKOVA (4), en el año 1958, expresa sus dudas a este respecto, y en 1962, KAPPELLER-ADLER y MAC FARLANE (7) logran obtener un preparado de histaminasa con actividad específica sobre la histamina y sin actividad sobre otras diaminas. No es nuestro propósito ahondar en esta cuestión y nos limitaremos a exponer nuestros resultados trabajando con extractos no purificados.

Material y métodos

1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD HISTAMINÁSICA

Analizando los diferentes métodos de

preparación de la histaminasa se observa que algunos autores proponen en alguna fase del proceso una diálisis del extracto como medio de aumentar su actividad específica (1, 9, 17, 19). ARVIDSSON (1) parte de riñones de cerdo recién sacrificado, limpios de tejido conectivo y privados de la parte medular. El resto se trocea y tritura con ayuda de medios mecánicos. La papilla resultante se pesa y macera con un volumen igual de solución fisiológica durante 10 minutos a 62° C. Se filtra por papel durante 12 horas a 4° C y al filtrado se le adiciona un 40 % de acetona, en volumen. El precipitado obtenido se disuelve en la menor cantidad posible de solución de ClNa al 2,5 %, descartándose por decantación el residuo insoluble. La solución se trata con sulfato amónico hasta una concentración del 50 %. Se deja en reposo durante 30 minutos y se descarta el precipitado. Se aumenta la concentración del

(*) Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación, del Patronato de Protección Escolar.

sulfato amónico hasta el 75 % y se deja en reposo durante 2 horas. El precipitado obtenido se disuelve en la menor cantidad posible de agua y se dializa durante 48 horas a 4° C contra una solución de ClNa al 2,5 %, que se cambia cada 12 horas. El líquido resultante es la solución concentrada de histaminasa, que según ARVIDSON se conserva durante un mes y para cuyo ensayo se diluye el 1/1000.

Por el contrario, en el método de KAPPELLER-ADLER (6), propuesto en 1949, se prescinde de la diálisis. Se parte igualmente de riñones de cerdo, que se limpian y reducen a papilla igual que en el método anterior. Esta papilla se trata con 4 volúmenes (P/V) de acetona enfriada a 4° C. Se filtra con ayuda del vacío y se deja secar el polvo extendiéndolo en capa fina. El polvo seco se pesa y se extrae con solución fisiológica a 62° C durante 10 minutos, a razón de 10 ml por gramo de polvo. A continuación se filtra por papel y se obtiene así el extracto histaminásico bruto. Si es preciso, se continúa la purificación por medio de 2 precipitaciones sucesivas con sulfato amónico al 50 % y disolución de este segundo precipitado en un volumen de agua un 30 % menor que el volumen de partida. Se puede purificar aún más adsorbiendo el enzima en fosfato cálcico gelatinoso, eluyéndolo con una solución tampón de fosfatos de pH 7,2 que contiene sulfato amónico al 30 %. Los líquidos resultantes se tratan con más sulfato amónico, esta vez al 60 %,

y el precipitado se disuelve en la menor cantidad posible de agua. Este extracto es unas 26 veces más activo que el extracto bruto de que se había partido.

Puestos a prueba ambos métodos encontramos que los extractos obtenidos por técnicas en que interviene la diálisis carecían de actividad, mientras que los obtenidos por la otra técnica se mostraban activos.

Se estudió seguidamente cuál era la concentración óptima de sulfato amónico y durante cuánto tiempo tenía que actuar éste, llegándose a la conclusión de que los mejores resultados se obtenían al emplearlos a una concentración del 50 % durante 24 horas, con lo que se lograban incrementos de actividad de un 73 % respecto de la actividad del extracto bruto de que habíamos partido.

Estudiamos también la influencia de la diálisis contra agua destilada y contra solución de ClNa al 1 %, sobre los extractos crudos (A) o purificados por precipitación con sulfato amónico conforme la técnica antes descrita (B), obteniéndose los resultados que figuran en la Tabla I.

En esta tabla se observa claramente la influencia negativa de la diálisis sobre la actividad enzimática de los extractos purificados y su inoperancia cuando se trata de extractos crudos. Las pequeñas variaciones registradas en este último caso son inferiores al error propio del método manométrico, que se cifra en un 8,3 %.

En el intestino de rata la riqueza enzi-

TABLA I
Influencia de la diálisis sobre los extractos enzimáticos ricos en histaminasa.

Ext.	N.º determinaciones	Actividad inicial uM/mg	Actividad postdiálisis H ₂ O uM/mg	Actividad postdiálisis ClNa uM/mg	Variación %
A	4	72,2	—	71,5	—1,01
A	4	72,2	73,7	—	+2,02
B	3	94,9	—	39,4	—58,4
B	3	94,9	35,0	—	—63,0

mática es unas 100 veces menor que en el riñón de cerdo y por consiguiente la técnica descrita no nos sirve. El procedimiento que desarrollamos, con buen resultado, es como sigue: se somete la rata a un ayuno de 24 horas antes de su sacrificio, e inmediatamente se extrae la totalidad del intestino delgado, limpiándolo mecánicamente. Se corta longitudinalmente y se trocea en pedazos de aproximadamente 1 cm de longitud. Se lava 3 veces con 200 ml de acetona enfriada a 4° C y se extienden los pedazos de intestino sobre papel de filtro para que se sequen. La reducción de peso que sufre el intestino es aproximadamente de un 66 %. Se toma un peso conocido y se tritura durante 5 minutos en un mortero de paredes y pistilo esmerilados, con sílice pura que se añade en cantidad suficiente para formar una pasta. Se añade entonces solución de ClNa al 1 % a razón de 25 ml por cada 4 g de intestino tratado con acetona. Se deslie la pasta en el mortero y se pasa a un homogeneizador, en donde se tiene 5 minutos. A continuación se vierte el homogenado y la sílice en un erlenmeyer, que se calienta a baño maría a 62° C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se agita y vierte en tubos de centrifuga, que se someten a enérgica centrifugación durante 10 minutos, recogiendo entonces los líquidos sobrenadantes por decantación. Finalmente se filtran estos líquidos para retener las partículas de grasa que sobrenadan, y el filtrado es ya el extracto enzimático listo para su ensayo. Si se trabaja con hígado de rata la cantidad de líquido extractivo ha de ser un 50 % menor.

2. MÉTODO DE VALORACIÓN

El método de valoración que hemos seguido está basado en la medida del consumo de oxígeno que se produce al actuar el enzima sobre el substrato. Este método ha sido ampliamente usado (3,

5, 6, 8, 14, 15, 16, 18, 19). Aunque con pequeñas variaciones, la técnica general es la siguiente: en un matraz de Warburg se incuba el enzima en un medio tamponado a pH 7,2-7,8, utilizando el diclorhidrato de histamina como substrato y en atmósfera de oxígeno. En el sistema cerrado hay un recipiente aislado que contiene KOH para fijar el CO₂ que se pudiese formar. La temperatura de incubación oscila de 37 a 38° C según los autores.

Nosotros seguimos básicamente esta técnica, introduciendo en ella el uso del diclorhidrato de cadaverina como substrato, pues según BLASHKO (3), al actuar la histaminasa sobre la cadaverina, el gasto de oxígeno es superior al que se registra al actuar sobre la histamina. Comprobamos experimentalmente este aserto, encontrando un aumento en el consumo de oxígeno de un 92 %, lo cual hace que la sensibilidad de nuestro método quede prácticamente doblada.

Las condiciones de trabajo en Warburg, según nuestra técnica, son las siguientes: en el matraz se colocan 3 ml de solución tampón de fosfatos 67 mM, de pH 7,4, de acuerdo con el tipo de tampón preconizado por LINDELL (11), y 1 ml del extracto enzimático a ensayar. En el pocillo central se colocan 0,2 ml de KOH al 20 % y un papel de filtro de 1 cm de lado doblado en cuatro dobleces a fin de aumentar la superficie de contacto de la KOH. En la tubuladura lateral se colocan 0,5 ml de solución 50 mM de diclorhidrato de cadaverina. La atmósfera del sistema es de oxígeno y la temperatura de incubación de 37° C \pm 0,05° C. La amplitud de la agitación es de 7,5 cm y su frecuencia de 100 por minuto. En aquellos casos en que se trabaja con extractos muy pobres se colocan 2 ml del extracto enzimático y 2 ml de solución tampón a fin de mantener invariado el volumen total de 4,7 ml, y luego se refiere el gasto de oxígeno al correspondiente a sólo 1 ml del extracto enzimático,

Simultáneamente con esta determinación en el Warburg se determinan las proteínas del extracto por el método de Kjeldahl, precipitándolas con ácido tricloroacético a la concentración final del 20 % y empleando como factor de conversión el de 6,25.

3. UNIDAD

En la bibliografía referente a la histaminasa hay descritas muchas unidades empíricas que no están referidas a la cantidad de histamina destruida. Para no caer en este defecto, al hacer los trabajos conducentes a definir nuestra unidad (unidad M) preparamos nuestras experiencias empleando simultánea y separadamente como sustratos el diclorhidrato de cadaverina 50 mM y el fosfato de histamina 50 mM (expresado en base). En estas experiencias medimos los consumos de oxígeno que se registraban al actuar el enzima sobre los sustratos y además valoramos biológicamente la histamina que no había resultado destruida por la acción enzimática.

Resultado final de estas determinaciones fue el poder definir la unidad M como la actividad de 1 ml del extracto enzimático que, incubado con la cadaverina en las condiciones establecidas ($V_t = 4,7$ ml; 3 ml de solución tampón 67 mM de pH 7,4; 1 ml de extracto enzimático; 0,2 ml de KOH al 20 %; 0,5 ml de diclorhidrato de cadaverina 50 mM; temperatura 37° C y atmósfera de oxígeno), consume 1 μ l de oxígeno por hora.

Este consumo, durante la primera hora de incubación, equivale a la destrucción de 6,28 μ g de histamina base por hora. Con objeto de hacer comparables las diferentes determinaciones se expresan los resultados en unidades M/mg de proteína total presente en el extracto enzimático.

De acuerdo con esta definición resulta que al actuar la histaminasa sobre la his-

tamina se produce un gasto de 1 μ l de oxígeno por cada 12,04 μ g de histamina base destruidos o, lo que es igual, un gasto de 0,083 μ l de oxígeno por cada μ g de histamina base destruida. Al actuar la histaminasa sobre la cadaverina los consumos son aproximadamente dobles, correspondiendo un gasto de 0,159 μ l de oxígeno por cada μ g de histamina base que se habría destruido. En esto se funda precisamente nuestra variante de emplear la cadaverina en lugar de la histamina como sustrato, y del gasto medido al actuar la histaminasa sobre esta diamina deducir la cantidad de histamina base que habría sido destruida si ésta hubiera actuado como sustrato. La relación de conversión es: 1 μ l de oxígeno gastado al cabo de la primera hora frente a cadaverina equivale a la destrucción de 6,28 μ g de histamina base.

4. ANÁLISIS DE LA REACCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO

Se sabe desde los trabajos de BEST y MAC HENRY en 1930 (2), que al actuar la histaminasa sobre el sustrato se produce un gasto de oxígeno, pero la forma como transcurre este gasto ha despertado escaso interés a lo largo de los años. Tan sólo hemos encontrado un trabajo de LINDELL (10), correspondiente a 1957, en que afirma que el consumo es lineal a lo largo de los 20 primeros minutos de la reacción. Dado que cuanto mayor es el tiempo de incubación menor debe ser el error cometido en la determinación, interesa saber si hay paralelismo entre el consumo de oxígeno y la destrucción de histamina a lo largo del tiempo. Con este objeto hicimos experiencias midiendo el consumo de oxígeno y valorando la histamina remanente después de la actuación del enzima en una forma seriada al cabo de 1, 2 y 3 horas de incubación. Una vez transcurridos estos tiempos se procedió a acidificar la mezcla reaccio-

nante con 0,5 ml de CIH concentrado y se llevó a baño maría a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, estos líquidos se diluyeron convenientemente y se valoró la histamina remanente empleando el fleo de cobaya. El cálculo del resultado se hizo por el método de las (2 + 2) dosis y tres grupos de permutaciones. El resultado fue que al cabo de 1 hora se había destruido el 10 % de la histamina presente, a las 2 horas el 24,8 % y a las 3 horas no se encontró mayor destrucción, lo cual hace dudar de que la reacción transcurra durante tiempo indefinido.

Determinamos entonces el consumo de oxígeno con 12 extractos diferentes, ob-

TABLA II

Consumo de O₂ verificado por 12 extractos diferentes durante períodos sucesivos de 10 minutos.

Tiempos	Gasto en $\mu\text{l O}_2$
0 — 10 min.	180,68
10 — 20 "	217,62
20 — 30 "	223,08
30 — 40 "	219,32
40 — 50 "	217,46
50 — 60 "	210,00

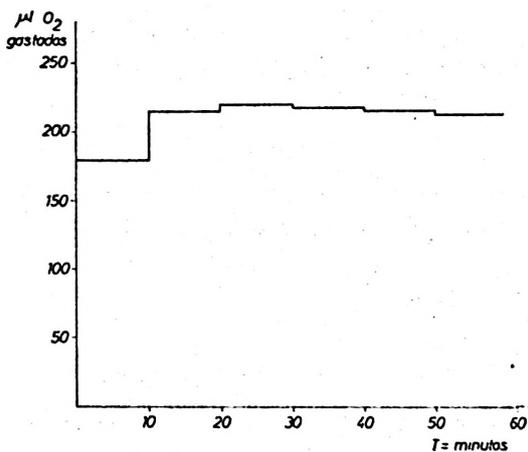


FIG. 1. Representación gráfica de los consumos de O₂ medidos de 10 en 10 minutos.

TABLA III

Consumo activo de O₂ verificado por 12 extractos distintos a lo largo de la primera hora de actuación del enzima.

Tiempo	Gasto en $\mu\text{l O}_2$
10 min.	180,68
20 "	398,30
30 "	621,38
40 "	840,70
50 "	1058,16
60 "	1268,16

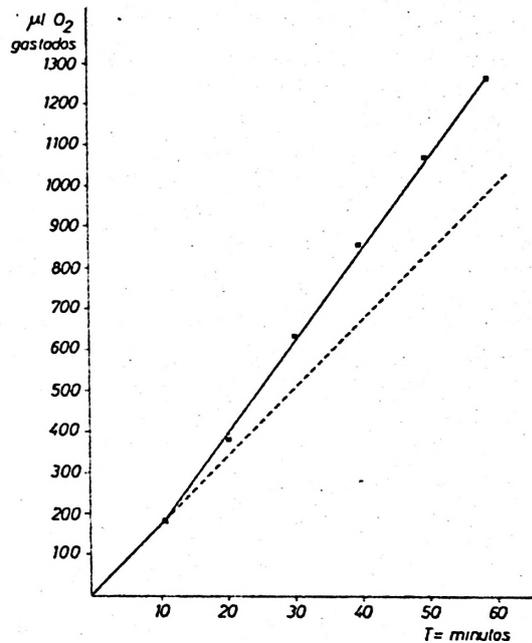


FIG. 2. Gráfica representativa del consumo aditivo de O₂ a lo largo de la primera hora de reacción enzimática.

tenidos por distintos procedimientos, a lo largo de 1 hora, haciendo las lecturas cada 10 minutos y sumando los consumos de todos los extractos durante cada período de 10 minutos. El resultado se expresa en la Tabla II y se representa en la fig. 1.

De la observación de la tabla II y de

la fig. 1 se desprende claramente que: 1.º la reacción tiene un período de latencia durante los 10 primeros minutos, en que el gasto de oxígeno es sensiblemente menor al que se registra en los demás intervalos de 10 minutos, y 2.º a partir del minuto 10 la reacción transcurre en línea recta.

Si sumamos acumulativamente los datos de la tabla II de forma que obtengamos el consumo total del conjunto de extractos a lo largo del tiempo, obtendremos los datos que reseñamos en la tabla III, que a su vez se representan gráficamente en la fig. 2, permitiéndonos visualizar la forma rectilínea en que transcurre la reacción a partir del minuto 10 hasta el fin de la primera hora.

En conclusión: las experiencias anteriores prueban que el consumo de oxígeno en la reacción histamina-histaminasa transcurre en forma lineal a partir de los 10 minutos siguientes a la mezcla del enzima con el substrato y se mantiene así hasta el fin de la primera hora. Durante este período existe paralelismo entre el consumo de oxígeno y la destrucción de histamina. Es dudoso que este paralelismo se mantenga posteriormente.

Resumen

Se discuten las diferentes técnicas de obtención de histaminasa a partir de riñón de cerdo, analizando los inconvenientes que presenta la diálisis de los extractos enzimáticos. Se pasa revista a las dificultades encontradas al querer obtener extractos enzimáticos a partir de órganos de la rata y se explica detalladamente la técnica a seguir a fin de conseguirlos. Se propone un método de valoración fundado en técnicas manométricas, empleando como substrato la cadaverina y justificando el porqué de esta elección. Se define la denominada unidad M para medir la riqueza enzimática de un extracto y se relaciona de forma sencilla y clara dicha unidad con la cantidad de histamina destruida. Finalmente se analiza la forma en que transcurre el gasto de oxígeno a través del tiempo, poniendo de relieve la existencia de un período de latencia al veri-

ficar la mezcla del enzima con el substrato, al que sigue una fase en que el gasto de oxígeno es lineal y paralelo a la destrucción del substrato. Es dudoso que este paralelismo se mantenga posteriormente.

Summary

Manometric determination of histaminase

A critical review is made on the different ways to obtain histaminase active extracts from the pig's kidney. Special attention is given to the use of dialysis in those techniques. Histaminase active extracts are obtained from intestine and liver of the rat, and the troubles solved to succeed as well as the procedure used are analyzed. A method to measure histaminase activity based in manometric techniques using cadaverine dihydrochloride as substrate is developed. The preference for cadaverine is justified and a new unit, the M unit, is established and easily related to the amount of histamine destroyed. The rate of oxygen uptake during the enzyme-substrate reaction is analyzed; a period of latency in the consumption of oxygen is demonstrated at the mixture of the enzyme with the substrate. After that period a linear correlation is found between oxygen uptake and histamine destruction during the first hour. It is doubtful that this correlation remains constant for a longer period.

Bibliografía

- (1) ARVIDSSON, U. B., PERNOW, B. and SWEDIN, B.: *Acta Physiol. Scand.*, **35**, 338, 1956.
- (2) BEST, C. H. and MAC HENRY, E. W.: *J. Physiol.*, **70**, 319, 1930.
- (3) BLASCHKO, H. and HAWKINS, J.: *Brit. J. Pharmacol. Chemol.*, **5**, 625, 1950.
- (4) GORYACHENKOVA, E. V.: *Doklady (Akad. Nauk. S.S.S.R.)*, **123**, 898, 1958.
- (5) HASSB, K. and MARSACK, H.: *Biochem. Z.*, **327**, 296, 1955.

- (6) KAPPELLER-ADLER, R. : *Biochem. J.*, **44**, 70, 1949.
- (7) KAPPELLER-ADLER, R. and MAC FARLANE, H. : *Biochem. J.*, **82**, 49, 1962.
- (8) LASKOWSKI, M. J. : *J. Biol. chem.*, **145**, 457, 1942.
- (9) LASKOWSKI, M., LEMLEY, J. and KEITH, C. : *Arch. Biochem.*, **6**, 105-13, 1945.
- (10) LINDELL, S. E., and WESTLING, H. : *Acta Physiol. Scand.*, **39**, 370-84, 1957.
- (11) LINDELL, S. E. : *Acta Physiol. Scand.*, **41**, 168-86, 1957.
- (12) SHAYER, R. W. : *J. Biol. Chem.*, **196**, 469, 1952.
- (13) SHAYER, R. W. : *Brit. J. Pharmacol.*, **11**, 472, 1956.
- (14) STEPHENSON, N. R. : *J. Biol. Chem.*, **149**, 169, 1943.
- (15) SWEDIN, B. : *Acta med. Scand.*, **114**, 210, 1943.
- (16) TABOR, H. : *J. Biol. Chem.*, **192**, 251, 1951.
- (17) VAISBERG, M. J. : *Lab. Clin. Med.*, **27**, 628-34, 1942.
- (18) ZELLER, E. A. : *Helv. Chem. Acta.*, **21**, 880-90, 1938.
- (19) ZELLER, E. A. and BIRKHAUSER, H. : *Schweiz. med. Wschr.*, **70**, 975-76, 1940.

