

Laboratorio de Fisiología Animal Aplicada
Facultad de Farmacia, Barcelona.

Factores que influyen sobre la destrucción enzimática de la histamina(*)

por

A. Fraile y M. Morales (**)

(Recibido para publicar el 13 de octubre de 1965)

El método manométrico para la determinación de la histaminasa (diaminooxidasa, DAO) tiene la ventaja de ser rápido y sensible, sobre todo, cuando se utiliza cadaverina en vez de histamina como sustrato (1, 8). Pero nuestra experiencia de varios años nos ha hecho dudar de su exactitud si no se fijan rigurosamente las condiciones de trabajo. Así, cuando tratamos de establecer la equivalencia entre el oxígeno consumido en la reacción y la cantidad de histamina destruida, a diferentes concentraciones del sustrato, los valores obtenidos estaban muy lejos de ser constantes. Asimismo hemos comprobado que el gasto de oxígeno continúa aún después de haberse destruido toda la histamina incorporada al sistema reaccionante. En este trabajo se estudia la influencia de la concentración y la naturaleza del sustrato sobre la reacción enzimática desencadenada por la DAO.

Métodos

Preparación del enzima. — Utilizamos un extracto parcialmente purificado de

riñón de cerdo, que se prepara según la técnica descrita por KAPELLER-ADLER (5). Un mililitro del extracto equivale a 0,3 gr. del órgano fresco.

Técnica manométrica. — Empleamos un aparato de Warburg circular, regulado a $37 \pm 0,05^\circ \text{C}$, siendo la amplitud de la agitación de 7,5 cm. y su frecuencia de 100 por minuto. En cada matracito se colocan 3 ml. de una solución tampón de fosfatos según LINDELL (7) de pH 7,4, y 1 ml. del extracto enzimático; en el pocillo central 0,2 ml. de KOH al 20 %; y en la tubuladura lateral 0,5 ml. de la solución del sustrato. La reacción se verifica en atmósfera de oxígeno. Como sustrato empleamos diclorhidrato de histamina, fosfato de histamina o diclorhidrato de cadaverina, a diferentes concentraciones, que expresaremos siempre

(*) Trabajo subvencionado por el «Fondo para el Fomento de la Investigación en la Universidad».

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

en mM de la base por litro de la mezcla reaccionante. En cada serie de determinaciones se destinan dos elementos del equipo manométrico al papel de termobarómetros. Cada valor experimental es la media de 2—3 resultados individuales simultáneos.

Valoración de la histamina. — La histamina remanente en los matraces al cabo del período de incubación correspondiente, se valora sobre feto de cobayo (en baño de órganos de 25 ml. de capacidad, a 32° C de temperatura y empleando solución de Tyrode atropinizada como líquido de perfusión) frente a una mezcla análoga a la que se valora, preparada simultáneamente y en la que se inactiva inmediatamente el enzima añadiendo 0,5 ml. de ClH concentrado y llevando a baño maría a ebullición durante 5 minutos. Una inactivación similar sufren los problemas una vez transcurrido el período de incubación. Todos los líquidos son neutralizados y diluidos en el grado conveniente antes de proceder a su ensayo biológico.

tanto mayor cuanto mayor es la concentración del enzima. En la figura 1, por ejemplo, se representan los gastos de oxígeno a intervalos de 15 minutos cuanto el extracto enzimático original (1/1) se diluyó al 1/2 y al 1/4. Se empleó como sustrato el diclorhidrato de histamina a una concentración final de 0,4 mM/l. Puede observarse que, con la concentración más alta de enzima, el consumo de oxígeno declina a partir de los 45 minutos de incubación, indicando un agotamiento del sustrato. Pero antes de llegar a este punto, o bien extrapolando la fase rectilínea de la gráfica, la proporcionalidad entre gasto de oxígeno y concentración enzimática se mantiene dentro de límites aceptables.

Influencia de la concentración del sustrato. — Hemos resumido en las figuras 2 y 3 nuestros resultados con un mismo extracto enzimático y concentraciones variables de sustrato, que van de 0,2 a 5 mM/l., de histamina base. Se representan en escalas diferentes debido a la gran duración de las experiencias correspon-

Resultados

Concentración enzimática y consumo de oxígeno. — Como era de esperar, la velocidad de consumo de oxígeno es

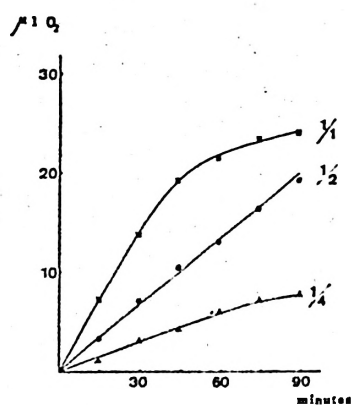


FIG. 1. Curvas de consumo de oxígeno, con diferentes diluciones del extracto enzimático (histaminasa).

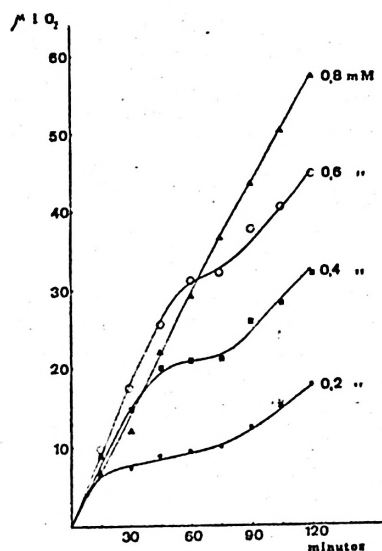


FIG. 2. Curvas de consumo de oxígeno, con diferentes concentraciones del sustrato (diclorhidrato de histamina).

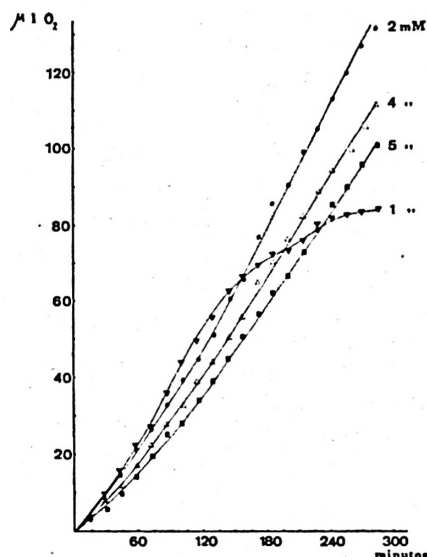


FIG. 3. Curvas de consumo de oxígeno, con diferentes concentraciones del sustrato.

dientes a la figura 3. No obstante, en la figura 4 se recogen, a una misma escala, los 45 primeros minutos de todas las curvas. El estudio de las gráficas nos revela los hechos siguientes:

a) La velocidad de la reacción está influida por la concentración del sustrato, siendo inhibida por éste a concentraciones superiores a 0,6 mM/l.

b) Parecen existir dos procesos bioquímicos responsables del gasto de oxígeno, uno que corresponde a la desapa-

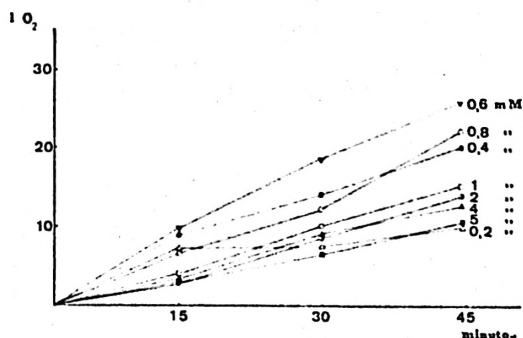


FIG. 4. Consumo de oxígeno durante los 45 primeros minutos de la reacción enzimática, correspondiente a las curvas de las figs. 2 y 3.

rición de la histamina como tal del sistema, y otro que probablemente afecta a los metabolitos formados. Ambos procesos se observan claramente en las curvas 0,2 mM 0,4 mM y 0,6 mM, debido al agotamiento del sustrato, y quedan enmascarados en las de mayor concentración por superponerse las reacciones. Se comprobó biológicamente la total destrucción de la histamina coincidiendo con el inicio de la zona horizontal de las tres curvas citadas.

Influencia de la naturaleza del sustrato. — Es sabido que el consumo de oxí-

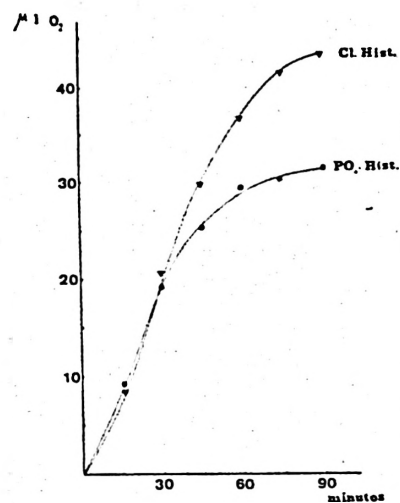


FIG. 5. Curvas de consumo de oxígeno, con dos sustratos diferentes (diclorhidrato de histamina y fosfato de histamina) a la misma concentración de histamina base.

geno es mayor si se emplea cadaverina como sustrato que cuando se utiliza histamina (1, 8). Nosotros hemos observado también que incluso con diferentes sales de histamina, a la misma concentración molar de la base, se obtienen gastos de oxígeno diferentes. En la figura 5 se representan comparativamente los consumos de oxígeno durante 90 minutos cuando se emplean como sustratos el diclorhidrato y el fosfato de histamina a la concentración final de 0,5 mM/l en ambos casos. Tanto en éste como en

otros ensayos paralelos con concentraciones de 0,7 y de 1,0 mM/l., se observó un consumo de oxígeno mayor con el diclorhidrato. Este hecho obliga a trabajar siempre con el mismo sustrato si se quiere obtener resultados comparables.

Relación entre el consumo de oxígeno y la destrucción de histamina. — En un intento de relacionar el consumo de oxígeno con la cantidad de histamina destruida, incubamos concentraciones variables de diclorhidrato de histamina con idénticas cantidades de enzima, durante 1 hora, midiendo el oxígeno gastado en la reacción y determinando biológica-

mente la histamina remanente. En la Tabla I se consignan los resultados obtenidos. Puede apreciarse que los valores hallados oscilan entre límites muy amplios, lo que era de suponer si tenemos en cuenta lo dicho anteriormente acerca de los dos procesos oxidativos concomitantes. A pesar de todo, dentro de una misma concentración de sustrato, el cociente $\mu\text{O}_2/\mu\text{g HB}$ es bastante homogéneo y asimismo resultan concordantes las cifras correspondientes a las concentraciones 0,5 y 1 mM/l. Tomando como representativo el valor medio de las nueve determinaciones señaladas en la ta-

TABLA I

Oxígeno consumido e histamina destruida, al cabo de una hora de incubación con histaminasa frente a diferentes concentraciones de diclorhidrato de histamina.

Concentración sustrato	$\mu\text{g HB total}$	$\mu\text{g HB destruidos}$	% destrucción	$\mu\text{l O}_2$ consumidos	$\mu\text{l O}_2/\mu\text{g HB}$
0,2 mM/1	100	100	100	11,5	0,115
0,4 mM/1	200	200	100	18,3	0,091
0,4 mM/1	200	186	93	11,9	0,080
0,4 mM/1	200	200	100	17,2	0,086
0,4 mM/1	200	200	100	17,0	0,084
0,5 mM/1	250	250	100	19,7	0,106
0,5 mM/1	250	200	80	17,4	0,086
0,5 mM/1	250	150	60	12,2	0,082
1 mM/1	500	195	39	16,9	0,086
1 mM/1	500	198	37	16,2	0,086
1 mM/1	500	188	37	15,3	0,081
1 mM/1	500	182	36	14,8	0,081
1 mM/1	500	144	28	12,3	0,085
1 mM/1	500	179	36	14,9	0,083
1 mM/1	500	235	47	19,3	0,082
2 mM/1	1000	232	23	13,2	0,057
3 mM/1	1500	215	14	10,6	0,049
4 mM/1	2000	670	33	18,4	0,027
5 mM/1	2500	580	23	18,6	0,032
5,5 mM/1	2750	255	9	10,0	0,039
5,5 mM/1	2750	330	12	12,0	0,036

M = 0,083

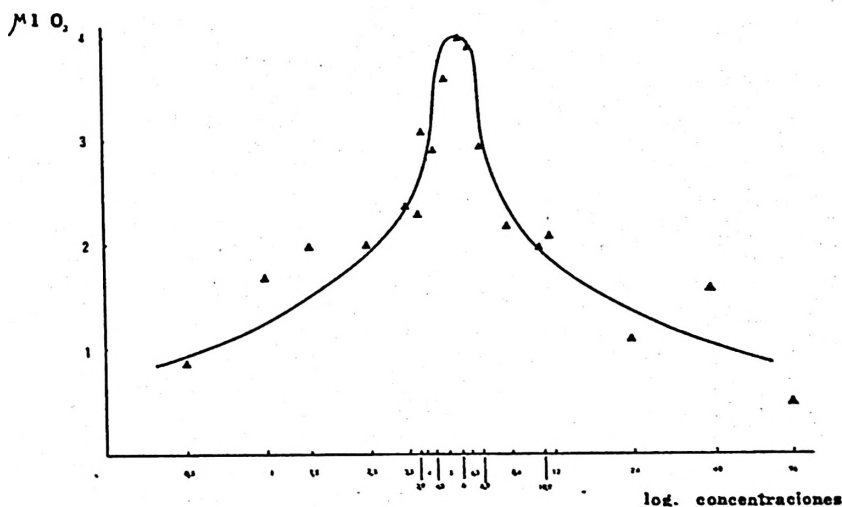
bla I, obtenemos como relación entre consumo de oxígeno y destrucción de histamina, la de $0,083 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ HB.

Discusión

Según la reacción propuesta por ZELER (10) para la destrucción enzimática de las diaminas, se gastaría un mol de oxígeno por cada mol de sustrato. Trabajando con extractos no purificados del enzima, LASKOWSKI (6) confirmó esta

imidazolacético. Cabría admitir un fenómeno similar para explicar las dos fases de que parece constar la reacción histamina-histaminasa, según hemos puesto de manifiesto, si bien desconocemos la naturaleza del agente responsable.

La inhibición por exceso de sustrato se ha citado para varios enzimas, como lípasas y acetilcolinesterasa (9), y se observa entonces que la representación gráfica de las velocidades de la reacción enzimática respecto de los logaritmos de



F)fi. 6. Representación gráfica de las velocidades de la reacción enzimática respecto de los logaritmos de las concentraciones del sustrato.

proporción. Pero los resultados están afectados por el grado de purificación del enzima y por la presencia de determinadas sustancias, como, por ejemplo, la hemoglobina, el cobre (2), etc. Este último trabajo es importante, desde nuestro punto de vista, porque pone de manifiesto que al añadir una sal de cobre aumenta notablemente el consumo de oxígeno a pesar de que no hay mayor destrucción de histamina. La explicación de este hecho, según BRUNS (4), sería que el cobre cataliza una posterior oxidación del imidazolacetaldehído a ácido

las concentraciones del sustrato es una curva simétrica en forma de campana (3). Aunque las gráficas de las figuras 2, 3 y 4 son ya suficientemente demostrativas de la existencia de un proceso de inhibición, obtuvimos la figura 6, en la que la velocidad de la reacción viene expresada por el consumo de oxígeno en μl al cabo de los primeros 10 minutos, y se empleó diclorhidrato de histamina como sustrato. El pico de la curva coincide sensiblemente con el intervalo de concentraciones en que la relación $\mu\text{l O}_2/\mu\text{g}$ HB es igual a $0,083$. Según esto, la cons-

tante de Michaelis «aparente» es del orden de $27,6 \times 10^{-5}$ M.

En un trabajo anterior (8) hemos señalado la forma sigmoidea de la curva de gasto de oxígeno en función del tiempo, que no en todos los casos aparece. Así, por ejemplo, se aprecia claramente en las figuras 3 y 4 para las concentraciones de sustrato superiores a 0,8 mM/l., precisamente cuando se manifiesta el fenómeno de inhibición por el sustrato al que antes nos hemos referido. Por otra parte debemos considerar que los dos procesos oxidativos responsables del gasto total de oxígeno se superponen cuando la concentración del sustrato es elevada, lo que evidentemente hará aumentar de manera gradual la velocidad de consumo de oxígeno a partir de un momento dado. Ambos factores, la inhibición por el sustrato y la oxidación de los metabolitos primarios, parecen ser los responsables de la forma sigmoidea de la curva.

Conclusiones

El método manométrico para la determinación de histaminasa tiene una gran sensibilidad y buena discriminación, pero se requiere fijar rigurosamente las condiciones de trabajo para obtener resultados comparables.

La naturaleza del sustrato tiene una decisiva influencia sobre el consumo de oxígeno en la reacción enzimática.

Se observa un fenómeno de inhibición por exceso de sustrato que, trabajando con diclorhidrato de histamina, se manifiesta a partir de una concentración de 0,6 mM HB/l.

Parecen coexistir dos procesos químicos responsables del gasto de oxígeno, que aparecen disociados cuando se agota el sustrato.

La relación entre consumo de oxígeno y destrucción de histamina es de $0,083 \mu\text{lO}_2/\mu\text{g}$ HB, cuando se emplea el diclorhidrato de histamina a concentraciones

de 0,5—1 mM/l. de la base, y en las condiciones que se especifican en este trabajo.

Resumen

Se estudia la influencia de la concentración del enzima, y de la naturaleza y la concentración del sustrato, sobre el consumo de oxígeno que acompaña a la reacción desencadenada por la histaminasa. La velocidad de consumo de O_2 es proporcional a la concentración del enzima cuando permanecen constantes la naturaleza y la concentración del sustrato. Para un mismo extracto enzimático, el gasto de oxígeno depende del sustrato empleado y de su concentración. No sólo se obtienen gastos de oxígeno diferentes con distintas diaminas, sino incluso con sales diferentes de una misma (clorhidrato y fosfato de histamina). La influencia de la concentración del sustrato corresponde a un fenómeno de inhibición por exceso de sustrato, que se manifiesta a partir de 0,6 mM HB/l. El consumo de oxígeno a lo largo del tiempo parece depender de dos procesos químicos concomitantes, uno de los cuales corresponde a la desaparición de la histamina del sistema y el otro afecta probablemente a los metabolitos formados en primer lugar. Como era de suponer, en vista de los hechos señalados, la relación entre consumo de oxígeno y destrucción de histamina varía según las condiciones de trabajo; pero con concentraciones de diclorhidrato de histamina del orden de 0,5—1 mM HB/l, y el cabo de 1 hora de incubación, dicha relación es bastante constante y equivale a $0,083 \mu\text{l O}_2/\mu\text{g}$ HB,

Summary

Enzymatic destruction of histamine; study of the factors involved

The influence of the enzyme concentration, as well as that of the kind and concentration of the substrate, upon the oxygen uptake when histaminase acts on histamine is studied. When the substrate and its concentration remain constant the oxygen uptake rate is proportional to the enzyme concentration. For different samples of the same enzyme preparation the oxygen uptake depends of the kind

and concentration of the substrate employed. When different diamines are employed as substrate, different results are attained, and even when the salt of the same amine changes (histamine dihydrochloride to fosfate) the total oxygen uptake changes. The influence of substrate concentration works through an inhibition produced by substrate «surplus», starting at concentrations of 0,6 mM HB/l. The oxygen uptake is produced apparently by two different ways; one is the disparison of histamine, and another one due to the oxidation of the metabolites previously formed. Accordingly with the facts previously reviewed the relationship between histamine destruction and oxygen uptake changes when the experimental conditions are different. When histamine dihydrochloride is used at concentrations between 0,5 and 1 mM HB/l. and the reaction spans through one hour, the value of the

relationship is 0,083 $\mu\text{lO}_2/\mu\text{g}$ HB destroyed.

Bibliografía

- (1) BLASCHKO, H. y HAWKINS, J. : *Brit. J. Pharmacol.*, **5**, 625, 1950.
- (2) BORN, G. V. : *Brit. J. Pharmacol. Chemot.*, **8**, 42, 1953.
- (3) BRAY, H. G., WHITE, K. y WOOD, P. B. : *Biochem. J.* **59**, 167, 1955.
- (4) BRUNS, F. y STUTTGEN, G. : *Biochem. Z.*, **322**, 68, 1951.
- (5) KAPPELLER-ADLER, R. : *Biochem. J.* **44** 70, 1949.
- (6) LASKOWSKI, M. J. : *J. Biol. Chem.*, **145**, 457, 1942.
- (7) LINDELL, S. E. : *Acta Physiol. Scand.*, **41**, 168, 1957.
- (8) MORALES, M. y FRAILE, A. : *R. esp. Fisiol.* (en prensa).
- (9) WILSON, I. B. y BERGMANN, F. : *J. Biol. Chem.*, **186**, 683, 1950.
- (10) ZELLER, E. A. : *Helv. Chem. Acta.*, **21**, 880, 1938.

