

Determinação da N-metilhistamina na Urina após Provocação Brônquica com Água Destilada

J. P. MOREIRA DA SILVA * - JOSEFINA RODRIGUES * - J. T. COSTA * - F. CARBALLADA * - LUÍS DELGADO **
ROSA M. MIRANDA *** - M. TERESA SERRA *** - MARIANELA VAZ **** - Porto - Portugal

RESUMO

Durante os últimos anos foram isolados potentes mediadores dos mastócitos e outras células inflamatórias com grande significado nas alterações das vias aéreas na asma. Sabe-se que a histamina é um importante mediador nas doenças alérgicas mas o seu papel exacto na asma ainda não está bem estabelecido. A nebulização ultrassónica com água destilada (AD) é um bom teste na avaliação da hiperreactividade brônquica e a libertação de mediadores por via não imunológica. Com o objectivo de avaliar o envolvimento da histamina na AD, mediram-se os níveis de N-metilhistamina urinária em 22 asmáticos (10 homens e 12 mulheres), idade média $22,2 \pm 9$ anos, antes e 1, 2, 3 e 4 horas após o teste. Somente 16 em 22 doentes tiveram queda significativa do VEMS (20%). Houve uma variação dos valores individuais da excreção de N-metilhistamina sem padrão consistente. Não havia diferenças significativas entre respondedores e não respondedores e entre atópicos e não atópicos, sugerindo que a libertação local de mediadores é mais relevante na asma induzida por AD.

PALAVRAS-CHAVE: Hiperreactividade brônquica, teste de água destilada, N-metilhistamina urinária.

SUMMARY

During the last years many potent mediators have been isolated from mast cells and other inflammatory cells which could be of great significance in the development of airway changes in asthma. It is known that histamine

is an important mediator in allergic diseases but its precise role in asthma is not yet, completely established. Ultrasonically nebulized distilled water (UNDW) challenge is a good test to evaluate bronchial reactivity and non-immunological release of mediators. To evaluate the involvement of histamine in UNDW, N-metilhistamine urinary levels were measured in 22 asthmatics (10 male and 12 female), mean age 22.2 ± 9 years, before, 1, 2, 3 and 4 hours after the challenge. Only 16/22 patients had a significant fall in Fev₁ (20%). There was a wide variation in individual values with no consistent pattern of N-metilhistamine excretion. No significant differences in responders or atopic patients were found, suggesting that local mediator release is more relevant to UNDW induced asthma.

KEY-WORDS: Bronchial hyperreactivity, Distilled Water, N-metilhistamine.

INTRODUÇÃO

As vias aéreas dos doentes asmáticos respondem com broncoconstricção à administração de água destilada em nebulização ultrassónica (1-6), o que não acontece nos indivíduos normais. Os mecanismos pelos quais este estímulo provoca broncoconstricção ainda não estão completamente esclarecidos mas pensa-se que um deles será a libertação de mediadores mastocitários.

A histamina, um dos mediadores pré-formados com maior importância nas reacções de hipersensibilidade imediata é sintetizada e armazenada em mastócitos e basófilos. Está demonstrado que os doentes asmáticos têm mastócitos no lumen das vias aéreas e que estes têm a capacidade de libertarem mais histamina do que os de indivíduos normais (7,8).

Foi verificado em estudos "in vitro" que os mastócitos libertam histamina quando mergulhados em solutos hipotónicos, provavelmente por entrada de água para o interior das células levando-as à desgranulação (9, 10, 11).

* Interno Complementar de Imunoalergologia

** Interno Complementar de Imunoalergologia e Assistente de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto

*** Assistente Hospitalar de Nefrologia

**** Chefe de Serviço e Directora da Unidade de Imunoalergologia
Unidade de Imunoalergologia - Medicina IV - Hospital S. João

Vários autores têm procurado avaliar as variações da histaminémia após provação com exercício (12,13,14,15) e com alergénio (16,17,18), mas os resultados têm sido discrepantes, talvez devido à semi-vida curta da histamina (19) e a artefactos na sua determinação (20).

Este trabalho teve por objectivo determinar um dos metabolitos da histamina (N-metilhistamina) na urina de modo seriado após provação com água destilada nebulizada ultrassónicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 22 doentes asmáticos, 12 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 13-43 anos (média de $22,2 \pm 9$) sendo 16 atópicos e 6 não atópicos. Todos os doentes estavam em situação clínica estável não referiam nenhuma infecção respiratória nas 4 semanas que precederam o estudo e suspenderam todos os fármacos suspect'veis de interferirem nos resultados pelos períodos habitualmente recomendados (21). O VEMS basal (% previsto para o sexo, idade e altura) era superior a 80% em todos os indíviduos estudados.

Foram dadas instruções para não haver ingestão de alimentos que contêm histamina nas 48 horas anteriores ao estudo. Este constitui na realização de um teste de provação com água destilada administrada em nebulização ultrassónica e na determinação da N-metilhistamina em várias amostras de urina, colhidas antes da prova, uma, duas, três e quatro horas após o fim da mesma. Após medição do volume de cada colheita, congelou-se uma amostra à temperatura de -20°C.

O teste de provação com água destilada foi efectuado usando inalações sequenciais de água destilada, esterilizada à temperatura ambiente, administrada por um nebulizador ultrassónico modelo Heyer USE 77, fazendo variar o débito de 2 ml para 4 ml (débito medido volumétricamente em várias ocasiões) e o tempo de cada inalação: as duas primeiras duravam 1 minuto, as duas seguintes 2 minutos e a última 4 minutos. Administraram-se assim doses cumulativas de água destilada de 2, 4, 8, 16 e 32 ml de água (fig. 1). A prova era suspensa quando havia queda de VEMS de pelo menos 20% em relação ao valor basal ou após a administração dos 32 ml, se tal não se verificasse.

Determinação da N-Metilhistamina na Urina

O doseamento de N-metilhistamina (N-MH) na urina foi feito por um método de anticorpo duplo RIA (Pharmacia® Histamine RIA 50) segundo instruções do fabricante (fig. 2).

As amostras de urina foram descongeladas e diluídas em PBS a 1:51; adicionou-se 200µl desta urina diluída ou de N-MH standard à mesma quantidade de 125 I-histamina acoplada a albumina sérica do cão; em seguida juntaram-se 200µl de anticorpo monoclonal específico e a mistura

foi incubada (16-20h) durante a noite a 4°C. No dia seguinte separou-se a N-MH livre e ligada, por adição de um segundo anticorpo (Imunosorbent) com incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação e decantação determinou-se a radioactividade no resíduo.

Determinou-se em cada amostra de urina a creatinina excretada, tendo os valores de N-MH encontrados sido expressos em mmol de N-MH/mol de creatinina.

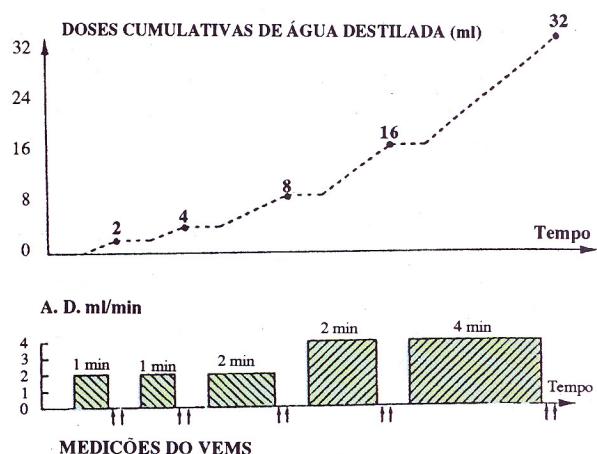


FIG. 1- Diagrama ilustrativo da prova de provação com água destilada

PHARMACIA® HISTAMINE RIA

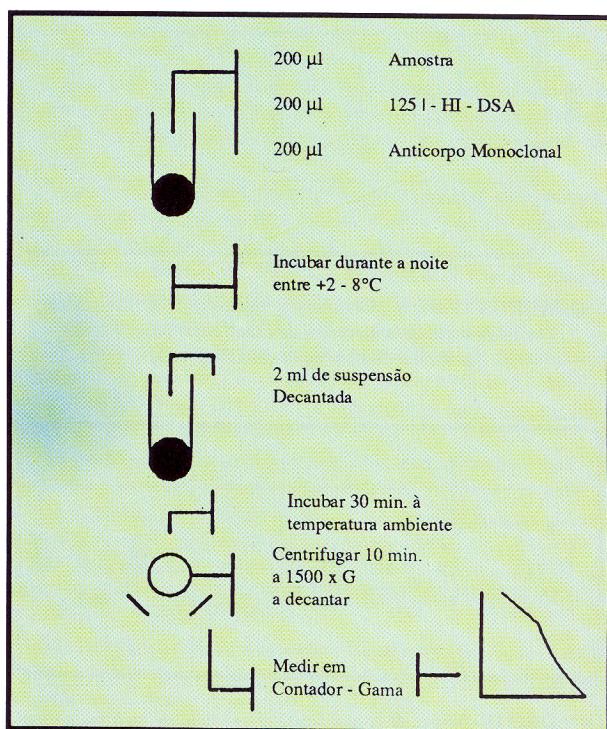


FIG. 2 - Método laboratorial usado na determinação da N-metilhistamina na urina.

RESULTADOS

Dos 22 doentes submetidos ao teste de provação com água destilada, apenas 16 apresentaram queda de VEMS $\geq 20\%$, com volumes de água destilada inferiores a 32ml.

Verificou-se uma grande variabilidade dos valores individuais sem nenhum padrão consistente de excreção de N-metilhistamina na urina no grupo dos 22 casos avaliados em conjunto (Quadro I). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os níveis médios de N-metilhistamina dos respondedores com os dos não respondedores à água destilada (Quadro II). Também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os níveis médios de N-metilhistamina dos doentes atópicos com os dos não atópicos (Quadro III).

QUEDA DO VEMS APÓS PROVOCAÇÃO COM AD

DOENTES n=22	BASAL	1 H	2 H	3 H	4 H
1	98	55	86	100	110
2	112	136	95	108	178
3	99	100	87	156	118
4	94	61	82	83	111
5	142	113	43	177	185
6	88	65	91	62	50
7	164	198	68	62	147
8	143	120	132	1103	81
9	9	352	45	57	70
10	188	88	128	185	190
11	217	191	153	156	152
12	132	146	183	105	105
13	336	335	273	246	263
14	152	180	108	163	97
15	172	131	152	192	381
16	166	115	147	195	149
Médias	139,3	151,3	118,9	176,4	145,7

QUADRO I - Valores individuais e médios de N-metilhistamina (mmol N-metilhistamina/mol de creatinina) basal e após provação com água destilada (AD).

	BASAL	1H	2H	3H	4H
Com queda (A) N = 16 EP	144,5 $\pm 17,7$	149,0 $\pm 21,4$	117,1 $\pm 14,4$	196,9 $\pm 62,0$	149,2 $\pm 20,4$
Sem queda (B) N = 6 EP	125,5 $\pm 16,8$	157,2 $\pm 53,4$	123,7 $\pm 14,2$	121,8 $\pm 17,2$	246,7 $\pm 13,6$

QUADRO II - Níveis de N-metilhistamina (mmol N-metilhistamina/mol de creatinina) em respondedores (A) e não respondedores (B) à água destilada. Média e erro padrão da média; $p > 0,05$ em qualquer comparação.

	BASAL	1H	2H	3H	4H
Atópicos (média) N = 16 EP	140,0 $\pm 18,3$	170,5 $\pm 26,6$	138,0 $\pm 23,3$	134,4 $\pm 14,6$	147,0 $\pm 14,3$
Não atópicos (média) N = 6 EP	123,8 $\pm 13,4$	99,9 $\pm 15,3$	162,5 $\pm 34,2$	164,0 $\pm 47,6$	165,0 $\pm 47,1$

QUADRO III - Valores médios de N-metilhistamina (mmol N-metilhistamina/mol de creatinina) em atópicos e não atópicos à água destilada. Média e erro padrão da média; $p > 0,05$ em qualquer comparação.

DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que a inalação de água destilada é um estímulo broncoconstritor em indivíduos com asma (1-6). O mecanismo envolvido não está perfeitamente esclarecido, mas o facto da broncoconstrição poder ser inibida pelo cromoglicato dissódico (6, 22) e por antihistaminicos nomeadamente a terfenadina (23, 24) apoia a hipótese de estar envolvida a libertação de mediadores.

A histamina, um importante mediador químico nas reacções de hipersensibilidade imediata, é sintetizada e armazenada em mastócitos e basófilos.

Em trabalhos recentes tem sido demonstrado que as variações osmóticas são responsáveis não só pelo desencadear do broncospasmo após inalação de solutos hipertónicos e hipotónicos (1, 2, 5) mas também pela asma induzida pelo esforço e pela tosse (25). A libertação de mediadores mastocitários (histamina e factor quimiotáctico de neutrófilos) tem sido associada às quedas do VEMS verificadas após o exercício e provação com água destilada (26, 27, 28).

Também se tem observado "in vitro" que os mastócitos do rato quando incubados em solutos hipoosmolares libertam histamina (9, 29). Esta libertação, em resposta a soluções hipo ou hiperosmolares parece dar-se de uma forma dependente da dose (11).

Os resultados dos diferentes trabalhos sugerem algumas hipóteses quanto ao mecanismo subjacente à broncoconstrição observada após provação com o exercício (30, 31).

Em alguns estudos tem sido demonstrado alterações na histamina plasmática após provação antigénica (16, 17, 32, 33). No entanto dado que os métodos usados não eram específicos para a histamina, os resultados não são fiables (34, 35). Em ensaios mais recentes executaram-se determinações mais precisas deste mediador no plasma (36, 37).

Aproximadamente 10% da histamina libertada na circulação sanguínea é metabolizada por N-metilação e excretada na urina. Têm sido descritos vários métodos para a determinação da histamina e seus metabolitos (38, 39, 40, 41). No entanto diversos factores têm contribuído para a baixa fiabilidade dos resultados. Por um lado, é um mediador que se mantém muito pouco tempo em circulação (19, 34) e por outro há artefactos técnicos que interfereem naqueles doseamentos. Parece assim que a determinação do seu metabolito principal na urina, a N-MH pode reflectir níveis sanguíneos da mesma, com a vantagem da estabilidade, acessibilidade e possibilidade de revisão retrospectiva das urinas.

Neste trabalho encontramos valores urinários de N-MH muito dispersos, não havendo diferenças entre respondentes e não respondentes à água destilada e entre atópicos e não atópicos.

Tal como tem sido observado para os níveis urinários e N-MH não parecem estar relacionados com as respostas brônquicas à provocação com água destilada. Provavelmente mediadores locais entre os quais a histamina, parecem ser mais relevantes na broncoconstricção induzida pela água destilada, sem no entanto haver alterações nos seus níveis sanguíneos e urinários.

BIBLIOGRAFIA

1. Allegra L, Bianco S: Non-specific broncho-reactivity obtained with ultrasonic aerosol of distilled water. *Eur J Respir Dis* 61 (suppl 106): 41-43, 1980.
2. Schoeffel RE, Anderson SD, Althouyan RE: Bronchial hyperreactivity in response to inhalation of ultrasonically nebulized solutions of distilled water and saline. *Br Med J* 283: 1285-1287, 1981.
3. Azevedo M, Fontes P, Castel-Branco MG et al: Bronchial reactivity to ultrasonically nebulized distilled water (UNDW) in controls and patients with rhinitis and asthma (abstract). *Allergol Immunopathol* 15: 284, 1987.
4. Azevedo M, Costa JT, Silva JM et al: Comparison of bronchial reactivity to ultrasonically nebulized distilled water (UNDW) and methacholine (M) in asthmatic (abstract). *Allergol Immunopathol* 15: 284, 1987.
5. Allegra L, Bianco S: Ten years with "Fog induced" bronchoconstriction in adults and children: In allegra L, Rizzato G eds. Proceedings of the fourth Congress of the European Society of Pneumology: Bronchitis and Emphysema, Milan and Stasa, Italy: Italian Journal of Chest Disease Publisher Inc, 1985.
6. Anderson SD, Schoeffel RE, Finney M: Evaluation of ultrasonically nebulized solutions for provocation testing in patients with asthma. *Thorax* 38: 284-291, 1983.
7. Ts'ao C, Patterson R, Makema JM et al: Ultrastructural identification of mast cells obtained from human bronchial lumens. *J Allergy Clin Immunol* 59: 320-326, 1977.
8. Flint KC, Leung KKP, Hudspith BN et al: Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma: a mechanism for the initiation of antigen-specific bronchoconstriction. *Br Med J* 291: 923-926, 1985.
9. Kaliner M, Austen FH: Cyclic AMP, ATP and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells. *J Immunol* 112: 664-674, 1974.
10. Bascom R, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM: Histamine release (HR) from human basophils and mast cells using hypotonic solutions. *Am Rev Respir Dis* 131: 30, 1985.
11. Rimmer PJ, Brow MJ: Effect of hypo and hyperosmolarity on basophil histamine release. *Clin Allergy* 16: 221-230, 1986.
12. Barner PJ, Brow MJ: Venous plasma histamine in exercise and hyperventilation induced asthma in man. *Clin Sci* 61: 159-62, 1981.
13. Hartley JPR, Charles TJ et al: Arterial plasma histamine after exercise in normal individuals and in patients with exercise induced asthma. *Clin Sci* 61: 151-157, 1981.
14. McFadden ER, Soter NA, Ingram RH: magnitude and site of airway response to exercise in asthmatics in relation to arterial histamine levels. *J Allergy Clin Immunol* 66: 472-477, 1980.
15. Morgan DJR, Moodley I, Phillips MJ, Davies RJ: Plasma histamine in asthmatic and control subjects following exercise: influence of circulation basophils and different assay techniques. *Thorax* 38: 771-77, 1983.
16. Bath KN, Arroyane CM, Marney SR et al: Plasma histamine changes during provoked bronchospasm in asthmatics subjects. *J Allergy Clin Immunol* 58: 647-56, 1976.
17. Atkins PC, Rosenblum F, Dunskey EH, Coffey R et al: Comparison of plasma histamine and cyclic nucleotides after antigen and methacholine inhalation in man. *J Allergy Clin Immunol* 66: 478-485, 1980.
18. Kayser JJ, Kauffman HF, de Manchy JGR et al: Urinary N-methylhistamine during early and late allergen-induced bronchial obstructive reactions. *J Allergy Clin Immunol* 74: 240-245, 1984.
19. Ind PW, Brown MJ, Lhoste FJM, Macquin IM, Dallery CT: Concentration effect relationships of infused histamine in normal volunteers. *Agents Actions* 12: 12, 1982.
20. Ind PW, Barnes PJ, Brown MJ, Causon R, Dollery CT: Measurements of plasma histamine in asthma. *Clin Allergy* 13: 61, 1983.
21. Townley RJ, Hopp RY: Inhalation methods for the study of airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 80 (2): 111-124, 1987.
22. Higenbottam T, Stokes TG, Jamieson S, Hill C: Bronchial reactivity in asthmatic adults with normal spirometric values. *Br Med J* 286: 1012-1014, 1983.
23. Effect of terfenadine and ipratropium Bromide on ultrasonically nebulized distilled water-induced asthma. *The Journal of International Medical Research* 18: 37-49, 1990.
24. Azevedo M, Smith R, Falcão H, Rodrigues J, Costa T, Lopes I: The effect of terfenadine on the asthmatic response to inhaled UNDW. *Clinical and Experimental Allergy*, vol 20 (suppl 1): p 37, July 1990.
25. Eschenbacher WL, Boushey HA, Sheppard D: Alterations in osmolarity of inhaled aerosols can cause bronchoconstriction and cough, but absence of a permeant anion causes cough alone. *Am Rev Respir Dis* 129: 211-215, 1984.
26. Shaw R, Durham S, Torzillo P, Shoeffel RE et al: Neutrophil chemoattractant activity following the inhalation of ultrasonically nebulized water (abstracts). *Aust N Z J Med* 13: 541, 1983.
27. Lee TH, Brown MJ, Nagy L, Causon R et al: Exercise induced release of histamine and neutrophil chemotactic factor in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 70: 73-81, 1982.
28. Shaw RJ, Anderson R, Durham SR et al: Mediators of hypersensitivity and "fog" induced asthma. *Allergy* 40: 48-57, 1985.
29. Day KO, Wade DN: Effect of various drugs on the osmotic lysis of rat mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 5: 477-85, 1978.
30. MacFadden ER Jr: Hypothesis: exercise induced asthma as a vascular phenomenon. *Lancet* vol 335: 880-883, 1990.
31. Anderson SD: Is there a unifying hypothesis for exercise induced asthma? *J Allergy Clin Immunol* 73: 578-583, 1984.
32. Durham SR, Lee TH, Merrett J, Brown MJ et al: Immunological studies of antigen induced late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol* 74: 49-60, 1984.
33. De Monchy JGR, Keyser JJ, Kauffman HF, Beaumont F, De Vries K: Histamine in late asthmatic reactions following house dust mite inhalation. *Agents Actions* 16: 252-5, 1985.
34. Ind PW, Brown MJ, Lhoste FJM, Macquin I, Dallery CT: Determination of histamine and its metabolites: concentration effect relationship of infused histamine in normal volunteers. *Agents Actions* 12: 12-13, 1983.

35. Kaliner M, Shelhamer JH, Offesen EA: Effects of infused histamine: correlation of plasma histamine levels and symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 69: 283-9, 1982.
36. Brown MJ, Ind PW, Causon R, Lee TH: A novel double iso topo technique for the enzymatic assay of plasma histamine: application to estimation of mast cell activation assessed by antigen challenge in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 69: 20-4, 1982.
37. Deyer J, Warren K, Merlin S, Metcalfe DD, Kaliner M: Measurement of plasma histamine: description of an improved method and normal values. *J Allergy Clin Immunol* 70: 82-87, 1982.
38. McBride P, Bradley D, Kaliner M: Evaluation of a radioimmunoassay for histamine measurements in biologic fluids. *J Allergy Clin Immunol* 82: 638-46, 1988.
39. Porter GF, Mitchell RG: The distribution of histamine in the blood of healthy and asthmatic children. *Clin Sci* 38: 131-43, 1970.
40. Mitchell RG, Thorm H, Richardson JE: Histamine metabolism in man. *J Allergy Clin Immunol* 54:110-14, 1974.
41. Stephan V, Zimmermann A, Kür J, Urbanek R: Determination of N-methylhistamine in urine as indicator of histamine release in immediate allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 86 (pt 1): 862-868, 1990.