
**Estudio de la relación entre
migraña e intolerancia a
la histamina de la dieta.
Potencial de algunos
probióticos en su prevención
y tratamiento**

M. Carmen Vidal Carou
Abel Mariné Font | Miquel Moretó
M. Teresa Veciana Nogués
Concepció Amat Miralles
M. Luz Latorre Moratalla | Anna Pérez Bosque
Joan Bosch Fusté | Natalia Toro Funes

Ayudas a la investigación 2012

Equipo de trabajo:

Investigadora Principal:

M. Carmen Vidal Carou

Catedrática de Nutrición y Bromatología. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Equipo investigador:

Abel Mariné Font

Catedrático de Nutrición y Bromatología. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Miquel Moretó

Catedrático de Fisiología. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

M. Teresa Veciana Nogués

Profesora Titular. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Concepció Amat Miralles

Profesora Titular. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

M. Luz Latorre Moratalla

Profesora Ayudante. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Anna Pérez Bosque

Profesora Lector. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Joan Bosch Fusté

Investigador Post-doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Natalia Toro Funes

Investigadora Pre-doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

AUTORES

M. Carmen Vidal Carou

Licenciada y Doctora en Farmacia por la Universidad de Barcelona, actualmente Catedrática de Nutrición y Bromatología de la misma. Inició su carrera investigadora en 1982 y es la directora del Grupo de investigación consolidado "Compuestos bioactivos de los Alimentos" (2014 SGR 1438). Ha participado en más de 60 proyectos de investigación, siendo investigadora principal de un proyecto Europeo y de 22 financiados por organismos públicos de carácter nacional o autonómico. Ha participado en más de 20 contratos con empresas y fue investigadora principal del proyecto CENIT (HENUFOOD FBG 306333) en colaboración con la empresa Bicentury SLU. Autora o co-autora de 120 artículos de investigación (105 en revistas del SCI), 7 artículos de revisión, 4 libros completos y 20 capítulos de libro, así como más de 100 artículos de divulgación científica. Es también colaboradora en prensa escrita, radio y televisión. Su tarea de divulgación ha sido reconocida con el "Premio del Instituto Danone en la divulgación científico- periodística" y con el " Gourmand World Cookbook Awards". En el ámbito académico, actualmente es Jefa de estudios del Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y directora del Master oficial e interuniversitario de Seguridad Alimentaria (Universidad de Barcelona - Universidad Autónoma de Barcelona - Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria - Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya) y Co-directora de varios Cursos de Master y Cursos de Postgrado del "Institute for Life long Learning IL3 " de la UB . Es miembro del Equipo directivo del Campus de la Alimentació de Torribera-UB y directora de la recién creada Cátedra de empresa "UB-Carne y Salud". Ha participado activamente en más de 70 congresos científicos de ámbito nacional e internacional. A lo largo de su carrera profesionales ha sido o es: Vice -Presidenta de la "Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)", Secretaria del "Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA-UB)", miembro del Comité de Expertos sobre Alergias e Intolerancias Alimentarias y del Comité Científico de la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (integrada dentro de la Agencia de Salud Pública) de la Generalidad de Cataluña, miembro del Comité Científico de la "Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN)" (integrada en el Ministerio de Sanidad), vocal de Junta Directiva de la "Sociedad Española de Nutrición (SEN)", vocal de la "Asociación Catalana de Ciencias de la Alimentación (ACCA)" y vocal de la "Sociedad Internacional de Déficit de DAO ".

Abel Mariné Font

Catedrático emérito de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona. Campus de la Alimentación de Torribera. Profesor de las

Universidades de Barcelona (1969-73, 1982 hasta la actualidad) y de Salamanca (1973-1982). Estancias en el Laboratorio de Bioquímica agrícola de la École Nationale Supérieure d'Agriculture de Grignon, Francia (1968/69, 1971). Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca (1980-82) y de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona (1983-86). Director General de Universidades del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya (1986-90). Secretario del "Consell Interuniversitari de Catalunya" (1990-91). Vicepresidente de la CIRIT (Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya) (1991-93). Gestor del "Programa Nacional de Tecnología de Alimentos" de la CICYT – Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (1994-98). Miembro del Cuadro de Expertos en Seguridad de los Alimentos de la OMS (1984-88). Miembro del Board of Directors de ILSI- Europe /International Life Sciences Institute (1989-1997). Coordinador académico del proyecto "UB Bullipedia", creado por Ferran Adrià.

Autor o coautor de unos 200 trabajos, así como de diversos libros y capítulos de libros, sobre Ciencia de los Alimentos y Nutrición. Temas de investigación: Aminas biógenas y Poliaminas en alimentos, Polifenoles y carotenoides en alimentos, Análisis de impurezas en alimentos, Estabilidad y durabilidad en alimentos, Interacciones entre alimentos y medicamentos, Aditivos alimentarios, Derecho alimentario, Propiedades funcionales de los alimentos, Nutrición Comunitaria. Presidente del Comité Científico de la ACSA (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria) y miembro del Consejo Asesor de Salud Pública de la Generalitat de Catalunya.

Miquel Moretó

Catedrático del Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Licenciado (1973) y doctor (1976) en Farmacia por la Universidad de Barcelona (UB) . Estancia postdoctoral en el Department of Physiology del King 's College de Londres (1979) . Responsable del grupo de investigación en Fisiología Digestiva y Adaptaciones Nutricionales, integrado en el Grupo Consolidado de Fisiología y Nutrición Experimental de la Generalidad de Cataluña (2009SGR00471) que pertenece al Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria de la UB . Ha sido director del Departamento de Fisiología - Farmacia (1998-2001), vicerrector de Política Científica (2001-2002) y Director del Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria de la UB (2005 hasta 2013). Editor asociado del European Journal of Nutrition (Heidelberg Alemania; 1998-2010) y Evaluador de la ANEP y de proyectos europeos, área 'Quality of Life and Management of Living Resources' (V Programa Marco). Responsable de 31 proyectos de investigación de convocatorias competitivas y contratos de investigación y transferencia con empresas del sector alimentario. Director o codirector de 9 tesis doctorales. Publicación de 89 artículos en revistas científicas indexadas

y presentación de más de 166 comunicaciones a congresos científicos. Actualmente centra su investigación en el estudio de las propiedades funcionales de proteínas animales en modelos de inflamación y de envejecimiento .

M. Teresa Veciana Nogues

Licenciada en Farmacia, Master en Ciencias de los Alimentos y Nutrición y Doctora en Farmacia por la Universidad de Barcelona. Completa su formación con una estancia post- doctoral "Centre de Génie et Sciences des Aliments" en la facultad de "Sciences et techniques du Languedoc" de la universidad de Montpellier II. Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia desde el año 1997. Inicia sus trabajos de investigación en el grupo liderado la Dra. M. Carmen Vidal, estudiando la génesis de aminas biógenas en alimentos, y las medidas que deben aplicarse para controlar su formación. Además de la investigación en aminas biógenas, ha participado en proyectos de valorización nutricional y de durabilidad. En estos años ha participado en 5 proyectos de investigación de ámbito internacional y 30 de carácter nacional o autonómico y 10 contratos de colaboración con empresas. Su producción científica se traduce en 6 capítulos de libros y cerca de 60 artículos (indexados SCI) . Actualmente es investigadora principal del proyecto (AGL2012-39995) "Nuevas implicaciones de las aminas y poliaminas bioactivas en alimentación y salud".

Concepció Amat Miralles

Profesora Titular del Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Licenciada en Biología (1981) y en Farmacia (1984) y Doctora en Farmacia (1985). Ha desarrollado su actividad científica en el seno del grupo de investigación en Fisiología Digestiva y Adaptaciones Nutricionales, integrado en el Grupo Consolidado de Fisiología y Nutrición Experimental de la Generalidad de Cataluña (2009SGR00471) que pertenece al Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad alimentaria de la Universidad de Barcelona. Se ha dedicado principalmente al estudio de la fisiología intestinal, transporte de nutrientes, permeabilidad intestinal y al estudio de los alimentos funcionales en modelos animales. Ha participado en 40 proyectos de investigación de convocatorias competitivas y proyectos de investigación y transferencia con empresas. Ha publicado 31 artículos en revistas científicas indexadas, presentado 102 comunicaciones a congresos y dirigido dos tesis doctorales. Actualmente centra su investigación en el estudio de la fisiología intestinal en un modelo animal de envejecimiento y en la caracterización de la actividad DAO de diferentes tejidos del ratón.

Mariluz Latorre

Licenciada en Biología por la UAB y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la UB y Doctora por la

Universidad de Barcelona. Desde 2009 es Profesora ayudante del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la UB. En 2003 se incorporó al grupo de investigación Aminas y Poliaminas bioactivas en los alimentos, dirigido por la Dra. M. Carmen Vidal. Su actividad investigadora se centra en el estudio de las aminas biógenas en alimentos y sus implicaciones desde el punto de vista tecnológico y de la salud. Desde entonces ha participado en una gran diversidad de proyectos , destacando el proyecto Europeo TRADISAUSAGE (QLK1 CT- 200202240). Es investigadora principal de cuatro proyectos de investigación concedidos por Sección de Ciencias Biológicas del Institut d'Estudis Catalans. Su producción científica ha sido constante a lo largo de estos años y se ha materializado en 4 capítulos de libro y 17 publicaciones. Desde hace unos años centra su investigación en el estudio de la actividad DAO en microorganismos de interés tecnológico, especialmente probióticos.

Anna Pérez Bosque

Licenciada en Biología por la UB (1999). Doctora en Biología por la UB (2005). Entre 2007 y 2009 ha disfrutado de un contrato post- doctoral Beatriu de Pinós (Generalidad de Cataluña), en colaboración con la empresa APC- Europe, SA , en la que ha trabajado en el Departamento de Investigación y Calidad hasta el diciembre de 2012. En febrero de 2010 obtuvo una plaza de profesora Asociada al departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia y a partir de diciembre de 2012 obtuvo una plaza de profesora Lectora en el mismo departamento. Es miembro del grupo de investigación en Fisiología Digestiva y Adaptaciones Nutricionales, integrado en el Grupo Consolidado de Fisiología y Nutrición Experimental de la Generalidad de Cataluña (2009SGR00471) que pertenece al Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria de la UB (INSA-UB). Ha participado en 13 proyectos de investigación de convocatorias competitivas y de contratos de investigación y transferencia con empresas del sector alimentario. Ha sido investigadora principal de un proyecto de investigación competitivo concedido por l'INSA-UB. Codirectora de 2 tesis doctorales. Ha publicado 13 artículos en revistas científicas indexadas y presentado más de 35 comunicaciones a congresos científicos. Actualmente centra su investigación en el estudio de las propiedades funcionales de proteínas animales en modelos de inflamación y de envejecimiento.

Juan Bosch Fusté

Licenciado en Farmacia y Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la UB. Doctor por la UB en 2007. Desde el año 2008 forma parte del grupo de investigación Aminas y Poliaminas Bioactivas de los Alimentos, dirigido por la Dra. M. Carmen Vidal, dedicado principalmente en la búsqueda de las aminas y poliaminas en alimentos y sus implicaciones en la salud y la tecnología de los alimentos

como investigador post- doctoral. Desde el año 2008 supervisa la parte experimental realizada por el personal predoctoral del grupo de investigación. Además, ha desarrollado métodos analíticos para proyectos de investigación de financiación pública y privada, incluyendo la determinación de la actividad DAO de microorganismos probióticos y con interés tecnológico. Ha participado en el muestreo, procesado y análisis de las muestras, así como en la interpretación de los resultados y, en la elaboración de los informes científicos y las publicaciones derivadas de los mismos en revistas científicas. También ha colaborado en la elaboración de diferentes materiales docentes del Post- grado de Interacciones Alimentos Medicamentos de IL3 -UB y en artículos de divulgación .

Natalia Toro Funes

Diplomada en Nutrición Humana y Dietética por la Universidad de Ramon Llull. Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la UB. Doctora por la UB desde Junio de 2014. Desde el 2009 forma parte del grupo de investigación Aminas y Poliaminas Bioactivas de los Alimentos, dirigido por la Dra. M. Carmen Vidal. Investigadora pre-doctoral con una beca de Formación al Profesorado Universitario (Ministerio de Educación) desde Octubre de 2010 hasta Octubre de 2014. Realiza una estancia pre-doctoral en el grupo de investigación de Nutrición Molecular de la Universidad de Reading (Reading, United Kingdom). Ha publicado 6 artículos en revistas científicas indexadas y presentado 4 comunicaciones a congresos científicos. Actualmente centra su actividad científica en el estudio de los efectos de la aplicación de tecnologías emergentes sobre el valor nutritivo de bebidas vegetales, así como también en el estudio de los efectos biológicos de los compuestos bioactivos más relevantes de la soja.

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA	22

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La histamina es una amina biógena que, además de las importantes actividades fisiológicas que tiene en el organismo, se puede encontrar en muchos alimentos cotidianos. Particularmente, se puede encontrar en cantidades elevadas en ciertas variedades de pescado, y en productos fermentados como vinos, quesos y derivados cárnicos crudos-curados (BIOHAZ, 2011; Vidal-Carou y col., 2007). En personas sanas y en condiciones normales existen dos rutas importantes para metabolizar la histamina, donde participan las enzimas Histamina-N-Metiltransferasa (HMT) y Diamino Oxidasa (DAO) (Jarisch, 2004). La HMT se expresa en casi todos los tejidos, mientras que la DAO se expresa sólo en algunos tejidos, concretamente el intestino, el hígado, el riñón y la placenta (Klocker y col., 2005). Se piensa que los tejidos que contienen DAO son determinantes en el control sistémico de la biodisponibilidad de la histamina. En el epitelio intestinal la DAO es responsable de metabolizar la histamina procedente de los alimentos, regulando su paso hacia la sangre portal. La actividad DAO del hígado regula su paso hacia la circulación sistémica y también es importante la actividad del riñón, degradando la histamina reabsorbida en el túbulo proximal.

Cuando existe una desproporción entre la histamina ingerida y la capacidad de metabolización de la misma, se produce su acumulación en plasma y la aparición de los efectos adversos. Esto es lo que sucede en el caso de la **intolerancia a la histamina** o histaminosis alimentaria, debido a una baja actividad de la DAO intestinal (Maintz y Novak, 2007). El origen de esta deficiencia enzimática puede ser:

- Genético: se han identificado polimorfismos genéticos con diferente actividad enzimática.
- Patológico: la deficiencia de DAO parece ser más prevalente en población con enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn...)
- Farmacológico: por bloqueo o inhibición de la DAO por parte de varios fármacos. Este riesgo parece relativamente importante, ya que algunos de estos medicamentos son de uso común (acetilcisteína, ácido clavulánico, metoclopramida, verapamilo, isoniazida, etc.) y algunos de ellos incluso se pueden adquirir sin receta médica. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de la población europea podría consumir alguno de estos fármacos inhibidores de la DAO (Sattler y col., 1988; Maintz y Novak 2007).

A pesar de que la intolerancia a la histamina tiene una entidad clínica relativamente reconocida, no existen aún evidencias contrastadas ni un claro consenso sobre la dosis máxima de histamina tolerable para evitar los signos de esta afección (BIOHAZ, 2011). A diferencia de

las reconocidas intoxicaciones histamínicas que aparecen tras el consumo de productos con cantidades muy elevadas de histamina, en el caso de los intolerantes a la histamina la ingesta de cantidades bajas pueden ser suficientes para provocar la sintomatología. Se han citado como desencadenantes, valores que van desde 50 mg de histamina, cuando esta amina es vehiculada en el vino (125 ml), hasta 60-75 mg, cuando la histamina se administra con agua (Rauscher-Gabernig y col., 2009). Otros componentes de los alimentos, como otras aminas biógenas o el alcohol y su metabolito acetaldehído, parece que aumentan o potencian la susceptibilidad individual a esta amina y, en consecuencia, aumenta el riesgo de sufrir reacciones adversas.

La gran variedad de síntomas derivados de la intolerancia a la histamina, asociados a patologías crónicas de gran prevalencia en la población, exigen que la investigación en este campo no se detenga y que se avance en el conocimiento de su origen y en los posibles tratamientos. Los síntomas más frecuentes derivados del déficit de DAO son:

- Migraña y otras cefaleas vasculares.
- Trastornos gastrointestinales, especialmente aquellos asociados al Síndrome del Intestino Irritable (SII), como estreñimiento, diarrea, saciedad, flatulencia o sensación de hinchazón.
- Trastornos dermatológicos como piel seca, atopia o psoriasis.
- Dolores en tejidos blandos con frecuencia diagnosticados como fibromialgia.
- Fatiga crónica.
- En la infancia y adolescencia se ha relacionado el déficit de DAO con el trastorno de atención e hiperactividad (TDAH).

La hipótesis de que la intolerancia a la histamina pueda estar relacionada con cefalea o migraña está cobrando fuerza en los últimos años (Izquierdo y col., 2012). La relación entre dieta y migraña es antigua y controvertida e inicialmente se fundamentó en la asociación, mediante encuestas, entre el consumo de ciertos alimentos y la aparición del dolor migrañoso. Entre los alimentos implicados destacan el chocolate, el queso, los cítricos, derivados cárnicos crudos-curados, vinos y cervezas y, en menor proporción, alimentos fritos o muy grasos, café, té y bebidas de cola (Maintz y Novak., 2007). Algunos de los alimentos implicados son potencialmente ricos en histamina y otras aminas biógenas (que compartirían algunos de los enzimas de sus rutas de detoxificación) y otros se describen frecuentemente como liberadores de histamina endógena por un mecanismo aun no completamente elucidado.

Tal como señala García-Martín y col. (2008) algunos argumentos que refuerzan la relación entre histamina y algunas migrañas son:

- La frecuencia de migraña es más elevada en pacientes con enfermedades alérgicas.
- La concentración plasmática de histamina es más elevada en pacientes migrañosos, tanto durante los ataques de dolor como en periodos sin migraña.
- La histidina (aminoácido precursor de la histamina) presenta contenidos más altos en plasma y en líquido cerebroespinal en pacientes con migraña que en individuos no migrañosos.
- La administración intravenosa de histamina en dosis altas (0,5 mg/kg) en pacientes migrañosos provoca inmediatamente dolor de cabeza y posteriormente un ataque de migraña.

Según el estudio realizado por Vidal-Carou y col. (2010), que tenía como objetivo determinar la proporción de enfermos diagnosticados de migraña que presentaban déficit de DAO en comparación con la población general no migrañosa, el 96% de las personas que padecen migraña tienen un nivel de DAO reducido o muy reducido. Este déficit de DAO provoca un aumento de los niveles plasmáticos de histamina que aumenta el riesgo de aparición de la migraña. El estudio también apuntó que otros cuadros clínicos como dolores osteopáticos, piel atópica o síndromes de colon irritable podrían estar relacionados con el bajo nivel de la enzima DAO, ya que el 41,3% de los pacientes con migraña experimentaban también más 3 o 4 de estos síntomas.

Recientemente, un estudio clínico doble ciego, randomizado y controlado con placebo (Izquierdo y col., 2013) estudió la eficacia de la evaluación de la suplementación con DAO en el tratamiento preventivo de la migraña. En este estudio se confirma que hay una alta prevalencia del déficit de DAO en la población con migraña y que la suplementación con enzima DAO ha supuesto una reducción significativa en la duración de las crisis y una tendencia a la disminución del número de episodios.

Actualmente para identificar a los individuos intolerantes a la histamina se está utilizando la determinación plasmática de la actividad DAO mediante una prueba analítica que desde hace más de un año ofrecen muchos laboratorios de análisis clínicos y otros centros médicos de España. Esta prueba mide la cantidad de histamina que puede ser degradada por la DAO de la muestra de plasma. Se considera que la actividad DAO de un individuo es reducida cuando es inferior a 80 HDU/ml (Histamine Degrading Units).

Una alternativa aún no desarrollada para identificar a los individuos con déficit de DAO podría ser la determinación de la histamina y sus metabolitos en orina, que ofrecería ventajas por ser menos invasiva. La hipótesis de trabajo es que los individuos con insuficiente actividad

DAO tienen un perfil de distribución de la histamina y sus metabolitos en la orina significativamente diferente al de los individuos normales.

El abordaje analítico para la determinación simultánea de histamina y sus metabolitos es complejo. Existen kits comerciales que permiten la determinación de histamina mediante técnicas de ELISA, y para la determinación de sus metabolitos (metil histamina y ácido metil imidazol acético) existen técnicas por radio inmuno ensayo (Oguri y Yoneya, 2002). Sin embargo, estas técnicas de base inmunológica no permiten la determinación simultánea de la histamina y sus metabolitos, además de, en el caso del RIA, comportar complicaciones ligadas al uso de material radioactivo. Como alternativa, los métodos cromatográficos basados en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con diferentes sistemas de detección parecen ser los más adecuados para la separación y cuantificación simultánea de todos estos compuestos (Toyo'oka, 2008). A pesar de que la detección UV-visible ha sido utilizada ampliamente para el análisis de la histamina y sus metabolitos en muestras biológicas, debido a su escasa sensibilidad y especificidad, los sistemas de detección por fluorescencia o espectrometría de masas parecen ser los más adecuados para este fin (Kawanishi y col., 2006, Zwang y col., 2011). Debido a la baja fluorescencia natural de los analitos, en la mayoría de los casos se requiere el uso de un reactivo de derivatización que reaccione tanto con las aminas primarias como con las secundarias. Este podría ser el caso de reactivos como la fluorescamina o el DBD-F (4-(N,N-dimetilaminosulfonil benzoxadiazol 2,1,3 fluoro-7). Actualmente no existe en la literatura ningún método de derivatización para algunos metabolitos de la histamina (imidazol acetaldehído y N-metilimidazol acetaldehído) (Toyo'oka, 2008; Wang y col., 2013). Consecuentemente, el desarrollo de un método de derivatización se hace necesario y justificado para la investigación metabolómica de la histamina en sistemas biológicos.

Además de en humanos, la actividad DAO o histaminasa también ha sido descrita en microorganismos que han mostrado capacidad para reducir la histamina *in vitro* (Zamam y col. 2011). Por ejemplo, existen estudios que han evaluado la actividad para degradar histamina en medios de cultivo de bacterias aisladas de productos fermentados como quesos, embutidos, pasta de pescado y vinos (Leuschner y col., 1998, Dapkevicius y col., 2000, Gardini y col., 2002, García-Ruiz y col., 2011).

La capacidad de degradar la histamina por parte de bacterias probióticas podría ser una nueva aplicación para este tipo de microorganismos, que podrían cubrir o paliar el déficit de DAO a nivel intestinal en individuos intolerantes a la histamina. Este efecto podría dar respuesta a las necesidades de un colectivo de la población que por motivos crónicos (genéticos) o puntuales (enfermedades digestivas o tratamientos farmacológicos) tienen

sintomatologías derivadas de una intolerancia a la histamina, principalmente migraña.

En resumen, este proyecto pretende profundizar en el conocimiento y caracterización de la relación histamina / DAO, en el diagnóstico y caracterización de la intolerancia a la histamina y también en el estudio de algunas alternativas para intentar reducir la incidencia y/o gravedad de esta intolerancia mediante el uso de bacterias probióticas con actividad DAO, que puedan aportar una fuente dietética de DAO para individuos intolerantes a la histamina.

2. OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto es aportar evidencia científica a la relación entre actividad DAO reducida y la aparición de síntomas asociados a la intolerancia a la histamina, y particularmente la migraña, así como estudiar algunas alternativas para intentar reducir la incidencia y/o gravedad de los problemas derivados de la presencia de histamina en alimentos.

Para alcanzar este objetivo global, se plantea el abordaje de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la relación existente entre actividad DAO y la concentración de histamina, tanto en el intestino como en plasma.
2. Estudiar el perfil de eliminación en orina de histamina y sus metabolitos y su posible aplicación como biomarcador de la intolerancia a la histamina por déficit de DAO.

3. Estudiar la aplicabilidad de algunas bacterias probióticas con capacidad DAO para reducir las reacciones asociadas a la intolerancia a la histamina.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE HISTAMINA PRESENTE EN LA LUZ INTESTINAL, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HISTAMINA Y LA ACTIVIDAD DAO INTESTINAL Y PLASMÁTICA.

3.1.1. Protocolo 1

Se han utilizado ratones macho de la cepa C57BL/6, de 5-6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el Servicio de experimentación animal de la Facultad de Farmacia, en condiciones estándar de iluminación, temperatura y humedad y con libre acceso al pienso. El diseño experimental se resume en la figura 1.

Los animales se separaron en dos grupos:

- Grupo control (CTL) (n=8)
- Grupo HIS-A (n=8): administración de 10 mg/kg de histamina

La histamina se administró en una única dosis por vía oral, en solución acuosa. A los animales del grupo control se les administró el vehículo. Los animales se sacrificaron 24h después del tratamiento, previamente anestesiados con ketamina/xilacina. Posteriormente se procedió a la extracción de las muestras.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca, de la que se separó el suero mediante centrifugación.

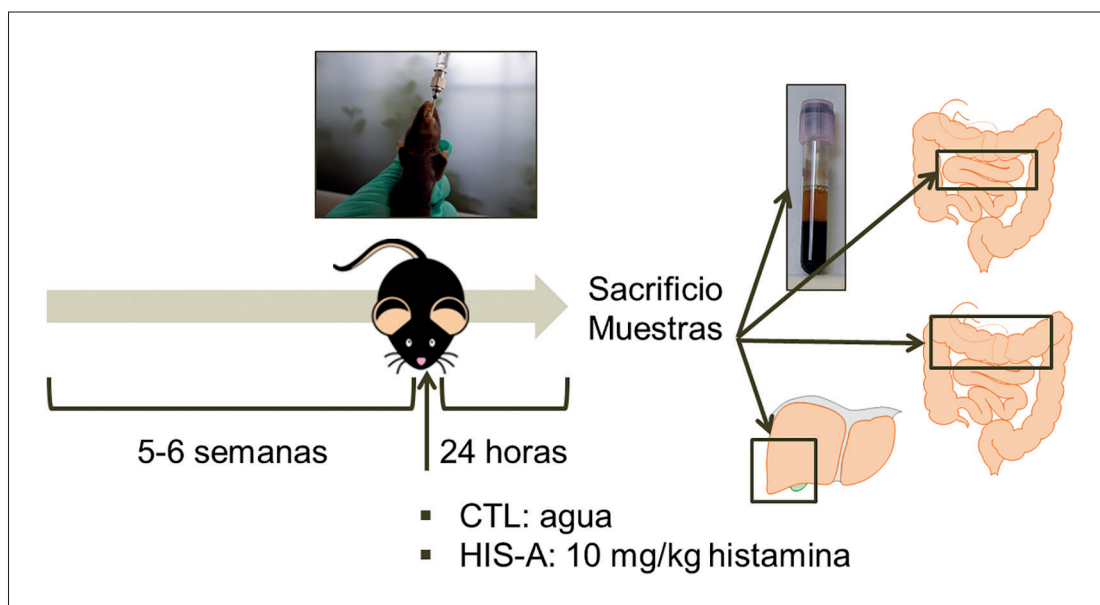


Figura 1. Esquema del diseño experimental 1

Se realizó una laparotomía y se extrajeron fragmentos de unos 5 cm de yeyuno y de colon. Se procedió al raspado de la mucosa, conservada inmediatamente en nitrógeno líquido a -80°C . También se obtuvo un fragmento de hígado, que se congeló siguiendo la misma pauta que para las muestras intestinales. Para preservar la actividad enzimática y evitar la degradación de proteínas, se añadió fenil-metasulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, a todas las muestras.

Las muestras de mucosa intestinal y de hígado se homogenizaron de forma mecánica con un Polytron. La solución de homogeneización es un tampón Bis-Tris HCl 20 mM pH 7,0 con PMSF 1mM (Klocker y col., 2005). Los homogenizados se sometieron a centrifugación y se recuperó el sobrenadante.

La actividad DAO se determinó mediante un ensayo radiométrico, en el que el sustrato es la putrescina marcada con tritio (^3H) (REA: Radioextraction assay, Sciotec Diagnostic Technologies).

3.1.2. Protocolo 2

A partir de los resultados obtenidos mediante el protocolo 1 se estableció una nueva pauta de trabajo. Se establecieron nuevas dosis de administración de histamina y añadieron dos grupos de animales, para tratarlos con un inhibidor de la actividad DAO.

El segundo grupo de experimentos se llevó a cabo con ratones macho Balb/C, de 10 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el Servicio de experimentación animal de la Facultad de Farmacia, en condiciones estándar de iluminación, temperatura y humedad y con

libre acceso al pienso hasta el día del experimento. El diseño experimental se resume en la figura 2.

Los animales se separaron en cinco grupos:

- Grupo control (CTL) (n=5)
- Grupo HIS-B (n=5): administración de 0,1 mg/kg de histamina
- Grupo HIS-B+AG (n=5): administración de 0,1 mg/kg de histamina y de 100 mg/kg de aminoguanidina
- Grupo HIS-A (n=5): administración de 10 mg/kg de histamina
- Grupo HIS-A+AG (n=5): administración de 10 mg/kg de histamina y de 100 mg/kg de aminoguanidina

La pauta de administración fue la siguiente:

- t = 0 – Los animales se someten a ayuno
- t = 3,5 h – Administración de aminoguanidina por vía oral (grupos +AG) o vehículo
- t = 4h – Administración de histamina por vía oral (grupos HIS-B e HIS-A) o vehículo
- t = 6h – Sacrificio y obtención de muestras

La histamina y la aminoguanidina se administraron de forma separada en una única dosis por vía oral en cada caso. Los productos se prepararon en forma de solución acuosa. A los animales de los grupos sin AG se les administró el vehículo, de forma que todos los animales fueron administrados siguiendo la misma pauta temporal.

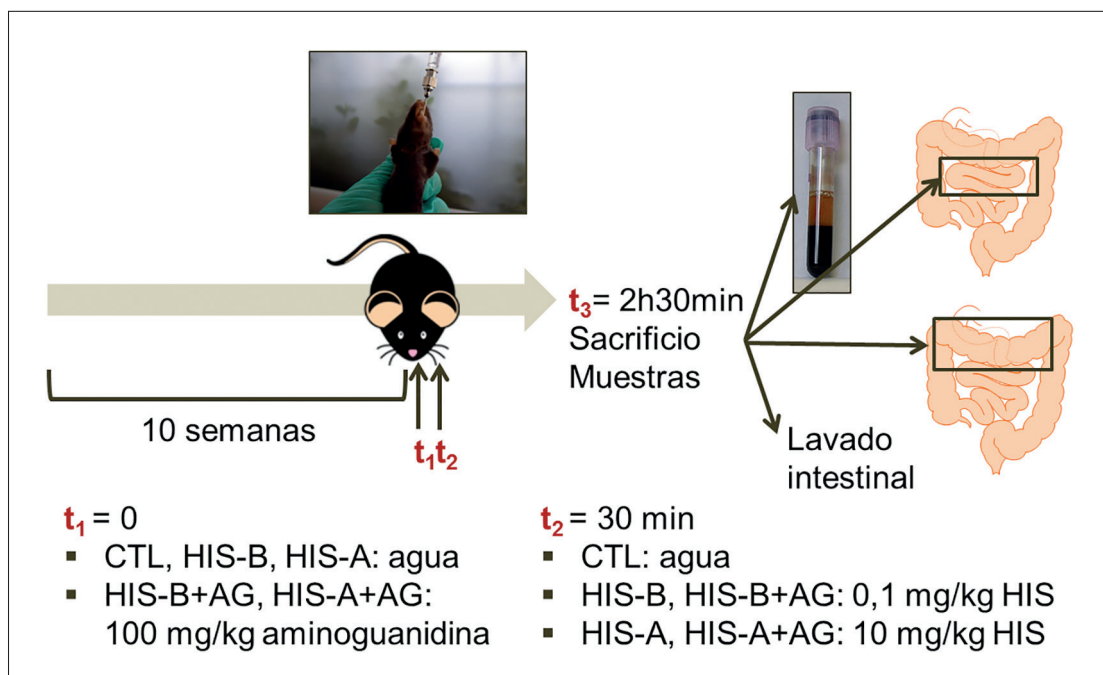


Figura 2. Esquema del diseño experimental 2

Los animales se sacrificaron entre las 12:30 y las 13:30 horas, para evitar la influencia de ritmos circadianos. Las muestras extraídas son las siguientes:

- Sangre, para la obtención del suero
- Lavado intestinal
- Mucosa de yeyuno
- Mucosa de colon

El procesado de la sangre y de la mucosa intestinal se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el protocolo 1. En el caso de las muestras de mucosa, se separaron alícuotas para la determinación de la concentración de proteínas, para la normalización de los resultados. La determinación de proteínas se ha llevado a cabo según el método de Bradford (1976).

Para obtener las muestras de lavado intestinal se extrajo el intestino delgado y se lavó con 1,5 mL de solución PBS. El líquido se recogió en un tubo y se centrifugó a 2000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se separó en alícuotas y se conservó a -80°C para el análisis posterior.

La determinación de la actividad DAO se realizó siguiendo el mismo protocolo anteriormente citado.

Los resultados se han analizado mediante un ANOVA de una vía, seguido del test post-hoc DMS, con el programa estadístico SPSS-20.0 (SPSS Inc.). Las diferencias se consideran significativas a partir $p < 0,05$. Los protocolos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité ético de la Universidad de Barcelona, de acuerdo con el Reglamento del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya.

3.2. ESTUDIO DEL PERFIL DE ELIMINACIÓN DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS INDIVIDUOS INTOLERANTES A LA HISTAMINA

3.2.1. Desarrollo de un método analítico para la determinación de la histamina y sus metabolitos en orina

El método se desarrolló usando un sistema Waters Acquity (Milford, MA, USA.), que consistía en una bomba binaria y un inyector automático junto con una bomba de post-columna (Waters 510) y un detector de fluorescencia. La bomba post-columna se conectó a un volumen muerto de mezcla instalado entre la salida de la columna y el detector. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 1.7 micras (2.1 mm × 50 mm) de diámetro de partícula 4 micras (Water corp., Milford, Ma, USA) que se colocó en un horno para mantenerlo a una temperatura constante (40°C). La adquisición de datos se llevó a cabo con el sistema de Empower versión 2.

Los reactivos y productos químicos utilizados para el desarrollo del método fueron los siguientes: agua ultra pura

se obtuvo a partir sistema Milli-Q (Millipore) . Acetonitrilo de grado HPLC y metanol (SDS, Peppin , Francia), acetato de sodio anhidro, Brij 35, 2 - mercaptoetanol, OPA, y ácido acético a partir de Merck (Darmstadt, Alemania); Otanosulfonato sódico de ROMIL Químicos (Cambridge, Reino Unido) y el ácido bórico, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico al 35 % (HCl) y ácido perclórico al 70 % a partir de Panreac (Montplet y Esteban, Barcelona, España). El reactivo derivatizante 4-(N,N-Dimethylsilylamoyl)-7-piperazino-benzofurazan (DBD-PZ) y el trifenilfosfina (TPP) y el 2,2-dipiridil disulfido (DPDS) se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO , EE.UU).

Los patrones de histamina (HA) Metil histamina (MHA), Ácido imidazolacético (AIA) y Ácido metil-imidazol acético (AMIA) se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO , EE.UU.). Se prepararon soluciones madre de HA y MHA en HCL 0.1M y de AIA y de AMIA en acetonitrilo. A partir de estas soluciones se prepararon soluciones de trabajo a las concentraciones requeridas en cada momento. Las soluciones estándar se pasan a través de un filtro de 0,22 micras, protegidas de la luz y almacenadas en condiciones de refrigeración.

Debido a que el objetivo fue desarrollar un método cromatográfico, las condiciones cromatográficas, los constituyentes de las fases móviles, así como de las condiciones de derivatization se describen en el apartado de resultados.

3.2.2. Elaboración de un cuestionario para la selección previa de voluntarios potencialmente intolerantes a la histamina

El cuestionario se elaboró utilizando la aplicación de edición de cuestionarios de Google, lo que permitirá poder enviar *on line* este cuestionario y recoger de manera automática las respuestas de los voluntarios. El cuestionario se elaboró basándose en el de la «Asociación Española de Déficit de DAO» (<http://biofuncionalismo.com/test-migrana-y-alimentacion>). Los resultados de esta prueba permitirán preseleccionar individuos intolerantes a la histamina, para a continuación poder confirmar una baja actividad DAO mediante la prueba DAO-ELISA D-HIT[®]. Asimismo, se debe seleccionar la población sana, como grupo control.

3.3. DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD AMINO OXIDASA DE CEPAS PROBIÓTICAS

Las cepas bacterianas estudiadas fueron: *Lactobacillus fermentum* ATCC9338; *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228; *Streptococcus thermophilus* (aislado de una marca comercial de leche fermentada); *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (aislado de una marca comercial de leche fermentada); *Lactobacillus casei immunitatis* (aislado de una marca comercial de leche fermentada); *Staphylococcus xylosus* ATCC29971; *Lactobacillus sakei* LU 1010, LU 1011, LU 1015, LU 1016. Además se

estudiaron diferentes complementos probióticos comerciales codificados como A, B, C y D: marca A

La actividad DAO en bacterias se evaluó según una modificación del método descrito por Leuschner y col., (1998). Este procedimiento se basa en exponer a las bacterias a un medio fosfatado simple (sin nutrientes, ni fuentes de carbono ni nitrógeno) con la adición de una cantidad conocida de histamina como única fuente de energía. Estas condiciones permiten estudiar específicamente la capacidad de degradación de esta amina por parte de los microorganismos.

Se inoculan 100µl de la cepa bacteriana a evaluar en 15 ml de medio nutritivo MRS Broth y se incuban a 37°C en condiciones aeróbicas y de agitación constante (150 rpm) durante una noche (cultivo overnight). Se centrifuga el cultivo a 9000 rpm durante 10 minutos para recuperar las células. Se realiza, al menos 2 veces, un lavado de éstas con una solución de buffer fosfato 0,05M y pH 7 para eliminar completamente el medio de cultivo. Finalmente se añade 15 ml de Buffer Fosfato 0,05M y pH 7, suplementado con 0,05g/l de histamina y se incuba a 37°C, durante 24-48 h en aerobiosis y agitación constante (150 rpm). En paralelo, y en las mismas condiciones, se realiza el control negativo que consiste en la solución de fosfato 0.05M y pH 7 y suplementado con 0.05 g/l de histamina, sin adición de bacterias. Así mismo el control positivo consiste en añadir enzima DAO porcina, (diamine oxidase porcine Kidney Sigma) a la solución fosfatada y suplementada con histamina. Tras 24-48 horas de incubación se procede a la extracción de las muestras con ácido perclórico 0.6M y se pasa por filtros de 0.22 micras para el posterior análisis por UPLC-FL.

La determinación de histamina se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC) según el método descrito por Latorre-Moratalla y col., (2009). Este método se basa en la formación de pares iónicos entre las aminas biógenas, en este caso histamina, y el ácido octanosulfonato presente en la fase móvil. El sistema cromatográfico UPLC™ consiste en una bomba binaria, inyector automático y detector de fluorescencia (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). La fase estacionaria es una columna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 1.7 micras (2.1 mm × 50 mm) de diámetro de partícula 4 micras (Water corp., Mildford, Ma, USA). Ésta se mantiene dentro de un sistema de control de temperatura a 37 ° C durante todo el análisis. La detección de la histamina se realiza por fluorimetría (ex λ: 340 nm y λ em: 445 nm), previa derivatización *on line* post-columna de la histamina con o-ftalaldehído (OPA, Merck, Darmstadt, Alemania).

La actividad DAO se expresa como % de reducción del contenido de histamina por parte de las bacterias en comparación con el mismo medio sin crecimiento de bacterias. A modo de ejemplo en la figura 3 se muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis de la reducción de histamina de la cepa de *L. sakei* 10.10.

3.4. DETERMINACIÓN DEL DNA GENÓMICO Y PLASMÁTICO EN CEPAS CON ACTIVIDAD DAO IN VITRO.

La presencia de plásmidos en las cepas *L. sakei* 1010, 1011, 1015, 1016 (las cuatro con capacidad para reducir histamina in vitro) se determinó siguiendo el procedimiento descrito por O'Sullivan y Klaenhammer (1993)

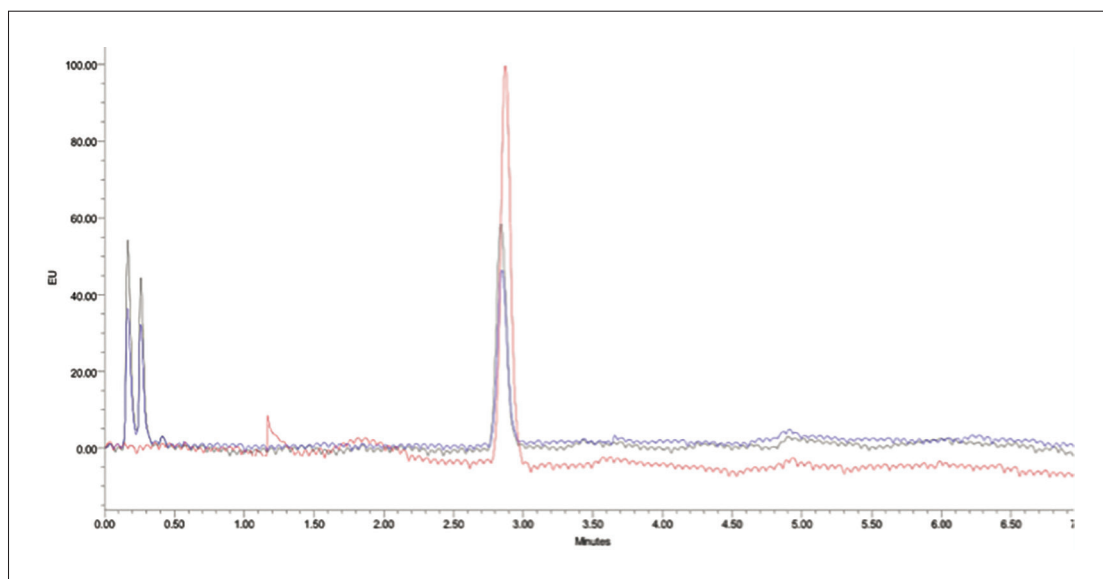


Figura 3. Cromatogramas obtenidos por UHPLC-FL que muestran la degradación de la histamina por parte de la cepa de *L. sakei* Lu10.10 por duplicado (cromatogramas negro y azul) en relación a los 50 mg/l de histamina presentes al inicio en el medio de ensayo (cromatograma rojo) después de 48 horas de incubación a 37°C y 150 rpm.

para bacterias del género *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Se aisló ADN plasmídico y genómico de las diferentes cepas positivas de las que disponíamos y de una cepa negativa (sin capacidad para degradar histamina) para compararlas. Para obtener cultivos puros, se inoculó una colonia de cada una de las cepas de *L. sakei* en 5 ml de MRS líquido y se incubaron a 37 ° C 16- 18h en agitación constante (200rpm). Para obtener las fracciones correspondientes al ADN genómico y al ADN plasmídico se utilizaron kits comerciales.

El kit de obtención de ADN genómico bacteriano (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (NA2100, Sigma-Aldrich) permitió aislar ADN genómico puro a partir de bacterias gram positivas después de un tratamiento previo con lisozima para romper las paredes bacterianas de éstas. Después de la lisis de las bacterias mediante una solución de sales caotrópicas, que aseguraba la desnaturalización completa de las macromoléculas, se purificó el ADN mediante una columna de sílice. La adición de etanol al lisado celular hizo que el ADN quedara unido a la columna de sílice y así, después de diferentes lavados para eliminar los contaminantes que pudieran quedar mezclados con el ADN, éste fue eluido de la columna con una solución de TE - EDTA . En este caso a partir de los 5 ml de cultivo obtenido para cada cepa se utilizaron 2 para la obtención del ADN genómico.

El kit de obtención de ADN plasmídico (PureYield™ plásmidos Miniprep System (A1220, Promega), se basa en el mismo sistema de la columna de sílice anteriormente descrito para la obtención de ADN genómico con las correspondientes modificaciones que permitan aislar un ADN más pequeño que el genómico y de estructura circular. En este caso a partir de los 5 ml de cultivo obtenido para cada cepa se utilizaron 2 para la obtención del ADN plasmídico.

Las muestras se enviaron al servicio de Genómica del Instituto de Biotecnología y de Biomedicina (UAB) para secuenciar los diferentes ADNs obtenidos (genómico y plasmídico) de cada una de las cepas estudiadas y para realizar un análisis comparativo para encontrar regiones diferentes entre las cepas positivas (capaces de degradar histamina) y las negativas (incapaces de degradar histamina) y que pudieran corresponder a la secuencia de una proteína con actividad diamino oxidasa .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE HISTAMINA PRESENTE EN LA LUZ INTESTINAL, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HISTAMINA Y LA ACTIVIDAD DAO INTESTINAL Y PLASMÁTICA.

Experimento 1

En el tracto gastrointestinal hay dos fuentes principales de histamina: la histamina endógena liberada por los mastocitos de la pared intestinal y la histamina exógena absorbida por el epitelio. Dos son las enzimas responsables de la inactivación biológica de la histamina en el intestino: la Diamino Oxidasa (DAO) y la Histamina-N-Metiltransferasa (HNMT). En mamíferos, la DAO es la más importante (Ahrens y col., 2002). Es por ello que en una primera fase del estudio determinamos la actividad DAO intestinal, así como la actividad de este enzima en hígado y suero.

Los experimentos se realizaron en ratones sin ningún tipo de tratamiento y en ratones a los que se administró una dosis exógena de histamina. Los resultados se presentan en la figura 4.

La actividad DAO en yeyuno y colon es elevada, con valores superiores en el yeyuno. En hígado y en suero no se detecta actividad DAO. Este perfil encaja con el que expone Klocker y col. (2005) en un estudio realizado en cerdos, donde la actividad DAO es máxima en el riñón y presenta niveles relativamente elevados en las distintas zonas del intestino delgado y grueso. En ratones, Tian y col. (2013) también obtienen valores muy bajos de actividad DAO en suero, si bien en determinados estados patológicos la actividad DAO aumenta significativamente. La administración de histamina no modifica la expresión de DAO en ninguno de los tejidos estudiados, hecho que sugiere que no hay una inducción por sustrato.

Experimento 2

A partir de los resultados del experimento 1 diseñamos un nuevo experimento para poner a prueba un inhibidor de la actividad DAO. La aminoguanidina (AG) es ampliamente utilizada en experimentación como inhibidor de este enzima. La AG por una parte previene la glicosilación de proteínas; por otra inhibe la actividad de enzimas con grupos carbonilo como cofactores. Es esta segunda actividad la responsable de que la AG inhiba enzimas tales como la ON sintasa (iNOS) o la DAO (Kazachkov y col., 2007).

La pauta de administración de histamina y de AG se diseñó teniendo en cuenta los resultados que aparecen en la literatura en cuanto a dosis, tiempo de tránsito intestinal y cinética de absorción de la histamina. Hemos administrado AG a una dosis de 100 mg/kg, tal como indican otros autores en estudios realizados con mucosa intestinal (Barocelli y col., 2006; Fujisaki y col., 1993). En

el caso de la histamina hay pocos estudios sobre la absorción intestinal de esta amina. En un estudio realizado en perros mediante una técnica *in vivo* (Duncan y Waton, 1968) se demostró que la histamina administrada por vía oral alcanza el pico máximo de concentración plasmática al cabo de 30-60 min. Estudios recientes realizados en ratón en los que se mide el tiempo de tránsito intestinal, indican que 30 minutos después de la administración de un marcador, éste ha alcanzado la mitad del tracto intestinal (Istrate y col., 2014), mientras que a los 45 minutos el marcador ha recorrido el 75% del camino hasta la unión íleocecal (Barocelli y col., 2006). A partir de estas

evidencias se estableció el tiempo de administración de la histamina (30 min después de la administración del inhibidor) y el momento del sacrificio (2 horas después).

Los resultados obtenidos en este experimento reproducen los obtenidos anteriormente. Nuevamente, la actividad DAO del colon es menor que en el yeyuno ($p < 0.001$), y no se ve influenciada por la administración de histamina. La administración de AG previa a la administración de histamina produce la inhibición completa de la actividad DAO, tanto en la mucosa del yeyuno como en la del colon (figura 5).

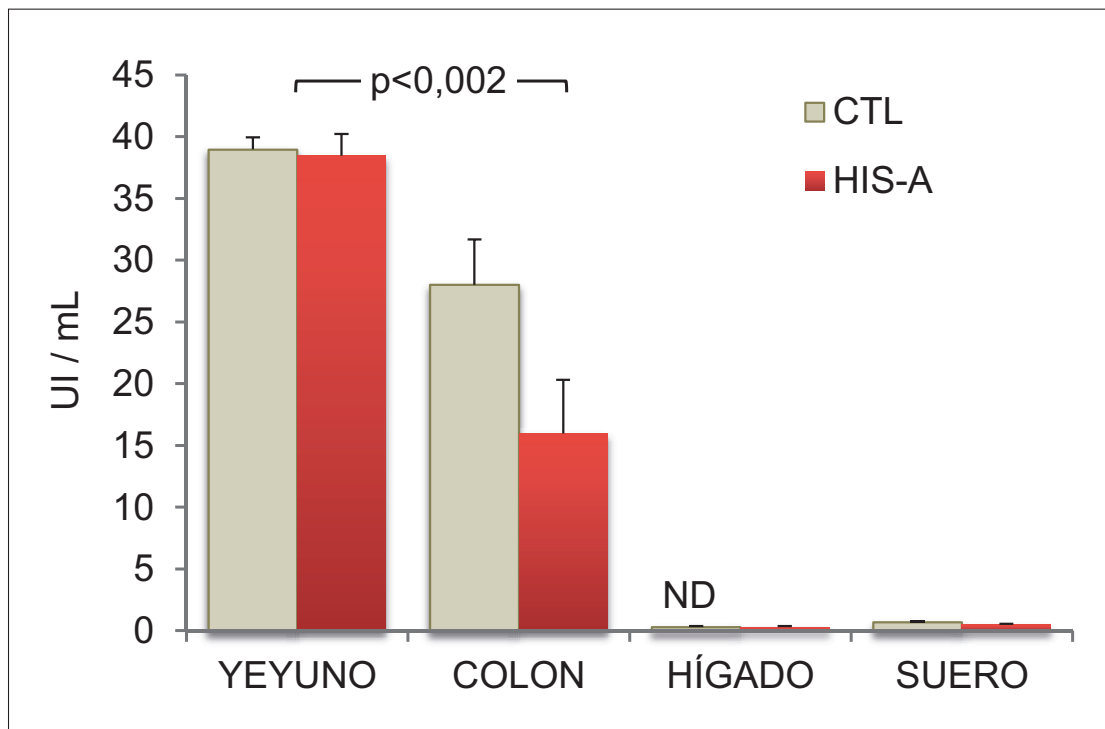


Figura 4. Actividad DAO en la mucosa de yeyuno y colon, en hígado y en suero. Efecto de la administración de histamina (HIS-A: 10 mg/kg). Los resultados se presentan como media ± error estándar (N=4-8). Una UI equivale a 1 µmol de sustrato convertido por minuto.

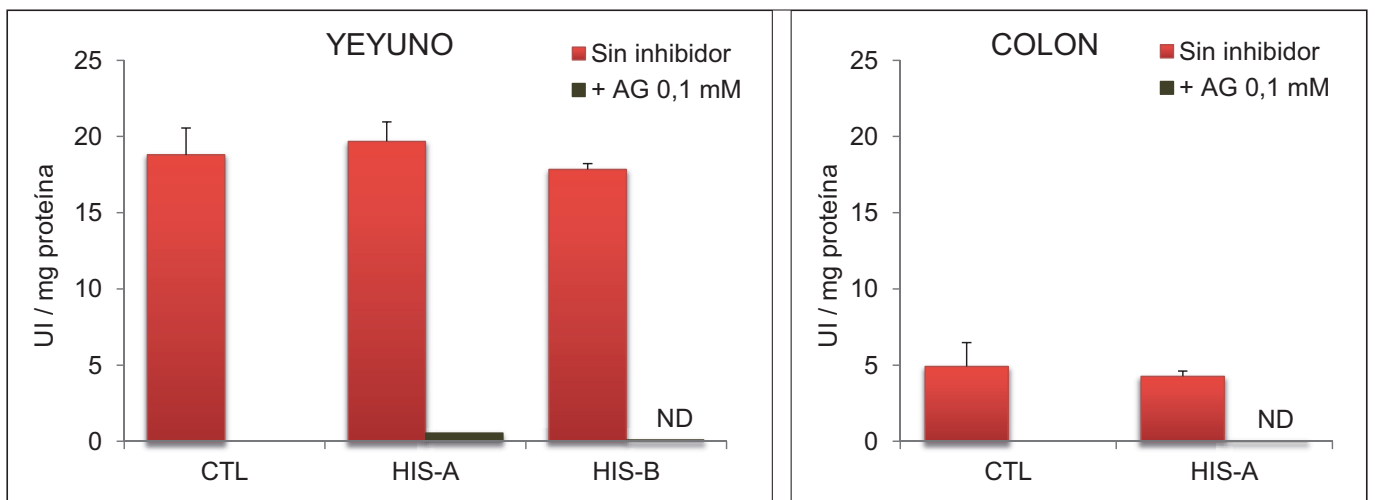


Figura 5. Actividad DAO en la mucosa de yeyuno y colon. Efecto de la administración de histamina (HIS-A: 10 mg/kg; HIS-B: 0,1 mg/kg) y del tratamiento con aminoguanidina (AG; 100 mg/kg). Los resultados se expresan en UI normalizados por mg de proteína, y se presentan como media ± error estándar (N=2-5). Una UI equivale a 1 µmol de sustrato convertido por minuto.

Queda por determinar la concentración de histamina en suero y la posible correlación de estos valores con la actividad DAO intestinal. La hipótesis de trabajo es que en animales tratados con aminoguanidina la concentración sérica de histamina será mayor que en animales no tratados. El hecho de tener a punto este modelo experimental permitirá diseñar nuevos experimentos para estudiar la interacción entre la histamina presente en los alimentos, la actividad DAO intestinal y sus consecuencias en distintos sistemas orgánicos.

4.2. ESTUDIO DEL PERFIL DE ELIMINACIÓN DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS INDIVIDUOS INTOLERANTES A LA HISTAMINA.

4.2.1. Desarrollo de un método analítico para la determinación de la histamina y sus metabolitos en orina

En primer lugar se ha efectuado un estudio bibliográfico de los diferentes métodos analíticos, descritos hasta el momento, para la determinación de histamina y sus principales metabolitos en orina y en otros fluidos biológicos (tabla 1).

La mayoría de los métodos de HPLC descritos en la bibliografía sólo determinan histamina y MHA y en el caso de Hui y Talor (1984) y Zhang y col. (2011) también determinan AMIA. El sistema de detección más utilizado es la fluorimetría (FL) y la espectrometría de masas (MS), debido a su elevada sensibilidad, necesaria para detectar estos compuestos en muestras como sangre u orina (Oguri y Yoneya, 2002). El único método que permite la detección de la histamina y sus metabolitos (MHA, AIA y AMIA) se basa en la utilización de UHPLC acoplado a un sistema de detección de MS (Kawanishi y col., 2006).

En base a esta revisión bibliográfica, no existe hasta el momento ningún método que permita determinar de manera simultánea la histamina y sus metabolitos, MHA, AIA, AMIA, mediante el uso de UHPLC-FL, que es el objetivo de este trabajo.

Para la detección fluorimétrica de la histamina y sus metabolitos es preciso derivatizar estos compuestos, debido a los bajos coeficientes de absorción que tiene estos compuestos. Debido a las diferentes estructuras químicas de la histamina y sus metabolitos, no es posible derivatizar todas estas sustancias utilizando el mismo compuesto fluorogénico. La histamina, la MHA, y el AIA poseen grupos amino (primarios y/o secundarios) y por lo tanto pueden ser derivatizados por un elevado número de compuestos con propiedades fluorescentes, siendo el OPA (*orto*-ftaldehído), la fluoescamina o el DBD-F 4-(N,N-dimetilaminosulfonil benzoxadiazol 2,1,3 fluoro-7) los más utilizados (Wang y col., 2013). Sin embargo el AMIA, el principal metabolito de la histamina en orina, no posee ningún grupo amino derivatizable en su estructura por lo que es necesario una derivatización del grupo carboxilo por compuestos fluorogénicos diferentes a los utilizados para el resto de metabolitos. Así, para poder determinar la histamina y sus tres principales metabolitos en orina por UPLC-FL, se desarrolló un método diferente para la derivatización de la histamina y la MHA, y para la del AIA y el AMIA. En el caso de la derivatización de la histamina y la MHA es un método *on line* post-columna utilizando como derivatizante el OPA (tabla 2). Este compuesto reacciona rápidamente con las aminas primarias en presencia de un agente reductor como es el caso del 2-mercaptoetanol. Esta rápida reacción permite una derivatización post-columna, con la ventaja de que se evita manipular la muestra y se acorta el tiempo de análisis.

Tabla 1. Métodos de HPLC aplicados en la determinación de histamina (HA) y sus metabolitos en muestras biológicas.

Analitos	Muestra	Columna	Detección	Referencia
HA / MHA	Plasma, orina	C ₁₈	Elec (pre-colum, OPA)	Tsuruta y col., 1981
HA / MHA	Orina	C ₁₈	FL (pre-colum, OPA)	Granus y Wass, 1984
HA / MHA / AMIA	Orina	C ₁₈ , par iónico	Colorimetría (212 nm)	Hui y Talot, 1984
HA / MHA	Sangre	Catión exchange	Electroquímica	Mine y col., 1986
HA / MHA	Plasma, orina	Catión exchange	Electroquímica	Houdi y col., 1987
HA / MHA	C ₁₈	C ₁₈	FL (pre-colum, OPA)	Kasziba y col., 1988
HA / MHA	Plasma, sangre	Catión exchange	FL (post-colum, OPA)	Itoh y col., 1991
HA / MHA	Plasma, Orina	C ₁₈ , par iónico	FL (post-colum, OPA)	Itoh y col., 1992
HA / MHA	Órganos	C ₁₈	FL (pre-colum, Fluorescamina)	Von Haaster y col., 1993
HA / MHA	Plasma, orina	C ₁₈	FL (on-colum, OPA)	Saito y col., 1992- 1994
HA / MHA	Cerebro	ODS	FL (pre-colum, OPA)	Kitanaka y col., 2004
HA / MHA/	Colon	C18	FL (On colum, OPA)	Vietinghoff y col., 2006
HA / MHA / AIA / AMIA	Pelo	UPLC C ₁₈	MS (DBD-F y DBD-PZ)	Kawanishi y col., 2006
HA / MHA / AMIA	Fluido cerebroespinal	UPLC C ₁₈	MS/MS	Zhang y col., 2011
HA / MHA	Fluido cerebroespinal	UPLC C ₁₈	MS/MS (4-BBS)	Croyal y col., 2011

4-BBS: 4-bromobenzenesulfonyl chloride; DBD-F: 4-(N, N-dimetilaminosulfonil benzoxadiazol 2,1,3 fluoro-7); DBD-PZ: 4-(N,N-Dimethylsilylfamoyl)-7-piperazino-benzofurazan; ODS: octadesylsilyl

Tabla 2. Derivatización post-columna de la histamina y la MHA con OPA.

Reactivo de derivatización	31 g/l ácido bórico 26,2 g/l hidróxido de potasio 0,2 g/l orto-ftaldehído (OPA) en 5ml de metanol 3 ml/l de 2-mercaptoetanol 3ml/l éter de polioxietilénlaurílico
Bomba post columna	Waters 510
Flujo del reactivo	0.4 ml/min

El método para AIA y AMIA se basa en la derivatización precolumna del grupo carboxilo con DBD-PZ (figura 6). Éste métodos se desarrolló a partir de la metodología descrita por Kawanishi y col. (2006) para determinar estos compuestos en pelo de rata. La reacción del AIA y del AMIA con esta sustancia necesita tiempo y temperatura por lo que el proceso de derivatización no pudo ser automatizado en el mismo proceso cromatográfico.

En cuanto a la separación e identificación de estos compuestos, la figura 7 muestra la perfecta separación de la histamina y la MHA por UPLC-FL. Las condiciones cromatográficas, la composición de las fases móviles, así como el gradiente de elución que permite esta separación se detallan en las tablas 3 y 4. Éstos compuestos eluyen en tiempos de retención lo suficientemente diferentes como para poder ser identificados de manera inequívoca.

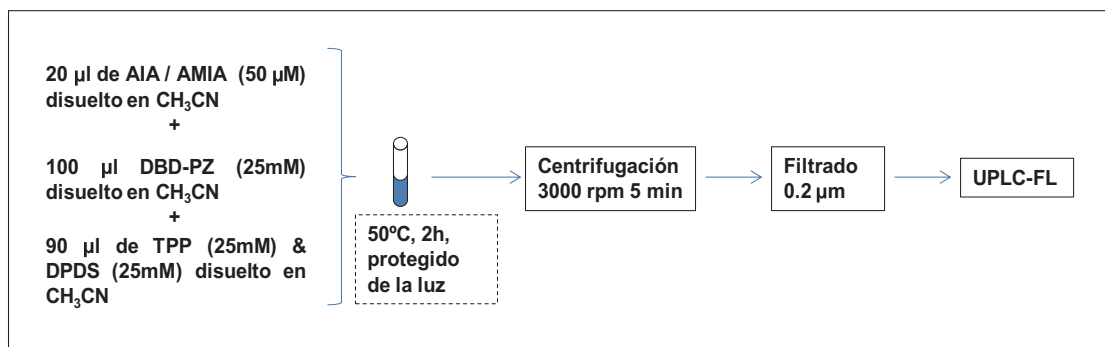


Figura 6. Proceso de derivatización pre-columna del AIA y del AMIA con DBD-PZ (4-(N,N-Dimethylsulfamoyl)-7-piperazinobenzofurazan)

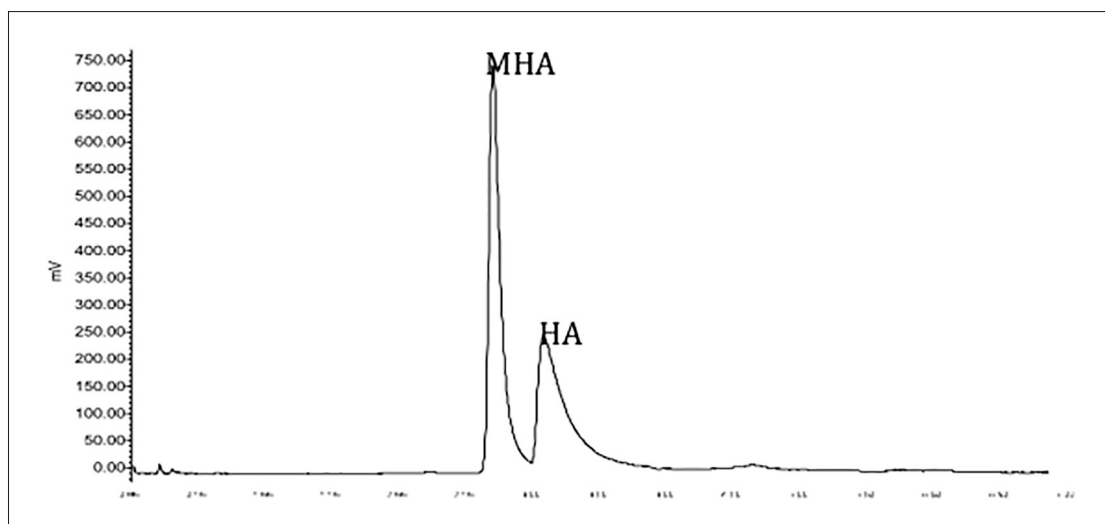


Figura 7. Cromatograma obtenido tras la inyección de un patrón de 25 mg/l de histamina y MHA

Tabla 3. Composición de las fases móviles y condiciones cromatográficas del método desarrollado para la identificación y separación de la HA y MHA

Eluyente A	Solución acuosa con acetato sódico 0,1M y octanosulfonato sódico 10 mM; pH 4.8
Eluyente B	Eluyente A: Acetonitrilo (6,6:3,4); pH 4.5
Fase estacionaria	Columna Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1x50mm). 42°C
Inyección muestra:	1 μ l
Flujo de fase móvil	0.8 ml/min
Detección fluorimétrica	Excitación: 340nm; Emisión: 445 nm

Tabla 4. Programa del gradiente de elución para el análisis cromatográfico de la HA y la MHA

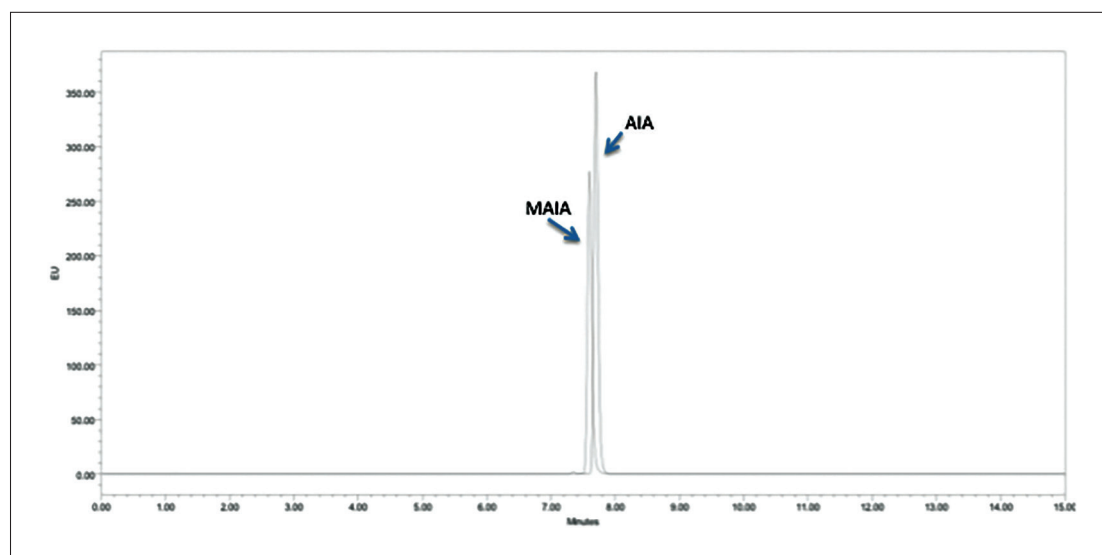
Tiempo (min)	0:00	2:00	3:00	4:00	5:00	6:00	6:40	7:00
Fase A (%)	80	80	60	50	40	20	80	80
Fase B (%)	20	20	40	50	60	80	20	20

El AIA y el AMIA también se han podido separar (figura 8), utilizando las mismas condiciones cromatográficas que para la HA y la MHA (tablas 3 y 4) a excepción de la longitudes de onda que en este caso fueron de λ_{ex} 408 nm y λ_{em} 585 nm. No obstante, los tiempos de retención de los dos compuestos son muy similares, lo que puede dificultar su correcta identificación. Así pues se han de continuar haciendo pruebas y modificando las condiciones cromatográficas para poder separar mejor ambos compuestos.

NOTA: Actualmente nos encontrábamos trabajando en la mejora de la separación del AIA y AMIA y su elución simultánea junto la HA y MHA.

Además se necesita realizar más pruebas en el tratamiento de la muestra para poder aumentar la sensibilidad del método y poder identificar estos analitos en muestras biológicas como la orina.

Hasta que se disponga del método validado no se puede abordar la siguiente tarea sobre el estudio del perfil de eliminación de histamina y sus metabolitos en orina para la caracterización de personas intolerantes a la histamina.

**Figura 8.** Cromatograma obtenido tras la inyección de un patrón de 6 mg/l de AIA y AMIA

4.2.2. Elaboración de un cuestionario para la selección previa de voluntarios potencialmente intolerantes a la histamina

El cuestionario figura 9 se elaboró basándose en el de la “Asociación Española de Déficit de DAO” (<http://biofuncionalismo.com/test-migrana-y-alimentacion>). Además de los datos personales, el cuestionario incluye una serie de preguntas relacionadas con los principales trastornos de salud o sintomatologías relacionados con la intolerancia a la histamina, así como sobre información sobre la pauta de medicación del encuestado, con el fin de saber si consume algún fármaco con capacidad para inhibir la DAO. Los resultados de esta prueba permitirán preseleccionar individuos intolerantes a la histamina. Así, aquellos encuestados que respondan sufrir uno o más síntomas, siempre y cuando accedan a participar en el estudio, se les realizará una prueba confirmatoria del nivel de enzima DAO mediante la prueba bioquímica DAO-ELISA D-HIT[®]. Asimismo, este cuestionario permitirá seleccionar la población sana, como grupo control.

El cuestionario se realizará, on-line o en persona entre los alumnos del “Campus de l’Alimentació de Torribera”.

4.3. DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD AMINO OXIDASA DE CEPAS PROBIÓTICAS.

En primer lugar, con el objetivo de comprobar la eficacia de la metodología utilizada para determinar la capacidad de metabolizar la histamina por parte de los microorganismos se analizaron 4 cepas de *Lactobacillus sakei* (Lu10.10, Lu10.11, Lu10.15, Lu10.16), de las que previamente se había descrito ya esta capacidad (Dakapavicius y col., 2000). Las cepas fueron amablemente cedidas por la Dra. Wolkers-Rooijackers de la Wageningen Agricultural University (Holanda). Todas las cepas de *L. sakei* mostraron actividad DAO. La tabla 4 muestra los porcentajes de reducción de histamina obtenidos para las 4 cepas de *L. Sakei*, que oscilaron entre el 8 y el 50%. Estos resultados indican la validez de la metodología para evaluar la actividad DAO in vitro en microorganismos.

Se evaluó la capacidad de reducir la histamina en cepas de diferentes especies bacterianas. Algunas de ellas son especies utilizadas frecuentemente como cultivos iniciadores y que han sido previamente descritas en la bibliografía por mostrar cierta actividad DAO o bien cepas procedentes de productos comercializados como

Cuestionario Intolerancia a la Histamina

*Obligatorio

Fecha *
dd/mm/aaaa

Datos Personales

Nombre y Apellidos
[]

Género *
[]

Fecha de nacimiento *
dd/mm/aaaa

Lugar de residencia
[]

¿Sufre alguna enfermedad?
[]

En el caso que Sí, especifique cual
[]

Si toma de manera habitual algún tipo de medicación, especifique cual
[]

¿Sufre alguna intolerancia alimentaria?
[]

En el caso que Sí, especifique cual:
[]

En relacion a la siguiente sintomatología:

¿Padece dolor de cabeza o ataques de migraña al menos dos veces al mes? *
[]

En el caso que Sí, ¿aparece después de beber alcohol o comer algún tipo de alimento concreto?
[]

especifique qué alimentos:
[]

¿Tiene estreñimiento y/ o diarrea en ocasiones sin saber por qué? *
[]

¿Tiene la sensación de hinchazón de abdomen? *
[]

¿Tiene flatulencia, molestias o dolores, o digestiones pesadas después de las comidas, aún sin haber comido en exceso? *
[]

¿Le duele la espalda o sufre dolores musculares y/o articulares o contracturas? *
[]

¿Tiene la piel seca, se pone roja en determinadas ocasiones, o le salen con frecuencia rojezes, granitos o erupciones, o le ha dicho alguna vez que tiene piel atópica? *
[]

¿Se encuentra muy cansado/a siempre y no sabe por qué? *
[]

¿Alguna vez le han sugerido, insinuado o diagnosticado que tiene fibromialgia?
[]

Si quiere puede añadir cualquier comentario
[]

Figura 9. Cuestionario para la preselección de individuos intolerantes a la histamina

probióticos. En la tabla 5 se muestran los resultados de la actividad histaminasa (actividad DAO) de las diferentes cepas ensayadas. De todas las muestras ensayadas, únicamente el probiótico de la marca A, formado por *Streptococcus thermophilus* DSM24731, *Bifidobacteria breve* DSM24732, *B. longum* DSM24736, *B. Infantis* DSM24737, *Lactobacillus acidophilus* DSM24735, *L. plantarum* DSM 24730, *L. paracasei* DSM24733, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM24734, mostró capacidad para reducir el contenido de histamina in vitro (15%), atribuible exclusivamente a las cepas de *Lactobacillus*.

En la literatura existen algunos estudios sobre la actividad histaminasa en bacterias, normalmente lácticas, con el objetivo principal de utilizarse como cultivos iniciadores capaces de reducir los contenidos de histamina en algunos tipos de alimentos fermentados, como quesos, (Herrero-Fresno y col., 2012), embutidos fermentados (Leuschner y col., 1998), pasta de pescado (Dapkevicius y col., 2000, Mah y col., 2009 Zamman y col., 2010)

o vino (Capozzi y col., 2012, Cueva y col., 2012). Como se puede apreciar en la tabla 6 existe una amplia variabilidad en el porcentaje de la actividad histaminasa descrita en diferentes especies de microorganismos e incluso entre cepas de la misma especie. La falta capacidad para metabolizar la histamina del medio de cultivo encontrada en algunas cepas en este estudio contrastan con los encontrados en otros trabajos en los que estudiaban las mismas especies de microorganismos como en el caso de *L. casei* (García-Ruiz y col., 2011; Herrero-Fresno y col., 2012), de *S. xylosus* (Mah y col., 2009) o de *L. plantarum* (Capozzi y col., 2012). Este hecho parece confirmar que esta actividad enzimática es cepa dependiente.

Por otro lado, se observó una pérdida de la actividad DAO en las cepas de *L. sakei* después de crecer repetidamente en un medio de cultivo nutritivo. En base a estos resultados, se planteó la hipótesis de que el gen que codifica el enzima DAO no se encuentre en el ADN

Tabla 5. Actividad DAO de las diferentes cepas de bacterias ensayadas

Productos probióticos y/o especies bacterianas	Capacidad DAO (% reducción de histamina) *
Marca A <i>Streptococcus thermophilus</i> DSM24731, <i>Bifidobacteria breve</i> DSM24732, <i>B. longum</i> DSM24736, <i>B. Infantis</i> DSM24737, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM24735, <i>L. plantarum</i> DSM 24730, <i>L. paracasei</i> DSM24733, <i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> DSM24734	POSITIVO (15 % ± 3.1)
Marca B <i>Bifidobacterium lactis</i> BL-04, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM(R)	NEGATIVO
Marca C <i>Sacharomices boulardii</i>	NEGATIVO
Marca D <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. longum</i>	NEGATIVO
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC9338	NEGATIVO
<i>Streptococcus thermophilus</i> (fermentos lácteos comerciales)	NEGATIVO
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> (fermentos lácteos comerciales)	NEGATIVO
<i>Lactobacillus casei inmunitas</i> (fermentos lácteos comerciales)	NEGATIVO
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	NEGATIVO
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971	NEGATIVO
<i>Lactobacillus sakei</i> LU 1010	POSITIVO (50% ± 9.1)
<i>Lactobacillus sakei</i> LU 1011	POSITIVO (23 % ± 12.7)
<i>Lactobacillus sakei</i> LU 1015	POSITIVO (40% ± 10.7)
<i>Lactobacillus sakei</i> LU 1016	POSITIVO (8 % ± 1.1)

* Degradación de histamina medido por UHPLC_FL en relación a los 50 mg/l de histamina presentes en el medio de ensayo después de 48 horas de incubación a 37°C y 150 rpm.

Tabla 6. Estudios que describen actividad DAO de bacterias aisladas de alimentos

Especies Bacterias	% degradación de Histamina	Referencia
<i>Rhodococcus sp.</i>	100	Leuschner y col., 1998
<i>Micrococcus sp.</i>	55,83	Leuschner y col., 1998
<i>Brevibacterium linens.</i>	90,00	Leuschner y col., 1998
<i>Lactobacillus sakei</i>	50 – 54	Dapkevicius y col. 2000
<i>Atenaria sp, Epicoccum nigrum, Penicillium citrurum, Pnome sp, Ulocladium Chartarum, Penicillium roqueforti</i>	100	Cueva y col., 2012
<i>Staphylococcus xylosus</i>	40	Mah y col., 2009
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	60	Zaman y col., 2010
<i>Staphylococcus carnosus</i>	29	Zaman y col., 2010
<i>Lactobacillus casei IFI-CA 52</i>	54	García-Ruiz y col. 2011
<i>Lactobacillus sakei</i>	50	Naila y col., 2012
<i>Lactobacillus casei</i>	14-56	Herrero-Fresno y col., 2012
<i>Lactobacillus Plantarum</i>	2-9	Capozzi y col., 2012

cromosómico si no que probablemente se encuentre localizado en un plásmido. Además, esta hipótesis explicaría el hecho de que la actividad amino oxidasa sea cepa dependiente.

Con este objetivo, se estudió la presencia de plásmidos en las cepas de *L. Sakei* Lu10.10 y Lu10.16, que pudiesen contener dicho gen. Por el momento, además del ADN genómico de cada una de las cepas, también se ha obtenido ADN plasmático, lo que indica la presencia de plásmidos en estas cepas. En estos momentos se está secuenciando en el Servicio de Genómica del Instituto de Biotecnología y de Biomedicina (UAB) las secuencias de ADN genómico y plasmático de estas cepas y de otra cepa de *L. sakei* (sin actividad DAO in vitro) para hacer un análisis comparativo con el fin de encontrar regiones diferentes entre las cepas positivas (capaces de degradar histamina) y la negativa (incapaz de degradar histamina) y que puedan corresponder a la secuencia de una proteína con actividad amino oxidasa.

5. CONCLUSIONES

El objetivo global de este trabajo fue aportar evidencia científica a la relación entre actividad DAO y los síntomas asociados a la intolerancia a la histamina. Los avances alcanzados han supuesto la puesta en marcha de una nueva línea de investigación en nuestro equipo de trabajo en la se prevé el desarrollo de una nueva Tesis doctoral.

Estudio de la relación existente entre actividad DAO y la concentración de histamina, tanto en el intestino como en plasma.

- Se ha comprobado que la administración de histamina no modifica la DAO en ninguno de los tejidos estudiados por lo que se puede concluir que ésta no es una enzima inducible por la presencia de sustrato.
- Se ha comprobado la validez del modelo de experimentación en animales desarrollado para el estudio de las interacciones entre la histamina dietética y medicamentos. Ello permitirá en el futuro el estudio de este tipo de interacciones alimento-medicamento.

No se ha podido estudiar el efecto de la administración exógena de histamina sobre las concentraciones plasmáticas de la misma. El pequeño volumen de las muestras de sangre obtenido no permite el uso de las técnicas instrumentales habituales en nuestro laboratorio. Tampoco son adecuados los kits comerciales para la determinación inmunológica de la histamina ya que están diseñados para determinar histamina en cantidades superiores a las concentraciones plasmáticas. Actualmente se está trabajando en mejorar la sensibilidad del método analítico para adaptarlo a las necesidades del estudio.

ESTUDIO DEL PERFIL DE ELIMINACIÓN EN ORINA DE HISTAMINA Y SUS METABOLITOS Y SU POSIBLE APLICACIÓN COMO BIOMARCADOR DE LA INTOLERANCIA A LA HISTAMINA POR DÉFICIT DE DAO

- a) Se ha puesto a punto un procedimiento analítico para la determinación de histamina y de sus metabolitos en orina que, aunque no ha podido ser validado en su totalidad, debido a problemas en la instrumentación, permitirá la determinación simultánea y fiable de estos compuestos en orina de individuos sanos y en intolerantes a la histamina.
- b) Se ha desarrollado un cuestionario para el cribado de voluntarios sanos y de intolerantes a la histamina.

En este apartado es en el que se han encontrado mayores dificultades. El tiempo requerido para la puesta a punto del método analítico ha sido muy superior al estimado. Ahora estamos en disposición de empezar los ensayos con orinas de voluntarios. Cara al futuro y dado los problemas que ha planteado la determinación de los metabolitos de histamina con detección fluorimétrica y espectrofotométrica se ha empezado a trabajar en colaboración con los servicios científico técnicos de la universidad de Barcelona en la puesta a punto de un método por cromatografía líquida de alta eficacia y detección por espectrometría de masas.

ESTUDIO DE LA APLICABILIDAD DE ALGUNAS BACTERIAS PROBIÓTICAS CON CAPACIDAD DAO PARA REDUCIR LAS REACCIONES ASOCIADAS A LA INTOLERANCIA A LA HISTAMINA INICIALMENTE POR ELLO NO HA SIDO POSIBLE

- a) Se ha comprobado la eficacia de la metodología empleada para determinación de actividad DAO en cepas probióticas.
- b) Entre las diversas cepas aisladas de alimentos y probióticos comerciales estudiados destacan por su elevada capacidad DAO los microorganismos de la especie *Lactobacillus sakei*, aunque ésta parece ser cepa dependiente.
- c) La actividad DAO de las cepas de *L. sakei* se pierde tras su siembra repetida en medio de cultivo. Ello y el que la actividad DAO sea cepa dependiente indica que probablemente esta actividad pueda estar codificada en un plásmido.

Aunque inicialmente estaba contemplado comprobar la actividad DAO en un elevado número de probióticos comerciales y cepas aisladas de alimentos, solo se ha llevado a cabo en 14 muestras. Antes de ampliar más este screening es necesario comprobar la hipótesis de que la actividad DAO esté ligada a un plásmido. Éste se ha convertido es un nuevo objetivo no incluido en el proyecto inicial. Si se confirma que la actividad DAO está ligada a un plásmido se abren nuevas perspectivas, ya que una

actividad enzimática de este tipo resultaría mucho más fácil de transferir de unos organismos a otros. Para comprobar la hipótesis se han aislado los ADN plasmáticos y genómicos de las cepas de *L. sakei* que mostraron más actividad y de una cepa de *L. sakei* exenta de la misma. Actualmente estamos pendientes de los resultados de su secuenciación.

La valoración personal del trabajo, a pesar de las dificultades expuestas, resulta positiva. Es un proyecto pluridisciplinar que ha permitido establecer sinergias entre los distintos miembros del equipo de investigación, hecho que enriquece y anima a continuar. Los logros alcanzados en este año de trabajo son el pilar para el desarrollo de nuevas investigaciones en esta línea.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahrens F, Gäbel G, Garz B, Aschenbach JR. Release and permeation of histamine are affected by diamine oxidase in the pig large intestine. *Inflamm. Res*, 2002, (51) S83-S84.
- Barocelli E, Ballabeni V, Ghizzardi P, Cattaruzza F, Bertoni S, Lagrasta CA, Impicciatore M. The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Nitric Oxide*, 2006 (14:3) 212-218.
- BIOHAZ. EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 2011, (9), 2393.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976 (72) 248-254.
- Capozzi V, Russo P, Ladero V, Fernández M, Fiocco D, Alvarez MA, Grieco F, Spano G. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*, 2012, (3) 122.
- Cueva C, García-Ruiz A, González-Rompinelli E, Bartolomé B, Martín-Álvarez PJ, Salazar O, Vicente MF, Bills GF, Moreno-Arribas MV. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking, 2012, (112) 672-82.
- Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 2000, (57) 107-114.
- Duncan JG, Waton NG. Absorption of histamine from the gastrointestinal tract of dogs in vivo. *J Physiol*. 1968 (198:3) 505-15.
- Fujisaki J, Fujimoto K, Oohara A, Sakata T, Hirano M, Ohyama T, Iwakiri R, Yamaguchi M. Roles of histamine and diamine oxidase in mucosa of rat small intestine after ischemia-reperfusion. *Dig Dis Sci*. 1993 (38:7) 1195-200
- García-Martín E. Histamine-N-Methyl Transferase Polymorphism and Risk for Migraine. *Headache*, 2008, (48) 1343-1348
- García-Ruiz A, González-Rompinelli E, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *Int J Food Microbiol*, 2011, (148) 115-120.
- Gardini F, Martuscelli M, Crudele MA, Paparella A, Suzzi G. Use of *Staphylococcus xylosum* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Sci*, 2002, (61) 275-283.
- Granerus G, Wass U. Urinary excretion of histamine, methylhistamine (1-MeHi) and methylimidazole acetic acid (melMAA) in mastocytosis: comparison of new HPLC methods with other present methods. *Agents and Actions*, 1984, (14) 3-4
- Herrero-Fresno A; Martínez N; Sánchez-Llana E; Díaz M; Fernández M; Martín MC; Ladero V; Alvarez MA. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 2012 (157) 297-304.
- Hui JY, Taylor SL. Reversed-phase ion-pair high-performance liquid-chromatographic procedure for determination of histamine and its metabolites in rat urine. *Journal of Chromatography* 1984 (312) 443-449.
- Houdi AA, Crooks PA, von Loon GR and Schubert CA. A simple and sensitive determination of histamine and N-tau-methylhistamine in biological-fluids by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1987 (76) 398-401.
- Istrate C, Hagbom M, Vikström E, Magnusson KE, Svensson L. Rotavirus infection increases intestinal motility but not permeability at the onset of diarrhea. *J Virol*. 2014 (88:6) 3161-3169.
- Itoh Y, Oishi R, Nishibori M, Saeki K. Characterization of histamine-release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 1991 (56) 769-774.
- Itoh Y, Oishi R, Saeki K. A highly sensitive assay for histamine using ion-pair HPLC coupled with postcolumn fluorescent derivatization—its application to biological specimens. *Journal of Neurochemistry*, 1992 (58) 884-889.
- Izquierdo J, Soler LI, Balaguer E, Mon D. Déficit de Diaminoxidasa como desencadenante de la migraña. *Rev.Neuro*, 2012, (55) 177.
- Izquierdo J, Mon D, Lorente M, Soler Singla L, Vidal C. Un estudio randomizado doble ciego para el tratamiento con Diaminoxidasa (DAO) en pacientes con Migraña y déficit de actividad DAO. XXI World Congress of Neurology. Viena/Austria. *Journal of the Neurological Sciences*, 2013, (333) 481-518.
- Jarisch R. *Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit*. 2nd ed. Thieme, Stuttgart, 2004.
- Kasziba E, Flancbaum L, Fitzpatrick JC, Schneiderman J, Fisher H. Simultaneous determination of histamine-containing dipeptides, histamine, methylhistamine and

- histidine by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, 1988 (432) 315–320.
- Kawanishi H, Toyo'oka T, Ito K, Maeda M, Hamada T, Fukushima T, Kato M, Inagaki S. Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006 (1132) 148-156.
- Kitanaka N, Kitanaka J, Nishiguchi M, Kinoshita H, Ouchi H, Minami T, Hishida S, Takemura M. Decreased histaminestimulated phosphoinositide hydrolysis in the cerebral cortex of a rat line selectively bred for high alcohol preference. *Neurochemical Research*, 2004 (29) 1431–1436.
- Kazachkov M, Chen K, Babiy S, Yu PH. Evidence for in vivo scavenging by aminoguanidine of formaldehyde produced via semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 (322:3) 1201-1207.
- Klocker J, Mätzler SA, Huetz G-N, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm. Res*, 2013, (54) S54-S57.
- Latorre-Moratalla ML, Bosch-Fusté J, Lavizzari T, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A*, 2009, (1216) 7715–7720.
- Klocker J, Mätzler SA, Huetz GN, Drasche A, Kolbitsch C y Schwelberger HG. Synthesis, metabolism and release of histamine: Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm. Research*, 2005 (54) S54–S57.
- Mah JJ, Hwang HJ. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* 2009, (20) 796-801.
- Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *American J. Clin. Nutrit*, 2007, (85), 1185-1196.
- Mine K, Jacobson KA, Kirk KL, Kitajima Y, Linnoila M. Simultaneous determination of histamine and N-tau-methylhistamine with high-performance liquid-chromatography using electrochemical detection. *Analytical Biochemistry* 1986, (152) 127–135.
- Mikaël Croyal, Yves Dauvilliers, Olivier Labeeuw, Marc Capet, Jean-Charles Schwartz, Philippe Robert. Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry with precolumn derivatization. *Analytical Biochemistry*, 2011 (409) 28–36
- Oguri S, Yoneya Y. Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques. *Journal of Chromatography B*, 2002, (781)165-179.
- O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol*, 1993, (59) 2730-2733.
- Rauscher-Gabernig E, Grossgut R, Bauer F, Paulsen P. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control*, 2009, (20), 423-429.
- Saito K, Horie M, Nose N, Nakagomi K, Nakazawa H. Highperformance liquid-chromatography of histamine and 1- methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography* 1992, (595) 163–168.
- Saito K, Horie M, Nakazawa H. Determination of urinary-excretion of histamine and 2-methylhistamine by liquid-chromatography. *Journal of Chromatography B*, (1994) 654: 270–275.
- Sattler J, Häfner D, Klotter HJ, Lorenz W and Wagner PK. Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*, 1988 (23), 361-365.
- Tian R, Tan JT, Wang RL, Xie H, Qian YB y Yu KL. The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 2013 (17) 349-355.
- Toyo'oka. Separation assay of histamine and its metabolites in biological specimens. *Biomed Chrom*, 2008, (22), 919–930.
- Tsuruta Y, Kohashi K, Ohkura Y. Simultaneous determination of histamine and N-tau-methylhistamine in human-urine and rat-brain by high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 1981, (224) 105–110.
- van Haaster CM, Engels W, Lemmens PJ, Hornstra G and van der Vusse JG. Rapid and Highly sensitive high-performance liquidchromatographic method for the determination of histamine and 3-methylhistamine in biological samples using fluorescamine as the derivatizing agent. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, 1993 (617) 233–240.
- Vidal-Carou MC, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Bover-Cid S Biogenic amines: risks and control, 2007, Pages 455-468 in: *Handbook of fermented meat and poultry*. Vol. Chapter 43. F. Todrà, Y. H. Hui, I. Astiasarán, Wai-Kit Nip, J. G. Sebranek, E. T. F. Silveira,

L. H. Stahnke, and R. Talon (eds.) Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Vidal C, Titus F, Guayta-Escolies R. Evaluación del déficit de diaminoxidasa en pacientes con migraña (Estudio MigraDAO). Jornada Internacional de Sensibilización sobre la migraña 2010.

von Vietinghoff V, Gabel G, Aschenbach JR. High-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 1-methylhistamine in biological buffers. *Journal of Chromatography B*, 2006, (844) 335–339.

Wang Z, Wu J, Wu S, Bao A. High-performance liquid chromatographic determination of histamine in biological samples: the cerebrospinal fluid challenge –A review. *Anal Chim Act*, 2013 (774) 1-10.

Zaman MZ, Bakar FA, Jinap S, Bakar J. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol*, 2010, (145) 84-91.

Zhang Y, Tingley F, Tseng E, Tella M, Yang X, Groeber E, Liu J, Li W, Schmidt C, Steenwyk R Development and validation of a sample stabilization strategy and a UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantitation of acetylcholine (ACh), histamine (HA), and its metabolites in rat cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B*, 2011, (879) 2023-2033.