



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Intolerància a la histamina

Noves estratègies de diagnòstic i tractament

Oriol Comas Basté



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Tesi doctoral  
**ORIOI COMAS BASTÉ**

# **INTOLERÀNCIA A LA HISTAMINA**

NOVES ESTRATÈGIES DE  
DIAGNÒSTIC I TRACTAMENT

2020





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia  
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació  
Universitat de Barcelona

# INTOLERÀNCIA A LA HISTAMINA

## NOVES ESTRATÈGIES DE DIAGNÒSTIC I TRACTAMENT

Directores:

**Dra. M. Carmen Vidal Carou**  
Catedràtica de Nutrició i Bromatologia

**Dra. M. Luz Latorre Moratalla**  
Professora lectora de Nutrició i Bromatologia

**ORIOL COMAS BASTÉ**

2020





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia  
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació  
Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat  
Alimentació i Nutrició

# INTOLERÀNCIA A LA HISTAMINA

## NOVES ESTRATÈGIES DE DIAGNÒSTIC I TRACTAMENT

Memòria presentada per Oriol Comas Basté  
per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Dra. M. Carmen Vidal Carou  
Directora i tutora

Dra. M. Luz Latorre Moratalla  
Directora

Oriol Comas Basté  
Doctorand

ORIOI COMAS BASTÉ  
2020



# FINANÇAMENT I SUPORT INSTITUCIONAL



Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya  
SGR-2017-1476



Projecte PERFILS de la Comunitat RIS3CAT  
per una Cadena Alimentària Sana, Segura i Sostenible (INNOAPAT)  
finançat pel Fons Europeu de Desenvolupament Regional



Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Gobierno de España  
AGL 2012-39995



Universitat de Barcelona  
Ajuts predoctorals per a doctorands de la Universitat de Barcelona (APIF-2015)



Projecte de col·laboració Universitat-Empresa  
DR Healthcare España, S.L. - Fundació Bosch i Gimpera



Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA·UB)



Campus de l'Alimentació de Torribera





## CITACIÓ BIBLIOGRÀFICA SUGGERIDA

Comas-Basté, O. (2020). Intolerància a la histamina. Noves estratègies de diagnòstic i tractament. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona (UB), Barcelona.

## CRÈDITS

Disseny i maquetació: Oriol Comas

Disseny gràfic de la portada: Silvia Bancells

Impressió: AGC - Arts Gràfiques Cristina (Blanes)

Aquesta tesi ha estat impresa amb paper reciclat procedent de boscos gestionats de manera sostenible.



## AGRAÏMENTS

Als meus, família i amics, pel suport incondicional.

Al grup de recerca d'Amines i Poliamines Bioactives dels Aliments,  
per l'acollida, el mestratge i tants bons moments compartits.



# ÍNDEX

1.	Resum   Abstract	1
2.	Introducció	7
2.1.	Histamina	8
2.1.1.	Histamina en els aliments	8
2.1.2.	Histamina en l'organisme humà	13
2.1.2.1.	Paper fisiològic de la histamina	13
2.1.2.2.	Metabolisme de la histamina	14
2.2.	De la intoxicació per histamina a la intolerància a la histamina, un canvi de paradigma	18
2.2.1.	Efectes adversos de la histamina dels aliments: Una aproximació a través de l'anàlisi del risc	25
	<a href="#">Publicació 1</a> : Histamine and other biogenic amines in foods. From scombroid poisoning to histamine intolerance (2019)	
2.3.	Intolerància a la histamina	47
2.3.1.	Etiologia de la intolerància a la histamina	50
2.3.2.	Diagnòstic de la intolerància a la histamina	56
2.3.3.	Abordatge clínic de la intolerància a la histamina	61
2.3.3.1.	Dieta baixa en histamina	61
2.3.3.2.	Suplementació exògena d'enzim DAO	66
3.	Objectius	71
4.	Resultats	75

## Àmbit 1: Risc associat al consum d'histamina

- 4.1. Avaluació probabilística del risc de patir efectes adversos per a la salut associat al consum d'un aliment potencialment ric en histamina i altres amines tant en la població sana com intolerant · · · · · 79

**Publicació 2:** Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population (2017)

## Àmbit 2: Relació entre la intolerància a la histamina i el dèficit de DAO

- 4.2. Estimació de la prevalença de dèficit de DAO en la població que pateix símptomes associats a la intolerància a la histamina · · · · · 93

**Publicació 3:** Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine (2018)

## Àmbit 3: Biomarcadors de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO com a nova eina diagnòstica

- 4.3. Desenvolupament i validació d'un mètode analític per a la determinació d'histamina i els seus metabòlits en orina · · · · · 107

**Publicació 4:** New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine (2017)

- 4.4. Estudi del perfil d'eliminació d'histamina i metilhistamina en orina per a l'eventual caracterització de persones intolerants a la histamina · · · · · 119

## Àmbit 4: Enzim DAO exogen com a tractament preventiu de la intolerància a la histamina

- 4.5. Desenvolupament d'un mètode per a la determinació de la capacitat de degradar histamina de diverses matrius · · · · · 129

**Publicació 5:** In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL (2019)

**Sol·licitud de patent:** Procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO) (2020)

4.6.	Contribució al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí	163
	<i>Publicació 6:</i> Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial (2019)	
4.7.	Noves fonts d'enzim DAO: potencial dels llegums per al tractament de la intolerància a la histamina	181
	<i>Publicació 7:</i> Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance (2020)	
5.	<b>Discussió</b>	195
6.	<b>Revisió global</b>	221
	<i>Publicació 8:</i> Histamine intolerance: The current state of the art (2020)	
7.	<b>Conclusions</b>	251
8.	<b>Continuïtat de la recerca de la tesi doctoral</b>	255
9.	<b>Corol·lari</b>	259
10.	<b>Bibliografia</b>	263
11.	<b>Annexos</b>	289
11.1.	Contribucions científiques derivades de la tesi doctoral	289
11.2.	Altres contribucions científiques	292
11.3.	Evidència de les comunicacions orals i escrites derivades de la tesi doctoral	299





# ÍNDIX DE FIGURES

- Figura 1. Síntesi d'histamina per descarboxilació del seu aminoàcid precursor.  
[Pàgina 8](#)
- Figura 2. Formació d'amines com a mecanisme de defensa enfront l'acidesa del medi i per a la generació d'energia metabòlica.  
[Pàgina 9](#)
- Figura 3. Metabolisme de la histamina en humans.  
[Pàgina 15](#)
- Figura 4. Evolució del nombre de brots d'intoxicació per histamina respecte al nombre total de toxiinfeccions a Catalunya durant el període 2005-2017.  
[Pàgina 21](#)
- Figura 5. Degradació intestinal d'histamina per l'enzim DAO en tres situacions diferents: individu sa, intoxicació per histamina i intolerància a la histamina.  
[Pàgina 24](#)
- Figura 6. Recompte de publicacions científiques que contenen les paraules clau *histamine intolerance* o *histaminosis* segons cerca realitzada a través del motor de cerca PubMed a la base de dades bibliogràfica MEDLINE.  
[Pàgina 47](#)
- Figura 7. Comparació conceptual de la intoxicació per histamina i la intolerància a la histamina.  
[Pàgina 48](#)
- Figura 8. Principals manifestacions clíniques de la intolerància a la histamina.  
[Pàgina 49](#)
- Figura 9. Aproximació proposada per al diagnòstic de la intolerància a la histamina.  
[Pàgina 56](#)
- Figura 10. Exclusió d'aliments en el marc d'una dieta baixa en histamina.  
[Pàgina 62](#)
- Figura 11. Desaminació oxidativa de la histamina per l'enzim DAO.  
[Pàgina 66](#)
- Figura 12. Exemple de composició qualitativa d'un complement alimentós d'enzim DAO.  
[Pàgina 67](#)
- Figura 13. Relació entre l'excreció d'histamina i metilhistamina en mostres d'orina de primera hora i de 24 hores de 14 voluntaris sans.  
[Pàgina 121](#)

- Figura 14. Distribució dels continguts d'histamina i metilhistamina en orina de primera hora del matí d'individus sans i persones intolerants a la histamina.  
[Pàgina 122](#)
- Figura 15. Distribució dels continguts d'histamina i metilhistamina en orina de primera hora del matí de persones intolerants a la histamina amb i sense dèficit de DAO.  
[Pàgina 123](#)
- Figura 16. Activitat DAO *in vitro* de 20 lots d'extracte proteic de ronyó porcí elaborats en diversos dies i a partir de ronyons de porc de partides diferents.  
[Pàgina 166](#)
- Figura 17. Percentatge de pèrdua en l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí provocat per l'aplicació de diferents combinacions de temps-temperatura durant l'etapa d'extracció.  
[Pàgina 167](#)
- Figura 18. Influència dels diferents tractaments biocides sobre l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí.  
[Pàgina 168](#)
- Figura 19. Distribució de l'activitat DAO *in vitro* de diferents lots d'extracte de ronyó porcí obtinguts abans i després d'aplicar un procés de deshidratació controlada.  
[Pàgina 169](#)
- Figura 20. Evolució de l'activitat DAO *in vitro* de l'extracte proteic de ronyó porcí al llarg de 24 mesos d'emmagatzematge en diferents condicions.  
[Pàgina 170](#)
- Figura 21. Activitat DAO *in vitro* de diferents complements alimentosos d'enzim DAO disponibles al mercat en comparació al nou complement obtingut.  
[Pàgina 171](#)

## ÍNDEX DE TAULES

- Taula 1. Contingut d'histamina en aliments.  
[Pàgina 11](#)
- Taula 2. Principis actius amb efecte inhibidor de l'enzim DAO.  
[Pàgina 53](#)
- Taula 3. Estudis clínics sobre l'eficàcia d'una dieta baixa en histamina en el tractament de símptomes de la intolerància a la histamina.  
[Pàgina 65](#)

# ABREVIATURES

AECOSAN	Agència Espanyola de Consum, Seguretat Alimentària i Nutrició
ALDH	Aldehid deshidrogenasa
APPCC	Anàlisi de perills i punts crítics de control
DAO	Diamio oxidasa
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària   <i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Assaig d'immunoabsorció lligat a enzims   <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENIDE	Enquesta Nacional d'Ingesta Dietètica Espanyola
ESI	Ionització per electroesprai   <i>Electrospray ionization</i>
FAO	Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació   <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FL	Detecció fluorimètrica
HDU	Unitats degradadores d'histamina   <i>Histamine degrading units</i>
HNMT	Histamina-N-metiltransferasa
IHS	Societat Internacional de Cefalees   <i>International Headache Society</i>
IQR	Amplitud interquartílica   <i>Interquartile range</i>
JCR	<i>Journal Citation Reports</i>
$K_M$	Constant de Michaelis-Menten
MAO	Monoamino oxidasa
NOAEL	Dosi sense efecte advers observable   <i>No observed adverse effect level</i>
MS/MS	Espectrofotometria de masses en tàndem
OEPM	Oficina Espanyola de Patents i Marques
OMS	Organització Mundial de la Salut
OPA	Orto-ftaldehid
SGNC	Sensibilitat al gluten no celíaca
SNP	Polimorfismes d'un sol nucleòtid   <i>Single-nucleotide polymorphism</i>
UHPLC	Cromatografia líquida d'ultra alta resolució   <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>



# 1 | RESUM



# 1. RESUM

## [CAT]

La intolerància a la histamina, també anomenada síndrome d'histaminosi enteral o sensibilitat a la histamina alimentària, és un trastorn associat a la ingesta d'histamina que s'origina per un desordre en la capacitat de l'organisme humà per metabolitzar-la. L'enzim DAO és l'encarregat de la degradació de la histamina a nivell intestinal i desenvolupa un efecte barrera fonamental en la prevenció del pas de la histamina cap a la circulació sistèmica. Un dèficit en l'activitat d'aquest enzim, que pot ser d'origen genètic, patològic o farmacològic; és la principal causa reconeguda d'aquesta intolerància. Les manifestacions clíniques inclouen un ampli ventall de símptomes gastrointestinals i extra-intestinals inespecífics, principalment distensió abdominal, diarrea, dolor abdominal, restrenyiment, cefalees, taquicàrdia, rinorrea, rinitis, pruíja i envermelliment cutani. Durant els darrers anys, la intolerància a la histamina ha esdevingut un tema d'interès creixent, encara que segueix essent necessari sumar evidència científica que ajudi a definir, diagnosticar i gestionar clínicament aquesta intolerància.

Aquesta tesi doctoral planteja com a objectiu general aprofundir en el coneixement de la intolerància a la histamina, així com en el desenvolupament de noves estratègies per al seu diagnòstic i control. En primer lloc, s'avaluà probabilísticament el risc de patir efectes adversos per a la salut derivats del consum d'aliments rics en histamina i s'estimà la prevalença de dèficit de DAO en una població amb símptomes de la intolerància a la histamina.

El diagnòstic de la intolerància a la histamina s'efectua, normalment, a través d'una combinació de criteris, fonamentalment la presència de dos o més símptomes i la seva millora o remissió en excloure la histamina de la dieta. Sovint també es fa servir la determinació de l'activitat de l'enzim DAO a nivell plasmàtic, encara que és una eina diagnòstica controvertida que requereix de més estudis sobre la seva validesa clínica. De fet, la poca especificitat de la simptomatologia, juntament amb la manca d'eines diagnòstiques validades i/o de biomarcadors no invasius, suposen, encara avui, un hàndicap per a la correcta identificació de la població susceptible. En



aquest àmbit, s'estudià la validesa de l'excreció d'histamina i el seu metabòlit metilat en orina com a biomarcadors no invasius d'aquest trastorn.

La dieta baixa en histamina és la principal estratègia per al tractament preventiu d'aquest trastorn. La suplementació amb enzim DAO exogen s'ha postulat com a tractament complementari per potenciar la capacitat intestinal de degradar la histamina procedent dels aliments. Des de l'any 2017, la Comissió Europea va donar llum verda a l'ús d'enzim DAO d'extracte de ronyó porcí en incloure'l a la llista oficial de nous aliments en forma de complement alimentós i d'aliment per a usos mèdics especials. Aquesta tesi també es centrà en contribuir al desenvolupament d'un nou complement de DAO a base d'extracte de ronyó porcí i en estudiar el potencial dels brots de llegums com a font d'enzim DAO d'origen vegetal.

# 1. ABSTRACT

[ENG]

Histamine intolerance, also referred to as enteral histaminosis or sensitivity to dietary histamine, is a disorder associated with an impaired ability to metabolize ingested histamine. The DAO enzyme is responsible for the degradation of intestinal histamine and functions as the main barrier against the entrance of histamine into the systemic circulation. A deficit in DAO activity, which may be of genetic, pathological or pharmacological origin, is recognized as the principle cause of histamine intolerance. A wide range of nonspecific gastrointestinal and extra-intestinal symptoms are experienced, mainly abdominal distension, diarrhea, abdominal pain, constipation, headache, tachycardia, rhinorrhea, rhinitis, pruritus, and skin redness. Although interest in histamine intolerance has grown in recent years, more scientific evidence is required to help define, diagnose and clinically manage this condition.

The aim of this doctoral thesis is to gain a deeper understanding of histamine intolerance, as well as to develop new strategies for its diagnosis and control. In the first part of the work, the risk of adverse health effects from the consumption of histamine-rich foods was probabilistically assessed and the prevalence of DAO deficiency was estimated in a population with symptoms of histamine intolerance.

The diagnosis of histamine intolerance is generally based on a combination of criteria: usually the appearance of two or more symptoms and their improvement or remission after histamine is excluded from the diet. Plasma DAO activity is also often determined, although its validity as a clinical diagnostic tool remains controversial and needs to be verified. The low specificity of the symptoms, together with the lack of validated diagnostic tools and/or non-invasive biomarkers are a handicap for the correct identification of susceptible individuals. In this context, in the next part of the thesis, the validity of urinary excretion of histamine and its methylated metabolite as non-invasive biomarkers of histamine intolerance was studied.

The main strategy for the preventive treatment of histamine intolerance is a low histamine diet. Supplementation with exogenous DAO has been postulated as a complementary treatment to enhance the intestinal capacity to degrade dietary histamine. In 2017, the European Commission gave the green light to the use of DAO from porcine kidney extract, including it in the official list of novel foods both as food supplement and food for special medical purposes. Another aim of this thesis was to contribute to the development of a new DAO supplement based on porcine kidney extract and to study the potential of legume sprouts as a source of plant-derived DAO.

## 2 INTRODUCCIÓ



## 2. INTRODUCCIÓ

L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va emetre l'any 2011 un informe científic que alertava que els nivells d'amines biògenes trobats en certs aliments comercialitzats als països membres de la Unió Europea segueixen essent un perill per a la salut dels consumidors [1]. Concretament, la histamina, juntament amb la tiramina, és el compost que presenta un potencial més tòxic i és, per tant, de gran interès en termes de seguretat alimentària. Els riscos relacionats amb el consum excessiu d'histamina van ser descrits ara fa més de 60 anys, primerament sota el nom d'enverinament per escòmbrids o escombrotòxicosi, per la seva relació amb el consum de peixos d'aquesta família, i actualment coneguda com a intoxicació per histamina. Malgrat l'àmplia evidència científica acumulada sobre aquesta intoxicació alimentària al llarg de les darreres dècades i el desenvolupament de mesures que permeten evitar o reduir l'acumulació d'aquest compost, el passat any 2017 la histamina es va situar en segon lloc com a agent causal de brots de malalties de transmissió alimentària a Catalunya, assolint el nombre més elevat d'alertes de la seva sèrie històrica [2]. Tanmateix, durant els darrers anys s'ha descrit un altre trastorn associat a la ingesta d'histamina que s'origina per un desordre en la capacitat de l'organisme humà per metabolitzar-la. Aquest dèficit enzimàtic determina un subgrup de població sensible a nivells d'histamina normals, o inclús baixos, i pot ajudar a explicar algunes incerteses històricament associades a la intoxicació per histamina.

Al llarg de la introducció d'aquesta tesi doctoral es revisarà la rellevància del contingut d'histamina en els aliments, així com els efectes fisiològics i el metabolisme d'aquest compost en l'organisme humà. A partir d'aquí, es tractarà amb especial atenció els efectes adversos derivats de la ingesta d'histamina en la població, fent un recorregut conceptual que porti al lector des de la reconeguda intoxicació per histamina fins a la intolerància a la histamina. Concretament, es revisarà l'*state of the art* d'aquesta intolerància alimentària, que és el principal objecte d'estudi d'aquesta teisi doctoral.

## 2.1. Histamina

Les amines biològicament actives o amines biògenes són un conjunt de compostos nitrogenats no volàtils de baix pes molecular [3,4]. La seva formació té lloc a partir de l'acció enzimàtica de descarboxilases (EC 4.1.1.1) que actuen de forma selectiva retirant el grup carboxil d'aminoàcids específics per donar lloc a l'amina corresponent i diòxid de carboni [5]. Concretament, la histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) és una amina biògena que es sintetitza per descarboxilació enzimàtica del seu aminoàcid precursor, la histidina, mitjançant una reacció que va ser descrita per Windaus i Vogt l'any 1907 i en la que hi intervé l'enzim L-histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22) (Figura 1) [6,7]. Per la seva estructura química i atenent el número de grups funcionals, la histamina es pot definir com una diamina heterocíclica formada per un anell imidazole i etilamina (i.e. compost orgànic que li aporta un grup funcional en forma d'amina primària) [1,4,8]. La histamina es troba de forma natural tant en animals com en plantes, i en l'organisme humà desenvolupa efectes fisiològics vasoactius i psicoactius [1,4]. A més, la histamina és present en un ampli ventall d'aliments que constitueixen la principal font exògena d'aquest compost [1,9].

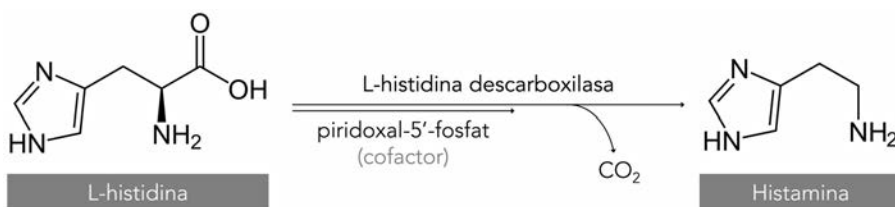


Figura 1. Síntesi d'histamina per descarboxilació del seu aminoàcid precursor.

### 2.1.1. Histamina en els aliments

La histamina es pot trobar en un ampli ventall d'aliments i en concentracions molt variables [10]. La principal via per a la formació d'histamina en els aliments és la descarboxilació d'histidina a través de l'acció de l'enzim L-histidina descarboxilasa d'origen bacterià [9,10]. A part d'histamina, els aliments també poden contenir altres amines biògenes, principalment tiramina (4-hidroxi-fenetilamina), putrescina

(1,4-diaminobutà) i cadaverina (1,5-diaminopentà), que es formen a través de la desaminació enzimàtica dels aminoàcids tirosina, ornitina (i/o agmatina) i lisina, respectivament [5,9,10]. En qualsevol cas, l'acumulació d'aquests compostos en els aliments és fruit de la transformació dels aminoàcids per part de microorganismes i requereix la concurrència de diversos factors com la disponibilitat dels aminoàcids precursors i condicions ambientals favorables per al creixement i/o l'activitat descarboxilasa d'aquests microorganismes [5,9].

Aquestes reaccions de descarboxilació han sigut descrites com a una estratègia per a la supervivència dels microorganismes en entorns àcids, així com a font alternativa d'energia metabòlica en situacions subòptimes pel que fa a la disponibilitat de substrats (Figura 2) [5,11,12]. Això s'explica per la participació d'una proteïna transportadora de membrana (antiportador) que facilita la incorporació dels aminoàcids a la cèl·lula i la sortida de les amines generades, resultant en una força motriu protònica que ajuda a regular el pH intra- i extra-cel·lular [11]. Per altra banda, aquest gradient de pH generat a través de la membrana és responsable de la producció d'energia metabòlica, una funció essencial per a bacteris sense una alta capacitat de generar ATP [1, 5, 6, 8].

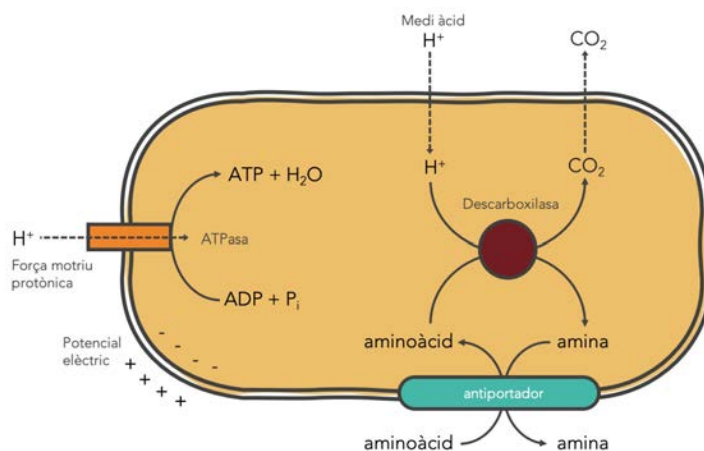


Figura 2. Formació d'amines com a mecanisme de defensa enfront l'acidesa del medi i per a la generació d'energia metabòlica. Adaptat de [12].

La capacitat de descarboxilar certs aminoàcids és una propietat espècie- i soca-dependent [13]. En aquest sentit, diversos bacteris grampositius i gramnegatius



responsables de l'alteració microbiana i/o de processos fermentatius dels aliments han mostrat capacitat per produir histamina [1,14]. Concretament, les espècies d'enterobacteries *Hafnai aluei*, *Morganella morganii* i *Klebsiella pneumonia* han sigut identificades com algunes de les espècies bacterianes més prolífiques pel que fa a la formació d'histamina en peix [9,11,15–18]. Per altra banda, en formatges, derivats fermentats de carn i vegetals i en begudes fermentades, a part de certes soques d'enterobacteriàcies, diversos bacteris de l'àcid làctic també han sigut descrits com a microorganismes productors d'histamina (e.g. *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus* i *Oenococcus oeni*) [1,17].

Els aliments susceptibles de contenir nivells elevats d'histamina són: a) aquells microbiològicament alterats, com ara el peix i la carn, o productes derivats que s'hagin pogut conservar o elaborar en condicions higièniques poc adequades; i b) els aliments fermentats/curats, en els quals els bacteris responsables del procés de fermentació poden també presentar capacitat aminogènica [13,19]. Tanmateix, també hi ha certs aliments en els quals la seva presència no s'atribueix a una activitat microbiana. Seria el cas d'aliments on intervenen vísceres o sang i certs productes vegetals [10,20]. La taula 1 recull dades sobre la presència d'histamina en aliments del mercat espanyol [10]. En general, els continguts d'histamina mostren una elevada variabilitat, essent el peix en conserva (14,4 mg/kg), els embotits crus curats (32,2 mg/kg) i el formatge elaborat a partir de llet crua (59,4 mg/kg) els aliments que van destacar pel seu major contingut d'histamina [10]. Malgrat els nivells d'aquesta amina en la majoria d'aliments no van ser molt elevats (medianes inferiors a 18 mg/kg), alguns aliments van mostrar continguts extremadament alts, amb valors màxims d'entre 350 i 390 mg/kg en el cas dels embotits i el formatge i de fins a 650 mg/kg en el cas de les conserves de peix [10]. En aquesta línia, l'informe científic publicat per l'EFSA sobre el contingut d'amines en aliments procedents de diferents països de la Unió Europea va reportar valors màxims d'histamina de fins a 1850 mg/kg en alguns tipus de formatges i de gairebé 9.000 mg/kg per a productes derivats del peix [1]. Per últim, la histamina és poc freqüent en aliments d'origen vegetal, encara que certs productes com són les albergínies, els espinacs i el tomàquet, així com el vi negre van presentar nivells d'aquest compost superiors als 50 mg/kg [10,20].

Taula 1. Contingut d'histamina en aliments  
(Dades procedents de la base de dades del grup de recerca).

Aliment	n	Contingut d'histamina (mg/kg)			
		Mitjana (SD)	Mediana	Mínim	Màxim
<b>Fruita, verdura i altres aliments d'origen vegetal</b>					
Fruites	136	0,07 (0,20)	ND	ND	2,51
Fruits secs	41	0,45 (1,23)	ND	ND	11,86
Verdures	98	2,82 (7,43)	ND	ND	69,72
Llegums	11	ND	ND	ND	ND
Cereals	28	0,12 (0,33)	ND	ND	0,89
Xocolata	25	0,58 (0,44)	0,17	0,16	0,56
Condiments i espècies	12	ND	ND	ND	ND
<b>Begudes alcohòliques</b>					
Cervesa	176	1,23 (2,47)	0,70	ND	21,60
Vi blanc	83	1,24 (1,69)	0,45	0,10	13,00
Vi negre	260	3,81 (3,51)	1,90	0,09	55,00
<b>Peix i productes del mar</b>					
Peix fresc	136	0,79 (0,71)	ND	ND	36,55
Peix en conserva	96	14,42 (16,03)	5,93	ND	657,05
Semiconservats de peix	49	3,48 (3,37)	2,18	ND	34,90
<b>Carn i derivats càrnics</b>					
Carn fresca	6	ND	ND	ND	ND
Derivats càrnics cuits	48	0,30 (0,26)	ND	ND	4,80
Derivats càrnics crus curats	23	12,98 (37,64)	0,80	ND	150,00
Derivats càrnics crus curats fermentats	209	32,15 (14,22)	8,03	ND	357,70
<b>Productes làctics</b>					
Formatge fresc	20	ND	ND	ND	ND
Formatge de llet crua	20	59,37 (106,74)	18,38	ND	389,86
Formatge de llet pasteuritzada	20	18,05 (38,23)	4,59	ND	162,03

ND: no detectat

L'elevada variabilitat observada en el contingut d'histamina, tant en aliments d'una mateixa categoria com inclús entre diferents lots d'un mateix producte, es deu a la influència de múltiples factors, tant intrínsecs com extrínsecs [5,10]. En primer lloc, i com ja s'ha comentat, és imprescindible la presència de l'aminoàcid precursor [10]. En aquest sentit, aquells aliments rics en proteïnes, i concretament en histidina

lliure, són més susceptibles d'acumular histamina, com és el cas dels peixos de la família dels escòmbrids (*Scombridae*) [13,16]. Tanmateix, en productes fermentats, el fenomen proteolític que té lloc al llarg del procés fermentatiu facilita la disponibilitat d'aminoàcids precursors per a la síntesi d'amines biògenes [10]. Així mateix, la presència de piridoxal-5'-fosfat en l'aliment (i.e. forma activa de la vitamina B6) actua com a cofactor, induint l'activitat enzimàtica de la L-histidina descarboxilasa bacteriana, a excepció dels bacteris grampositius que presenten L-histidina descarboxilasa dependent de piruvil [10]. La temperatura d'emmagatzematge s'ha mostrat com un dels factors més importants en la formació d'histamina en aliments [5,16,18,21,22]. Diversos autors han descrit temperatures d'entre 25-30 °C com a òptimes per a la majoria de microorganismes histaminogènics, encara que també s'ha observat una formació important d'histamina en aliments refrigerats (4-10 °C), especialment en peix [21,23,24]. De fet, en el cas del peix, l'emmagatzematge amb gel a temperatures al voltant de 0 °C va ser l'única condició ambiental capaç de retardar la formació d'histamina [24]. La formació d'histamina i altres amines biògenes al llarg de processos de fermentació es veu disminuïda quan aquesta es realitza a temperatures inferiors als 15 °C [25]. Similarment, el pH també manté una estreta relació amb l'acumulació d'amines biògenes en els aliments, la qual es veu generalment afavorida a pH àcids, encara que s'han obtingut valors molt variables segons si es té en compte l'activitat de l'enzim pur o la capacitat de descarboxilació de l'espècie bacteriana [5,10]. Altres factors com ara la formulació (e.g. addició de sal, espècies o nitris) i els diferents processos tecnològics de conservació (e.g. pasteurització, altes pressions hidrostàtiques o irradiacions) i/o envasat (e.g. buit o atmosferes modificades) aplicats també han sigut àmpliament estudiats, doncs també mostren influència en la capacitat microbiana per formar histamina [5,9,13,19,21].

L'ampli estudi de la presència i de les condicions que faciliten l'acumulació d'histamina en aliments al llarg dels darrers anys ha posicionat aquest compost com a un bon marcador de frescor, higiene i qualitat de diversos productes alimentaris [1]. En efecte, elevades concentracions d'histamina i altres amines biògenes en aliments indiquen l'ús de matèries primeres de baixa qualitat higiènica i/o condicions inadequades durant el processament i/o emmagatzematge de l'aliment, en especial en el binomi temps-temperatura [1]. Per altra banda, i com es

tractarà de forma detallada en apartats posteriors, la ingesta d'histamina pot suposar potencials efectes adversos per a la salut, tant per a la població general com, de forma específica, per a població sensible [1,26]. Per tot això, és fonamental seguir esmerçant esforços per dissenyar i implementar mesures de control basades en contrarestar els diversos factors pro-aminogènics explicats anteriorment que permetin prevenir, o almenys reduir, l'acumulació d'histamina al llarg de la producció i comercialització dels aliments.

La qualitat higiènica de les matèries primeres i la de tots els processos al llarg de la cadena alimentària constitueix la mesura de prevenció més important. A més, per als productes fermentats, l'ús de cultius iniciadors degudament seleccionats per no posseir activitat aminogènica és un altre de les principals eines per a frenar l'acumulació d'amines en aquest tipus d'aliments. Existeixen recomanacions a nivell europeu per a potenciar l'ús de soques autòctones (i.e. soques bacterianes procedents específicament del producte fermentat en qüestió) i amb el perfil tecnològic adient però que tinguin la mínima o absent activitat de descarboxilació d'aminoàcids [1,5]. Més recentment, s'està explorant la possibilitat d'emprar microorganismes fermentadors que no només minimitzin la descarboxilació sinó que alhora mostrin potencial per degradar histamina o altres de les amines biògenes prèviament formades en l'aliment [19,27].

## 2.1.2. Histamina en l'organisme humà

### 2.1.2.1. Paper fisiològic de la histamina

Els efectes fisiològics i fisiopatològics de la histamina en l'organisme van ser primerament descrits l'any 1910 per Dale i Laidlaw, dos investigadors vinculats als *Wellcome Physiological Research Laboratories* que van ser pioners en la recerca de les funcions desenvolupades per aquest compost orgànic [28–30]. Concretament, la histamina es sintetitza i s'emmagatzema en elevades concentracions en forma de grànuls, principalment en basòfils i mastòcits, així com en cèl·lules enterocromafins gàstriques, nòduls limfàtics i el timus [1,31]. Encara que es troba àmpliament distribuïda en els diversos teixits de l'organisme humà, s'han descrit concentracions elevades d'histamina als pulmons, la pell i el tracte gastrointestinal [31,32]. Pel que

fa a les seves funcions, aquesta amina es troba involucrada en diversos mecanismes immunològics i fisiològics, estimulants la secreció d'àcid gàstric, la inflamació, la contracció de les cèl·lules musculars llises, la vasodilatació i la producció de citocines, entre d'altres [1,3,11,33,34]. A més, la histamina desenvolupa funcions com a neurotransmissor, essent sintetitzada per neurones situades a la regió posterior de l'hipotàlem que posseeixen axons que s'estenen al llarg del cervell [32]. Aquest ampli ventall d'efectes fisiològics es produeixen a través de la interacció amb quatre receptors transmembrana de set dominis acoblats a proteïnes G (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub>) que activen les vies de transducció de senyals al percebre el seu lligand, la histamina [31,32]. Degut a la multitud de processos fisiològics i fisiopatològics en que la histamina, i consegüentment els seus receptors, es troben implicats, la indústria farmacèutica ha generat un elevat nombre de fàrmacs *bestsellers* destinats a tractar alguns dels efectes produïts per la histamina [6]. Així mateix, gairebé un segle després del desenvolupament dels primers fàrmacs antagonistes dels receptors de la histamina, la recerca en aquest camp segueix molt activa, sobretot centrada en proporcionar lligands específics per als receptors més afins per a la histamina i que han sigut més recentment caracteritzats (H<sub>3</sub> i H<sub>4</sub>) [31].

#### 2.1.2.2. Metabolisme de la histamina

En els éssers humans es coneixen dues vies principals per al metabolisme de la histamina on hi intervenen els enzims diamino oxidasa (DAO) i histamina-N-metiltransferasa (HNMT) (Figura 3) [1,3,22,33–37]. La DAO (EC 1.4.3.22), també denominada histaminasa o proteïna d'unió d'amilorida, és una amino oxidasa dependent de coure codificada pel gen AOC1 localitzat al cromosoma 7 (7q34-36) [38–42]. L'enzim DAO funcional és un homodímer format per dues isoformes i catalitza la desaminació oxidativa del grup amino primari de la histamina donant lloc a peròxid d'hidrogen i amoníac com a subproductes [38,40,41,43,44]. Aquesta reacció de desaminació dóna lloc a imidazole acetaldehid, compost que per acció de l'enzim aldehid deshidrogenasa serà subsegüentment convertit a àcid imidazole acètic i finalment combinat amb ribosa per a la seva excreció urinària [22,33,45,46]. Per altra banda, la histamina pot ser convertida en N-metilhistamina per acció de l'enzim HNMT (EC 2.1.1.8), una proteïna monomèrica de petites dimensions

(33 kDa) codificada per un gen localitzat al cromosoma 2q22.1 [36]. L'HNMT catalitza la metilació del grup amino secundari de l'heterocicle aromàtic imidazole de la histamina mitjançant una reacció que requereix del co-substrat S-Adenosil metionina com a donador del grup metil. La metilhistamina generada serà posteriorment metabolitzada pels enzims monoamino oxidasa (MAO) o DAO a N-metilimidazole acetaldehid, el qual passa finalment a àcid N-metilimidazole acètic a través d'una deshidrogenasa [22,46,47].

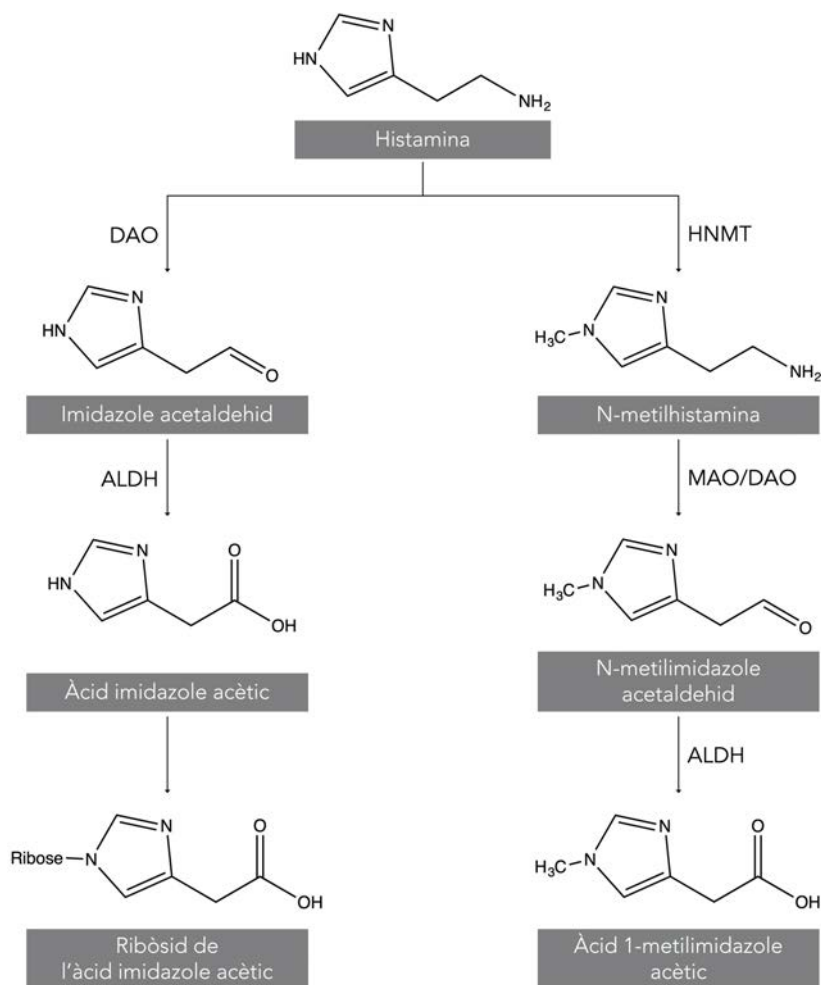


Figura 3. Metabolisme de la histamina en humans. DAO: diamino oxidasa; HNMT: histamina-N-metiltransferasa; ALDH: aldehyd deshidrogenasa; MAO: monoamino oxidasa.

Així doncs, la histamina present a l'organisme és desaminada o metilada per acció dels enzims DAO i HNMT, respectivament, en funció de la seva localització [1,33,48]. La DAO és una proteïna secretora que s'emmagatzema en estructures vesiculars de la membrana plasmàtica i és responsable de la degradació d'histamina a nivell extracel·lular [1,40]. En mamífers, l'expressió de la DAO es troba restringida a certs teixits, principalment intestí prim, colon ascendent, placenta i ronyons [22,38,49–51]. En l'intestí, l'activitat DAO augmenta progressivament des del duodè fins a ili, i es localitza principalment a les vellositats intestinals [52]. A nivell plasmàtic, els nivells de DAO semblen estar estretament vinculats a la presència d'heparina i s'atribueix a les propietats antiinflamatòries i immunoreguladores d'aquest glicosaminoglicà la capacitat d'alliberar l'enzim DAO que es troba unit als teixits cap a la circulació [53]. En canvi, l'enzim HNMT s'expressa en un ampli ventall de teixits humans, entre els quals destaca la seva presència en els ronyons i el fetge, seguits per la melsa, el colon, la pròstata, els ovaris, les cèl·lules de la medul·la espinal i la tràquea i els seus conductes respiratoris [22,33]. L'HNMT és una proteïna citosòlica i és responsable de la inactivació de la histamina a l'espai intracel·lular de les cèl·lules, la qual pot ser sintetitzada a la mateixa cèl·lula o incorporada des de l'espai extracel·lular a través de la unió a un dels seus receptors o mitjançant transportadors de membrana [31,36]. Pel que fa a la selectivitat d'ambdós enzims envers el seu substrat, l'HNMT és altament selectiu per a la histamina, mentre que la DAO pot metabolitzar també altres amines biògenes com ara la putrescina i la cadaverina, encara que mostra preferència per la histamina com a substrat [38,41,44,54,55]. L'afinitat de la DAO i l'HNMT per a la histamina és molt similar, encara que aquest segon enzim mostra una constant enzimàtica de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) lleugerament menor ( $K_M$ : 6-13  $\mu\text{mol/L}$ ) que la DAO ( $K_M$ : 20  $\mu\text{mol/L}$ ) [33].

L'epiteli intestinal és la porta d'entrada de la histamina procedent dels aliments a l'organisme. Per això, malgrat ambdós enzims són presents a l'epiteli intestinal, l'elevada expressió de DAO en el tracte gastrointestinal fa que aquest enzim jugui un paper fonamental en la protecció de l'organisme enfront la histamina exògena, és a dir, tant la histamina procedent dels aliments com aquella generada per la microbiota intestinal [50,55–57]. En aquest sentit, alguns estudis han demostrat aquest efecte protector de la DAO a través de models d'experimentació animal

mitjançant la inhibició irreversible i selectiva de l'enzim amb aminoguanidida i la posterior administració oral d'histamina [50,58,59]. El desenvolupament de símptomes d'anafilaxi en porcs i ovelles emprats com a model animal DAO-inhibits en comparació al grup control demostren que l'enzim DAO duu a terme un important efecte barrera enfront l'absorció de la histamina exògena cap a la circulació sistèmica [3,22,47,50,60]. L'enzim HNMT queda en segon terme en aquest procés de barrera pel que fa a la resorció d'histamina dietètica al lumen intestinal, però sembla ser la principal via metabòlica per fer front a la histamina subministrada de forma intravenosa o intradèrmica [22,37].



## 2.2. De la intoxicació per histamina a la intolerància a la histamina, un canvi de paradigma

Malgrat les importants accions fisiològiques que la histamina desenvolupa en l'organisme, la ingesta de nivells elevats d'aquets compost representa un perill per a la salut humana. El correcte funcionament dels sistemes de degradació de la histamina esdevenen una peça clau per tal de prevenir-ne l'acumulació [11,61]. En aquest sentit, la intoxicació per histamina o intoxicació histamínica és una intoxicació alimentària que apareix com a conseqüència del consum d'aliments amb contingut inusualment elevat d'histamina que supera els mecanismes de degradació d'aquest compost [1,62,63].

Històricament, aquesta intoxicació ha sigut també denominada escombrototoxicosi, enverinament per escòmbrids o intoxicació escombroida (en anglès, *scombroid fish poisoning* i també *mahi-mahi flush*) perquè la seva aparició s'havia associat repetidament amb el consum de peixos de les famílies dels escòmbrids i dels escomberesòcids (e.g. tonyina, arengada i verat) [62,63]. De fet, la histamina va ser primerament identificada l'any 1946 com a agent causant dels efectes tòxics ocorreguts pel consum de tonyina transportada en males condicions i durant molt de temps la intoxicació per histamina es va associar gairebé exclusivament amb el consum de peix en mal estat [64,65]. Amb el pas dels anys, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va recomanar l'ús específic del terme intoxicació per histamina per designar aquesta patologia, ja que s'ha vist que els aliments causants podien ser espècies marines d'altres famílies (e.g. *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coriphaenidae* i *Pomatomidae*) i inclús altres aliments, com ara el formatge [63]. En aquest sentit, un recent metaanàlisi que va considerar els diferents reports científics disponibles a la literatura pel que fa a casos d'intoxicació per histamina ocorreguts entre els anys 1959 i 2013 va determinar que l'aliment causant va ser el peix en un 98% dels casos, atribuint al formatge el reduït percentatge restant [66]. Actualment, les administracions sanitàries internacionals consideren que la intoxicació per histamina segueix essent un dels principals problemes de seguretat alimentària a nivell global, tant pels seus efectes sobre la salut humana com per l'impacte d'aquests en els intercanvis comercials [67,68].

La intoxicació per histamina es presenta en forma de brot i es caracteritza per tenir un període d'incubació curt (i.e. 20-30 minuts post-ingesta de l'aliment causant) i símptomes que, generalment, són de gravetat baixa/moderada i acostumen a remetre en poques hores [63]. Els símptomes associats amb la intoxicació per histamina es troben estretament lligats a les diverses funcions fisiològiques de la histamina en l'organisme i presenten una elevada similitud amb la simptomatologia de les reaccions al·lèrgiques [69,70]. Així doncs, les principals manifestacions clíniques d'aquesta intoxicació afecten la pell (e.g. envermelliment, erupcions cutànies, urticària, prurit, edema i inflamació local), el tracte gastrointestinal (e.g. nàusees, vòmits i diarrea) i la funció hemodinàmica (hipotensió) i neurològica (e.g. cefalees, palpitations i formigueig) de l'organisme [1,11,22,70]. La gravetat i tipus de reacció desencadenada sembla dependre del contingut d'histamina que s'assoleix a nivell plasmàtic. Així doncs, certs autors han descrit que concentracions plasmàtiques d'histamina majors al nivell basal de 1-2 ng/mL produeixen l'increment de les secrecions gàstriques i el ritme cardíac; 3-5 ng/mL causen cefalees, envermelliment cutani, urticària, prurit i taquicàrdia; 6-8 ng/mL una disminució de la pressió arterial; 7-12 ng/mL broncospasme; i nivells per sobre de 100 ng/mL poden ser responsables d'una aturada cardíaca [33]. De forma general, els símptomes remeten per si sols, encara que en certes ocasions es requereix l'ús de fàrmacs antihistamínics i/o broncodilatadors i, en determinades situacions, s'ha efectuat la hospitalització dels pacients i, fins i tot, el tractament d'urgència enfront el xoc anafilàctic [11,15,22].

La similitud de la simptomatologia descrita amb la d'un quadre al·lèrgic, ja que comparteixen la histamina com a mediador principal *in vivo*, fa que la intoxicació per histamina sigui possiblement infra-diagnosticada [15,63,68]. El diagnòstic de la intoxicació per histamina es basa fonamentalment en la determinació de nivells elevats d'histamina plasmàtica en el pacient i/o per la identificació de l'aliment responsable amb un contingut inusualment elevat d'aquest compost [22]. De forma general, un brot d'intoxicació per histamina tendeix a involucrar més d'un individu en un interval curt de temps i és possible identificar l'aliment causant comú [17]. Aquestes peculiaritats, junt amb l'absència d'increment en els nivells plasmàtics de triptasa, permeten efectuar un diagnòstic diferencial de la intoxicació enfront una reacció al·lèrgica, que acostuma a afectar un molt reduït percentatge de la població

que consumeix un mateix tipus de producte [15,22,71]. En aquest sentit, és important parlar especialment de les circumstàncies immediates que relata el pacient en relació a la seva alimentació, ja que el tipus de producte, el consum cru o cuinat, l'interval de temps d'aparició de la simptomatologia i l'absència d'història clínica al·lèrgica en relació a l'aliment implicat aporten informació rellevant [70].

Pel que fa a la incidència, la informació disponible a la Unió Europea mostra un augment dels brots d'intoxicació per histamina al llarg dels darrers deu anys, a diferència d'altres intoxicacions alimentaries, i amb un predomini gairebé hegemònic del peix com a principal agent causant de més del 90% de les intoxicacions [61,72]. Les dades disponibles més recents de l'EFSA i l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) mostren que l'any 2017 es va produir un increment del 22% dels brots respecte l'any anterior [72]. Concretament, l'any 2017 es van registrar un total de 117 brots d'intoxicació per histamina que van implicar 572 persones, de les quals el 9% van requerir hospitalització. Afortunadament, no s'ha atribuït cap mort a intoxicació per histamina al llarg de la darrera dècada [61]. Centrant-nos a la nostra zona geogràfica, dades recents de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA) posen de manifest que els brots de malalties de transmissió alimentària han seguit una tendència descendent en el període 2005-2010 i una estabilització en el període 2010-2017 [2]. Malgrat això, i tal com mostra la figura 4, el nombre d'alertes relacionades amb histamina al llarg de l'any 2017 ha assolit un màxim històric, amb un total de 14 brots registrats associats al consum de tonyina (e.g. tonyina en llauna i entrepanys de tonyina). Aquest fet ha situat la histamina en la segona posició del *ranking* com a agent causal de toxiinfeccions alimentàries a Catalunya, únicament superat per Norovirus, que va causar 20 brots [2]. La mateixa tendència s'observa si es té en compte la informació que ofereix el sistema d'alerta ràpida per a aliments i pinsos de la Unió Europea (RASFF), amb un augment progressiu del nombre de casos d'intoxicació per histamina vinculada al consum de tonyina durant els anys 2014-2017 i amb especial increment l'any 2017 [69].

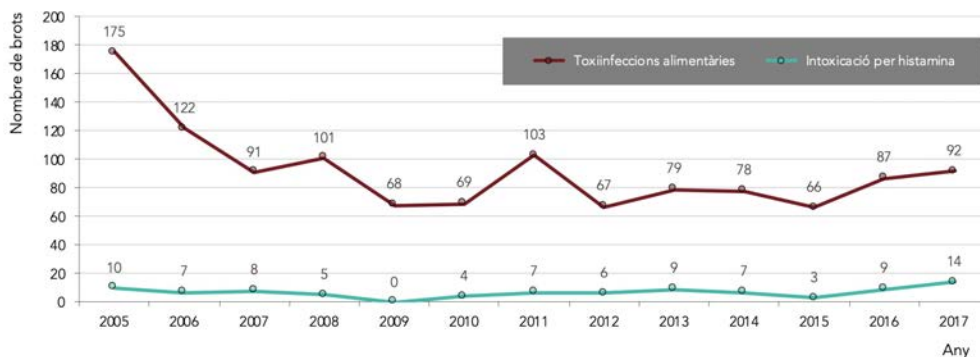


Figura 4. Evolució del nombre de brots d'intoxicació per histamina respecte al nombre total de toxiinfeccions a Catalunya durant el període 2005-2017. Adaptat de la Memòria anual sobre la situació de la seguretat alimentària a Catalunya, 2017 [2].

En quant a la relació dosi-resposta, avui en dia encara no hi ha consens pel que fa a la concentració d'histamina en aliments responsable d'oferir un brot d'intoxicació per histamina en la població general [69]. Aquest fet pot ser degut a que la informació sobre la relació dosi-resposta de la histamina és escassa [1,73]. Per exemple, diversos estudis amb voluntaris sans han demostrat l'absència de símptomes al ingerir nivells d'histamina d'entre 25-50 mg vehiculada mitjançant tonyina, pasta d'arengada o suc d'aranja o poma [74–76]. Per altra banda, nivells d'histamina superiors a 75 mg van ser suficients per provocar cefalees i símptomes gastrointestinals i dermatològics al ser subministrats a través d'aliments sòlids o begudes no alcohòliques [74,76,77]. No obstant això, s'ha descrit l'aparició de símptomes clínics després de l'administració de nivells molt més baixos d'histamina quan es troba vehiculada amb begudes alcohòliques, com ara vi o vi escumós [1,78]. D'altra banda, la instil·lació de 120 mg d'histamina directament al duodè (no vehiculada per aliments) va provocar símptomes, com ara cefalees, taquicàrdia, hipotensió, nàusees i diarrea, en persones diagnosticades amb urticària crònica però no en voluntaris sans [1]. Un altre factor que pot explicar la dificultat a l'hora d'establir la dosi d'histamina responsable de la intoxicació és l'enorme variabilitat en la quantitat d'aquest compost en aliments responsables dels brots notificats a la Unió Europea. Així ho va posar de manifest el treball realitzat per Colombo i col. l'any 2018, identificant concentracions d'histamina que oscil·laven entre els 200 i els 8.000 mg/kg en els aliments causants dels brots d'intoxicació per histamina ocorreguts entre els anys 1959 i 2013 al nostre continent [66].

Amb la informació disponible, el comitè d'experts en riscos biològics de l'EFSA va concloure que l'exposició a nivells d'entre 25 - 50 mg/persona/àpat es poden considerar segurs en persones sanes [1]. Poc després, el *Codex Alimentarius* va promoure una trobada d'experts entre l'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO, sigles de *Food and Agriculture Organization*) i l'OMS per tal de revisar tota l'evidència científica disponible fins al moment sobre el risc que suposa la presència d'histamina i altres amines en productes de la pesca i fixar límits d'aquest compost en base aquesta literatura [37]. En el seu informe, el grup d'experts mixt de FAO i la OMS va establir per a aquesta amina una dosi màxima sense efectes adversos observats (NOAEL) de 50 mg, coincidint amb el valor proposat per l'EFSA [37].

Des d'una perspectiva legal, molts països han establert límits pel que fa al contingut d'histamina, encara que únicament per a peix i productes derivats. A nivell de la Unió Europea, i atenent la normativa que regula els criteris microbiològics dels aliments als Estats membres (i.e. Regulació 2073/2005), el contingut d'histamina permès en espècies associades a un elevat contingut d'histidina no pot superar els 100 mg/kg de mitjana en un pla de mostratge de nou mostres [79]. Addicionalment, cap d'aquestes mostres pot superar els 200 mg/kg d'histamina i, com a màxim, dos d'elles poden presentar valors entre 100 i 200 mg/kg [79]. Aquests límits normatius es doblen per aquells productes elaborats a partir de peix amb un alt contingut natural d'histidina sotmesos a un procés de maduració enzimàtica en salmorra. A Canadà, Suïza i Brasil el límit màxim permès per a peix i productes de la pesca és de 100 mg/kg, mentre que a Austràlia i Nova Zelanda és de 200 mg/kg [67,79]. Per altra banda, l'Administració d'Aliments i Medicaments (FDA) dels Estats Units estableix un límit màxim d'histamina més estricta (50 mg/kg) [80]. Si bé existeixen aquests límits a nivell legislatiu, també és cert que l'actual implantació de sistemes integrals de qualitat a la indústria alimentària, com ara l'anàlisi de perills i punts crítics de control (APPCC) i les bones pràctiques de fabricació i higiene, permeten rebaixar considerablement els nivells d'histamina en productes derivats del peix [37].

En definitiva, malgrat durant les darreres dècades s'han realitzat nombrosos estudis enfocats a conèixer detalladament els brots d'intoxicació per histamina ocorreguts, encara queden certs interrogants o incerteses que són objecte de recerca

actualment. És el cas, per exemple, de la variabilitat en les concentracions d'histamina en els aliments que originen aquests brots, així com la heterogeneïtat pel que fa a grau i tipus d'efectes adversos desenvolupats [66]. A més, el fet que l'administració oral d'histamina en dosis equivalents a les que normalment es troben als aliments causants d'un brot d'intoxicació no doni lloc al mateix ventall i/o gravetat de símptomes deixa pas a múltiples hipòtesis per tal d'explicar aquesta paradoxa [37].

Així doncs, diversos autors han proposat l'efecte potenciador de certs components dels aliments, com ara altres amines biògenes i l'alcohol, sobre la toxicitat de la histamina [1,15,18,22,54,68]. Determinades amines com ara la putrescina i la cadaverina es troben usualment en aliments juntament amb la histamina i, a més, són també substrats de l'enzim DAO. Per tant, s'ha suggerit que aquestes amines podrien intervenir mitjançant un mecanisme de competència pels enzims de degradació a nivell intestinal, provocant una alteració de la barrera protectora envers la histamina dietètica [15,69]. Així mateix, l'alcohol i el seu metabòlit acetaldehid poden actuar com a potenciadors, ja que competeixen amb la histamina per l'enzim ALDH que intervé en el metabolisme de la histamina i de l'alcohol simultàniament [1,13]. La potenciació per part d'aquests components podria ajudar a explicar la diferent absorció d'histamina quan aquesta s'administra aïllada o quan la mateixa dosi s'ingereix en matrius alimentàries [15,68]. Amb tot això, la FAO i la OMS han reconegut que l'evidència disponible posa de manifest la implicació de certs potenciadors que poden actuar de forma concertada amb la histamina i alterar-ne la dosi tòxica, i recomanen el desenvolupament de futurs estudis enfocats a esbrinar les incerteses que envolten el paper de la histamina en la patogènia de la intoxicació per histamina [37].

Per últim, diversos autors han posat de manifest una gran variabilitat pel que fa a la susceptibilitat de cada individu enfront els efectes de la histamina [1,4,22,33,37,68]. En estudis d'intervenció a través de l'administració oral d'histamina s'ha pogut evidenciar aquesta variabilitat interindividual, ja que a iguals dosis d'aquest compost no tots els voluntaris manifestaven simptomatologia i, els que ho feien, patien símptomes diversos, de gravetat també variable i inclús presentaven nivells d'histamina en sang diferents [68,74,76,81,82]. Aquestes evidències assenyalen l'existència de subgrups de població amb diferent sensibilitat envers la histamina i

amb respostes clínicament diferents a aquest compost [1]. Un dèficit en els sistemes de degradació de la histamina pot explicar aquesta diferent resposta interindividual enfront la histamina exògena. Sembla coherent pensar que certes incerteses històricament associades als brots d'intoxicació per histamina poden explicar-se atenent a l'existència de diferències en la susceptibilitat de la població a aquesta amina. Així, i sempre respectant l'entitat clínica indiscutible de la intoxicació per histamina, el canvi de paradigma rau precisament en traslladar el focus des de l'aliment cap a l'organisme humà, mantenint la histamina com a agent causant, però centrant l'atenció en com cada persona és capaç de respondre a la ingesta de nivells variables d'histamina procedent dels aliments. La intolerància a la histamina és l'entitat clínica que descriu la incapacitat de certs individus per degradar la histamina procedent dels aliments i dóna lloc a l'aparició de simptomatologia provocada per l'acumulació d'aquesta amina en sang (Figura 5). En el proper apartat s'efectuarà una revisió sobre l'evidència científica de la qual es disposa actualment sobre aquest desordre.

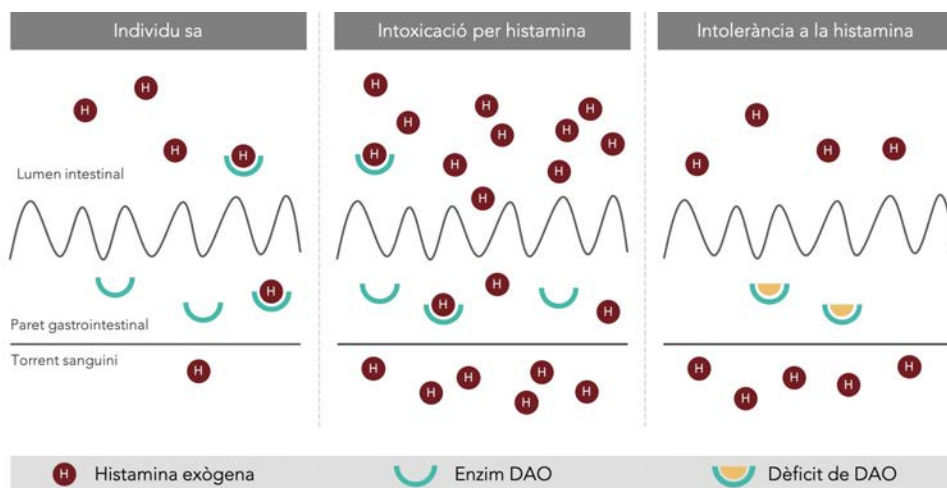


Figura 5. Degradació intestinal d'histamina per l'enzim DAO en tres situacions diferents: individu sa, intoxicació per histamina i intolerància a la histamina. Adaptat de [22].

### 2.2.1. Efectes adversos de la histamina dels aliments: Una aproximació a través de l'anàlisi del risc

Com s'ha descrit anteriorment, la ingesta d'histamina a través dels aliments suposa un potencial risc per a la salut de la població, ja sigui en forma d'intoxicació o d'intolerància en el cas de població sensible. Així doncs, i en termes específics de seguretat alimentària, la histamina pot ser considerada un perill el qual pot ser sotmès al procés metodològic d'anàlisi del risc que proporciona eines per tal d'analitzar de forma sistemàtica, completa, transparent i no esbiaixada els potencials riscos alimentaris als quals s'exposa la població. Aquest procés estructurat d'anàlisi del risc és l'eina recomanada per la legislació alimentària europea i internacional per tal de fonamentar les decisions i actuacions de les administracions competents en matèria alimentària [83,84]. El procés global d'anàlisi del risc considera tres components: l'avaluació, la gestió i la comunicació del risc.

En el cas de la histamina, i malgrat certa informació ja ha sigut aportada en apartats anteriors d'aquesta introducció, en el marc d'aquesta tesi doctoral s'ha efectuat una revisió dels efectes adversos d'aquest compost mitjançant una aproximació de l'anàlisi del risc. Concretament, s'ha prestat especial atenció a l'avaluació del risc (i.e. identificació del perill, caracterització del perill, determinació de l'exposició i caracterització del risc), així com a la seva corresponent gestió per part de l'administració i la indústria alimentària.

Aquesta visió es troba descrita en el capítol de llibre d'accés obert i *peer-reviewed* que s'adjunta a continuació.

#### PUBLICACIÓ 1

Histamine and other biogenic amines in foods. From scrombroid poisoning to histamine intolerance

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

*IntechOpen*, 2019, Biogenic Amines, Editor: Charalampos Proestos.

ISBN: 978-1-78984-134-3  
DOI: 10.5772/intechopen.84333





**Chapter**

# Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance

*Oriol Comas-Basté, Maria Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, Maria Teresa Veciana-Nogués and Maria del Carmen Vidal-Carou*

**Abstract**

Histamine is a biogenic amine involved in important physiological activities in the organism, but its ingestion through food is associated with the onset of health disorders. Histamine intoxication, previously known as scombroid fish poisoning, is caused by the intake of foods with high levels of histamine. According to official European Union reports, more than 90% of the outbreaks registered in the last years were caused by the consumption of fish and seafood products. Histamine intolerance, on the other hand, arises when histamine degradation is impaired, mainly by a lower diamine oxidase (DAO) activity. Some of the uncertainties classically associated with histamine intoxication may be explained by this enzymatic deficit in a sensitive population. This chapter reviews the adverse effects of histamine from food within a risk analysis framework, focusing specifically on the components of risk assessment and management.

**Keywords:** histamine, biogenic amines, diamine oxidase (DAO), histamine intoxication, histamine intolerance, decarboxylase activity, risk assessment, risk management

**1. Introduction**

High amounts of biogenic amines in food are considered undesirable micro-components from the safety perspective, due to their potentially negative effects on consumer health. According to the risk assessment of biogenic amines carried out by the European Food Safety Authority (EFSA) [1], the amine content currently found in foods could be responsible of the triggering of health disorders. Histamine is the biogenic amine most commonly associated with the onset of health complaints. In fact, the triggering of symptoms derived by an excessive consumption of this amine was described for the first time over 60 years ago. It was firstly called scombroid fish poisoning, because the symptoms appeared mainly after the consumption of fish from the *Scombridae* and *Scomberesocidae* families, which have naturally high histidine contents. However, the World Health Organisation (WHO)

*Biogenic Amines*

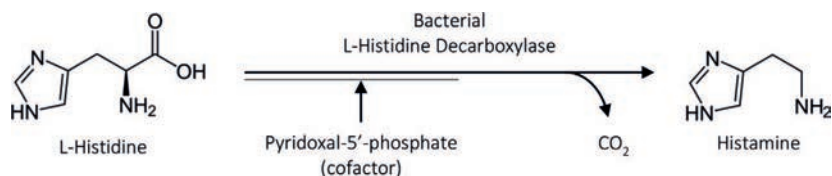
recommended using the term histamine poisoning or histamine intoxication, since other foods can also be involved [2]. Histamine intoxication occurs in the form of an outbreak, affecting those who have consumed a particular histamine-rich food. A few years ago, another histamine-related disorder began to be described, known as histamine intolerance, which arises from the failure of the diamine oxidase (DAO) enzyme to metabolise histamine in the intestines. This enzymatic deficit in a sensitive population may explain some of the uncertainties classically associated with histamine intoxication. In this chapter we review the available information on dietary histamine and its adverse effects, using a risk analysis approach, focusing specifically on the components of risk assessment and management.

## 2. Risk assessment

### 2.1 Hazard identification

Histamine (2-[4-imidazolyl] ethylamine) is the causative agent of both histamine intoxication and histamine intolerance. Based on its chemical structure and number of amine groups, histamine is classified as a heterocyclic diamine. Important physiological activities of histamine in the human organism include synaptic transmission, blood pressure control, allergic response and cellular growth control [1]. Histamine is also found in foods, mainly fish, fish products and fermented foodstuffs [1, 3]. The major pathway for the formation of histamine in foods is the decarboxylation of its precursor amino acid, histidine, by the action of the bacterial enzyme L-histidine decarboxylase (**Figure 1**). This enzyme requires pyridoxal-5'-phosphate (vitamin B6) as a cofactor, an exception being the pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase of Gram-positive bacteria [3–5]. Other biogenic amines commonly found in foods are tyramine, putrescine and cadaverine and to a lesser extent  $\beta$ -phenylethylamine and tryptamine [3, 4, 6]. These amines are all synthesised by the microbial decarboxylation of their corresponding precursor amino acids [7]. Therefore, the accumulation of histamine and other biogenic amines in foods requires the concurrence of several factors: microorganisms with decarboxylase enzymes, the availability of precursor amino acids and favourable environmental conditions for the growth or activity of aminogenic microorganisms [6, 8].

Although the ability to decarboxylate certain amino acids is a strain-dependent property, several genera of both Gram-positive and Gram-negative bacteria associated with food spoilage and/or with technological applications can produce histamine (**Table 1**) [1, 5, 9]. *Enterobacteriaceae*, including mesophilic and psychrotolerant species of *Morganella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus* and *Photobacterium*, are the most prolific histamine-producing bacteria in fish [4, 7, 9, 10]. In the case of fermented foods, aside from certain strains of enterobacteria, many lactic acid bacteria are also reported as histamine-producing microorganisms [1, 9].



**Figure 1.**  
Histamine formation by histidine decarboxylation.

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

Food	Microorganisms
Fish	<i>Morganella morganii</i> , <i>Morganella psychrotolerans</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citobacter freundii</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Aeromonas spp.</i> , <i>Pleisomonas shigelloides</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Photobacterium psychrotolerans</i>
Fermented food (cheese, dry-fermented meat sausage, wine)	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Pediococcus dammosus</i> , <i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lactobacillus rossiae</i> , <i>Lactobacillus saerimneri 30a</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiella oxycata</i> , <i>M. morganii</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>Tetragenococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i>

**Table 1.**  
*Histamine-producing microorganisms [1, 10].*

The function of decarboxylase enzymes in bacterial metabolism is not fully understood, although it has been described as one of the primary emergency systems involved in the acid stress response [6]. Decarboxylases work in cooperation with a membrane antiporter protein, thus enabling amino acids to be transported into the cell and biogenic amines to be excreted out of the cell. Since decarboxylation consumes a proton, biogenic amine formation contributes to the regulation of intracellular pH and may also help to increase the pH of extracellular media with a low buffer capacity [5, 8]. Apart from the alkalisation effect, amino acid decarboxylation can also induce metabolic energy generation through a proton motive force, a fundamental function for bacteria without a high capacity to generate ATP [1, 5, 6, 8].

In general, food products susceptible to containing high levels of histamine are those that are microbiologically spoiled (fresh fish, meat, etc.) or fermented/cured, in which the active bacteria can present an aminogenic capacity [11, 12]. Moreover, foods rich in free histidine may be more susceptible to histamine accumulation, as is the case of scombroid fish species [7, 12]. Endogenous histamine is also found in foods that contain blood or viscera, as well as in some plant products [3, 13].

Storage temperature is one of the most important factors of histamine formation in food [7, 10, 14, 15]. High temperatures (around 25–30°C) have been described by many authors as optimal for most histaminogenic microorganisms, but significant histamine formation has also been reported in refrigerated foods (4–10°C), especially fish [14, 16, 17]. Only ice storage at near 0°C was found to retard histamine formation [17]. In fermentation processes, histamine and other biogenic amines formation is reduced at temperatures lower than 15°C [18]. Other factors, such as pH, formulation (e.g. salting, species, nitrites), starter cultures, technological conservation processes (pasteurisation, high hydrostatic pressures, irradiations) and packaging (vacuum, modified atmospheres), have been extensively studied as potential conditioners of microbial capacity to form histamine [6, 11, 12, 14].

## 2.2 Hazard characterisation

### 2.2.1 Physiological role and metabolism of histamine in the organism

Histamine is involved in vital physiological activities in the human body, including neurotransmission, immunomodulation, haematopoiesis, wound healing, circadian rhythms, regulation of cell proliferation, contraction of smooth muscle cells, vasodilatation, increased vascular permeability and mucous secretion, alterations in blood pressure, arrhythmias and the stimulation of gastric acid secretion [15, 19].

## Biogenic Amines

Its effects occur through the binding of histamine with four receptors (H1R, H2R, H3R and H4R) located in the target cells of various tissues. Plasma histamine levels between 0.3 and 1.0 ng/mL are considered normal [19].

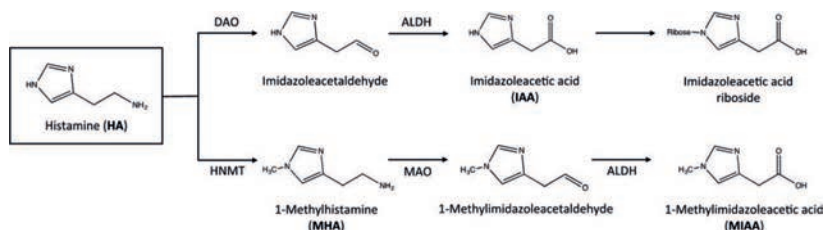
In humans, two main routes of histamine metabolism are known, involving the enzymes histamine-N-methyltransferase (HNMT) and DAO (**Figure 2**). The product of HNMT-catalysed histamine methylation is N-methylhistamine (MHA), which is subsequently transformed by the monoamine oxidase (MAO) to N-methylimidazole acetaldehyde. The latter is then converted to N-methylimidazoleacetic acid (MIAA) by aldehyde dehydrogenase (ALDH). HNMT, a cytosolic enzyme that metabolises histamine only in the intracellular space, is expressed in almost all tissues, although mainly in the liver and kidney [15, 20]. On the other hand, the oxidative deamination of histamine by DAO leads to imidazole acetaldehyde and then, via ALDH transformation, to imidazole acetic acid (IAA), which is combined with a ribose molecule for its excretion [15, 20]. DAO, which is found mainly in the intestines, placenta and kidneys, is a secretory protein responsible for scavenging extracellular histamine after mediator release [15, 20].

## 2.2.2 Adverse health effects

## 2.2.2.1 Histamine intoxication

Histamine intoxication occurs after the ingestion of foods with unusually high amounts of histamine, which overwhelm the metabolic capacity of the organism [1, 21]. Previously known as *scombrototoxicosis*, *scombroid fish poisoning*, *pseudoallergic fish poisoning*, *histamine overdose* or *mahi-mahi flush* [1, 15], it was initially associated with ingestion of fishes from the *Scombridae* and *Scorpaenidae* families (e.g. mackerel, tuna, albacore and bonito). The first histamine intoxication was reported in sailors some centuries ago, but it was not until 1946 that publications began to describe the relationship between histamine and intoxication symptoms [9, 22, 23]. In the 1980s, the WHO recommended using the term histamine poisoning or intoxication, as the condition could be caused by the consumption of other fish species, as well as other foods [2].

The symptomatology associated with histamine intoxication is closely related to the different physiological actions of histamine in the organism. The main symptoms are neurological, gastrointestinal, dermatological and respiratory, notably rash, erythema, sweating, nausea, vomiting, diarrhoea, a sensation of burning in the mouth, swelling of tongue and face, headache, respiratory distress, palpitations and hypotension [4, 15, 21]. Symptoms are generally mild, appearing 30 minutes after ingestion and disappearing within 24 hours [4, 10, 24]. On rare occasions, they can be more severe and require medical attention [3, 4]. The severity or type of



**Figure 2.**  
Metabolic pathways of histamine in the human organism.

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

reaction depends on the amount of histamine in the plasma. Thus, plasma concentrations higher than the normal level of 1–2 ng/mL result in an increase in gastric secretion and heart rate; 3–5 ng/mL causes headache, flushing, urticaria, pruritus and tachycardia, 6–8 ng/mL a decrease in blood pressure, 7–12 ng/mL broncho-spasm and over 100 ng/mL cardiac arrest [19].

The similarity between the described symptomatology and that of allergic reactions can lead to an incorrect diagnosis. Intoxication may be distinguished from a food allergy by taking into account the absence of an allergy history and its occurrence in an outbreak involving more than one patient over a short period of time after the consumption of foods with a high histamine load [9]. For a differential diagnosis, the concentration of serum tryptase measured within 1–2 hours of the onset of symptoms can also be helpful. In food allergy, the activity of serum tryptase increases, whereas in histamine intoxication it should remain within normal physiological values [15, 25]. Moreover, intoxication may be confirmed by elevated histamine levels in the suspected implicated food [1].

#### 2.2.2.2 Histamine intolerance

Histamine intolerance, also known as enteral histaminosis or sensitivity to food histamine, is a disorder in histamine homeostasis mainly due to reduced intestinal degradation by a deficit of DAO activity and the resulting enhanced plasma concentrations [19, 26, 27]. This disorder is not so widely known as histamine intoxication, since the first reference regarding histaminosis or histamine intolerance dates from 1988, and most of the studies have appeared during the last 15 years [28]. DAO enzyme deficiency may have a genetic aetiology. A significant relationship has been found between lower DAO activity and the presence of different single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the AOC1 gene located on chromosome 7 (7q36.1) that encodes this enzyme [29, 30]. The secretion of DAO may also be inhibited by certain pathologies, especially inflammatory bowel diseases, and also by the action of drugs (acetylcysteine, clavulanic acid, metoclopramide, verapamil, etc.) [15, 19]. The role of DAO inhibitor drugs may be significant, as it has been estimated they are being consumed by approximately 20% of the European population [1, 28].

Several clinical studies have linked DAO deficiency with the appearance of gastrointestinal (abdominal pain, diarrhoea and vomiting), dermatological (atopic dermatitis, eczema or chronic urticaria) and/or neurological (headaches) complaints [31–42]. Individuals with histamine intolerance due to DAO deficiency may suffer symptoms similar to those of intoxication, but they appear after a lower histamine intake. The diagnosis is based on the presentation of at least two clinical symptoms, which go into remission when a low-histamine diet is adopted (always after ruling out positive results for food allergy) [19, 42]. Individuals with histamine intolerance can also be identified by determining serum DAO activity, although evidence for the usefulness of this analysis is still scarce and inconclusive [27, 34, 36, 43, 44]. Despite the lack of well-proven data on the incidence of histamine-intolerant individuals with a DAO deficit, it has been estimated as affecting 1% of the population [19].

#### 2.2.3 Dose-response relationship assessment

Although a range of plasma histamine levels have been associated with the onset of different symptoms, as described above, there is no consensus on what quantities of histamine in food are responsible for intoxication outbreaks. Dose-response data from food histamine are scant [24]. According to some studies in healthy volunteers, histamine was found to trigger intoxication symptoms at levels of 75–300 mg

*Biogenic Amines*

when administered with food (fish or non-alcoholic drinks) [1]. When histamine was administered with alcoholic beverages, levels of 0.12–4 mg in wine did not cause significant effects on healthy volunteers, whereas another trial demonstrated the onset of clinical symptoms in 12 out of 40 patients with histamine intolerance following a provocation test with 4 mg of histamine in sparkling wine [1]. Wantke et al. [45] reported the onset of symptoms after the ingestion of 50 µg of histamine in wine (125 mL) in patients with histamine intolerance. On the other hand, when 120 mg of histamine was introduced directly into the duodenum (not transported by food), symptoms appeared in patients diagnosed with chronic urticaria but not in healthy volunteers [1].

The majority of histamine poisoning outbreaks described in the literature occurred after the consumption of high amounts of histamine, mainly in fish [1]. The histamine levels in the foods associated with these outbreaks vary considerably, in the vast majority of cases with values ranging from 100 to 5000 mg/kg [46–53], although amounts of up to 10,000 mg/kg have also been reported [53].

Due to the lack of consensus to establish a threshold toxic dose for histamine intoxication, some authors have proposed some safe levels [3, 4]. Lehane and Olley [54] suggested 30 mg of histamine as a safe dose, calculated from the maximum level of 100 mg/kg of histamine in foods and based on a fish serving of 300 g and a consumer weight of 60 kg. The same authors, however, pointed out that the accuracy of their calculation was limited by an incomplete understanding of histamine intoxication. Later, Rauscher-Gabernig et al. [24] reported that dietary histamine levels in the range of 6–25 mg/meal had no adverse effects. The EFSA expert panel on biological risks proposed 50 mg/person/meal as a safe upper limit of histamine intake for healthy individuals, based on the few studies published to date [1]. This value corresponds with the 50 mg safe threshold advocated for the healthy population by the joint FAO/WHO report on health risks of histamine and other biological amines in fish and derivatives [21].

A safe level of histamine intake for intolerant individuals is not proposed in any of the studies on this disorder. The only recommendation available is from EFSA, which carried out a risk assessment of biogenic amine formation in fermented products and concluded that only foods with histamine levels below detectable limits can be considered safe for intolerant patients [1].

#### *2.2.4 Factors contributing to histamine sensitivity*

One of the most important factors affecting sensitivity to dietary histamine is the different histamine-metabolising capacity of each individual. Thus, those with a lower activity of enzymes involved in histamine metabolism (DAO, HNMT, MAO) are more sensitive to suffer the effects after histamine ingestion [1]. An impaired enzymatic activity may have a genetic explanation or be caused by intestinal pathologies or the action of drugs with an inhibitory effect [15, 19, 20]. In this context, the most studied enzyme is DAO. The enhanced sensitivity of women to histamine in certain physiological states, such as in the premenstrual period, is attributed to a reduced DAO activity [55]. Conversely, an increase in DAO production of up to 500-fold has been reported during pregnancy, accompanied by a remission of certain symptoms related to histamine intolerance [56]. Therefore, from the metabolic point of view, there is inter- as well as intra-individual variation in sensitivity.

The toxicity of histamine may be enhanced by dietary components, such as other biogenic amines or alcohol. Putrescine, cadaverine, tyramine and spermidine are biogenic amines usually found together with histamine in food and likewise are DAO substrates. Due to competition for intestinal mucin attachment sites and metabolism, the ingestion of high quantities of these other amines may

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

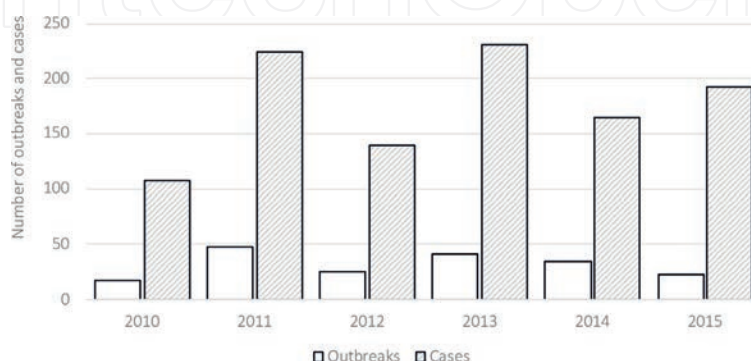
potentiate the adverse effects of histamine [1, 10, 15, 54]. This effect has been demonstrated in amines such as putrescine, cadaverine and tyramine, among others, in both in vitro and animal studies [1, 11]. These amines were found to exert an inhibitory effect on histamine metabolism when present at levels 4–5 times higher than that of histamine [11]. This potentiation mechanism could explain why symptoms do not appear when histamine is administered intravenously and yet are triggered when the same amounts of histamine are consumed in foods containing other amines [4].

Alcohol and its metabolite acetaldehyde can also have a potentiating effect. Competition for the ALDH enzyme, which is involved in the metabolism of both alcohol and histamine, results in an accumulation of histamine [1, 12]. The presence of these potentiating factors can thus explain the appearance/absence of symptoms or the variable degrees of reaction among individuals who have consumed foods containing the same amount of histamine.

### 2.2.5 Outbreaks of histamine intoxication in the European Union

Frequent misdiagnosis and the lack of an adequate and obligatory system for reporting histamine intoxication could account for the limited statistical data on the incidence of this food-borne disease [10, 15]. A total of 386 outbreaks were reported in 2010–2015 by different EU member states according to the EFSA reports on food-borne outbreaks [57]. In 191 of the outbreaks, the food responsible was determined with strong evidence, involving more than 1000 cases of which 107 were hospitalised (Figure 3). No deaths due to histamine intoxication were reported during this period. According to these data, there is no clear declining trend in the incidence of histamine intoxication in recent years, in contrast with other types of food poisoning (Figure 3). During this period, fish and fishery products were the primary cause of histamine intoxication in the European Union (176 outbreaks), followed by “mixed foods” (six outbreaks, three of which included a dish of tuna), “cheese” (three outbreaks), “buffet meal”, “crustaceans, shellfish, mollusc and products thereof”, “dairy products other than cheese”, “vegetables and juices and other products thereof” (one outbreak each) and “other foods” (two outbreaks) [57].

On the other hand, according to information extracted from the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), there was a clear rise in notification of histamine intoxication cases linked to tuna consumption during 2014–2017, with a particularly sharp increase in 2017 [57]. In May 2017, Spain and France reported a



**Figure 3.** Assessment of the incidence of histamine intoxication in EU countries during the 2010–2015 [57].



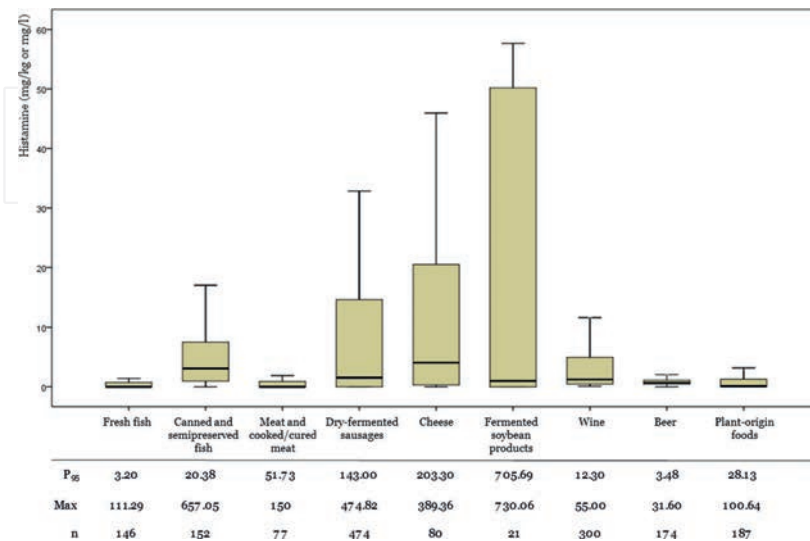
*Biogenic Amines*

high incidence of histamine intoxication after the consumption of yellowfin tuna from Spain. Additional cases may have arisen in other countries that imported this food product. More than 150 people in Spain and more than 40 in France were affected after consuming tuna that was allegedly treated with a vegetable extract to alter the colour and enhance display freshness [58]. The modification of colour may mask spoilage responsible for the production of histamine and other biogenic amines.

### 2.3 Exposure assessment

To assess consumer exposure, it is necessary to have data on histamine levels in foods. The overall exposure to dietary histamine is difficult to estimate due to its multiple potential sources and variable concentration. **Figure 4**, which shows the distribution of histamine contents in different foods retailed in Spain, reflects this characteristic high variability, both among different food categories and within the same category.

Fresh fish and fishery products usually do not contain histamine or only low levels [59]. As shown in **Figure 4**, in most of the Spanish retail fish samples reported by Bover-Cid et al. [3], histamine was absent or found in very small quantities (P<sub>95</sub> below 5 mg/kg). These data are in agreement with the scientific report published by EFSA based on samples of non-fermented fish and fish products from different European countries, in which only 27% of a total of 6329 samples contained histamine, usually at low concentrations (median of 2.5 mg/kg) [1]. However, a lack of freshness in raw fish and/or hygienically inadequate manufacturing processes of semi-preserved or preserved fish products can lead to markedly high histamine content. An example is the 657 mg/kg of histamine recorded within the Spanish canned fish category (**Figure 4**) or the 8910 mg/kg in fish and fishery products in the EFSA report [1]. Notably, when freshness is lost, in addition to high amounts of histamine, other amines related to the decarboxylase activity of spoilage bacteria, such as cadaverine and putrescine, also frequently accumulate.



**Figure 4.** Histamine distribution (mg/kg or mg/L) in different food products [3].

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

In fresh, cooked or cured meat, as in fish, no histamine occurrence is expected as long as freshness and a proper hygienic status of the products or manufacturing processes are ensured [1, 3, 60]. In contrast, fermented foods are susceptible to accumulating large amounts of histamine [1, 3, 5, 61]. In this type of foods, the occurrence of histamine depends not only on the hygienic conditions of the raw materials and/or manufacturing processes but also on the aminogenic capacity of the bacteria responsible for the fermentation [11, 12]. As can be seen in **Figure 4**, the presence of histamine in Spanish retail fermented foods is frequently relatively low (85% of samples below 20 mg/kg), but in some cases its levels are notably high, as in cheese (389 mg/kg), fermented sausages (475 mg/kg) or soybean products (730 mg/kg). In fermented beverages (e.g. wine and beer), histamine contents are much lower than those reported for other fermented foods. Notably, together with histamine, tyramine is usually the most frequent and abundant amine in fermented foods, because its formation is closely related to the lactic acid bacteria responsible for the fermentation processes, and its levels can reach 600 mg/kg in cheese, 700 mg/kg in fermented sausages and 1700 mg/kg in fermented vegetables. The occurrence of putrescine and cadaverine is also quite common but at lower and more variable concentrations than tyramine.

Among foods of plant origin, only some vegetables usually show significant levels of histamine, such as spinach, tomato and eggplant [13]. In these products low levels of histamine may have a physiological origin, but undesirable microbial enzymatic activity during storage can lead to the accumulation of high levels [13, 62]. Lavizzari et al. [62] reported a significant increase in histamine levels in different spinach samples stored at refrigeration temperature during 2 weeks. Histamine formation in this type of vegetables was attributed to the activity of some Gram-negative bacteria, mainly belonging to *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* groups, as their growth is favoured by the relatively high pH of spinach. Asparagus, pumpkin, chard and avocado rarely contain histamine and at very low levels [13]. Other types of frequently consumed foods, such as cereals, milk, yoghurt and eggs, do not show significant contents of histamine or any other biogenic amine [3].

In addition to food content, another fundamental issue when assessing exposure to histamine is the actual consumption of food by the population. Food consumption data need to be as representative as possible, with sources such as the most recent national dietary surveys.

In the exposure assessment performed by EFSA, the 95-percentiles of biogenic amine contents of different European foods and their consumption patterns were combined to provide exposure values in terms of mg/day as an estimation of a high exposure scenario [1]. For histamine, the highest exposure values were obtained for the category “fresh, frozen and canned fish” (8.8–41.4 mg/day) followed by “dry-fermented sausages” (6.4–37.1 mg/day), “cheese” (13–32.1 mg/day) and “fish sauces” (0.4–29.9 mg/day). Likewise, in an assessment of the dietary histamine exposure of Austrian consumers, it was concluded that tuna fish and some fermented products (cheese and sauerkraut) were the top contributors to the total histamine intake [24]. According to this study, a typical meal with fish as a main dish could contribute from 2.3 to 264 mg of histamine. Recently, Latorre-Moratalla et al. [63] carried out an assessment of Spanish consumer exposure to histamine derived from the consumption of dry-fermented sausages, concluding that in 95% of cases, it was lower than 6.8 mg/meal.

The larger serving size of fish products, together with the extremely high histamine contents arising from hygienic defects in their conservation or manufacturing processes, could explain why these foods contribute more to histamine exposure than others, such as cheese or dry-fermented sausages, which a priori have higher average histamine contents. This could also explain why fish and fishery products are the predominant cause of histamine intoxication.

## 2.4 Risk characterisation

Performing an adequate quantitative risk characterisation of histamine exposure is hampered by the lack of dose-response data. However, a qualitative approach, taking into account the limited data available, suggests that the risk of suffering histamine intoxication is relatively low, since exposure exceeds the safety limit on very few occasions.

According to the qualitative risk characterisation performed by EFSA, exposure to histamine (95-percentile value) in fermented foods does not go beyond the safe threshold of 50 mg/meal/person [1]. However, it is stressed that this upper limit may be exceeded by the consumption of more than one food item with high histamine content during the same meal. Likewise, Latorre-Moratalla et al. [63] concluded that the risk of suffering acute effects related to histamine intake after the consumption of dry-fermented sausages in Spain is very low, since the exposure levels rarely exceed the safe threshold. It should be noted that all available studies have been carried out on specific food groups and to date none have dealt with the full range of histamine-containing foods.

The risk for the histamine-intolerant population is higher, because even small amounts of histamine may trigger adverse effects [1, 63]. No studies have been carried out to evaluate this risk.

## 3. Risk management

From the perspective of risk management, decision-makers or the food industry should consider different actions to reduce consumer exposure to dietary histamine. For example, regulatory measures or strategies to prevent, reduce or eliminate the presence of histamine and other amines in foods could be implemented.

From a legal perspective, tolerable limits of histamine have been fixed by different countries only for fish and fishery products. The European Union through Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria has established that in fishery products from species with a naturally high histidine content (particularly fish from the *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* and *Scorpaenidae* families), using a sampling plan of nine samples, the mean histamine value must be less than 100 mg/kg, no sample should exceed 200 mg/kg and among nine samples only two can have a histamine content between 100 and 200 mg/kg [64]. In fishery products obtained from species with a high histidine content and subjected to an enzymatic maturation treatment in brine, the maximum average value allowed is 200 mg/kg, the maximum individual value is 400 mg/kg and there can only be two samples between these two values in a sampling plan of nine samples [64, 65]. The Food and Drug Administration (FDA) of the United States, using a sampling plan of 18 samples, establishes a tolerable maximum level of 50 mg/kg of histamine for tuna and mahi-mahi or between 50 and 500 mg/kg of histamine for other fish species, with just one sample higher than these values [66]. In Canada, Switzerland and Brazil, the maximum limit allowed in fish and fishery products is 100 mg/kg and in Australia and New Zealand 200 mg/kg [7].

As histamine and other biogenic amines are a food safety concern, the food industry needs to consider improving control strategies. Available knowledge about biogenic amine formation in certain foods has made it possible to design measures to prevent or at least reduce their accumulation during manufacture and storage.

A key strategy is to guarantee and improve the hygienic quality of raw materials and manufacturing processes. Since contaminant microorganisms are responsible

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

for biogenic amine formation in many products, food quality and safety management based on hazard analysis and critical control points (HACCP) are essential [4, 7]. The time/temperature binomial is the most critical and determinant risk factor in biogenic amine formation in most fresh and lightly preserved meat and seafood products, as well as in raw materials (of animal and plant origin) used in the preparation of cooked, ripened or fermented products [3, 7, 11]. Predictive models of biogenic amine formation in perishable products as a function of time and temperature could be used to avoid hazardous storage conditions [11, 67]. This approach has already been implemented to reduce histamine accumulation in seafood, which is particularly associated with histamine formation by *Morganella psychrotolerans* and *M. morganii* [67]. Other factors that inhibit or reduce aminogenic activity, such as the packaging atmosphere and the addition of salt and other preservatives, should be taken into account for lightly preserved fish, meat and vegetables [6, 11].

In the case of fermented foods or beverages, the hygienic quality of raw materials may be enhanced by decreasing the microbial load through pasteurisation, a common practice in the cheese-making industry [5]. However, in fermented meat products, high temperature causes detrimental changes in the raw materials, thus rendering the conventional heat treatments unsuitable. The application of high-pressure treatments to raw materials (milk and meat) could be an effective strategy to improve their hygienic status, thereby reducing the biogenic amine accumulation without significant alteration of sensory properties [11, 68].

Techniques that avoid biogenic amine formation should also be implemented in fermented food products. For example, the use of a suitable formulation (adjusting the type and amount of fermentable sugar, spices and preservatives) and well-established technological parameters (temperature and relative humidity) enables a quick and accurate selection of desired fermentative microbiota, which limits the action of contaminant microorganisms, including amine formation [11, 18]. Moreover, it has been widely demonstrated that the selection of microorganisms without aminogenic activity for the starter cultures constitutes an effective control measure against biogenic amine accumulation in fermented products [6, 11, 18, 61]. For cases where these strategies are not sufficiently effective, a new approach currently being explored is the application of starter cultures with amino-oxidase activity, which are able to degrade previously formed amines [11, 61].

A general control strategy for wine that includes many of these approaches is the so-called low-histamine technology, which is based on the guaranteed hygienic quality of the raw materials, the addition of selected starter cultures and the use of specific production techniques that inhibit histamine formation [3]. The current challenge for the food industry is to extend this technology to other biogenic amines and other products. The successful implementation of “low biogenic amine technologies” will enable food manufacturers to produce safe and high-quality amine-free food.

#### 4. Conclusions

Although the health problems associated with histamine consumption are well known, there are some uncertainties, especially regarding the threshold level of this amine that may trigger the symptoms. Histamine concentrations reported as responsible for intoxication outbreaks are extremely variable. Thus, despite the association of adverse effects with the ingestion of high levels of histamine, lower levels can also cause symptoms in sensitive individuals with a genetic or acquired impairment in the enzymatic degradation of histamine (the histamine-intolerant population). The difficulty in establishing a specific toxic dose is also due to the

### *Biogenic Amines*

presence of other biogenic amines in the implicated foods, which can potentiate the adverse effects of histamine.

The few qualitative risk assessments of histamine performed to date all indicate that the current risk of suffering histamine intoxication is low. However, in the population with histamine intolerance, the risk of suffering symptoms derived from the intake of histamine would be much higher. In fact, according to the risk assessment performed by EFSA, only levels below the detectable limit can be considered as safe. Therefore, for these individuals, the main strategy to avoid histamine-related health problems is to follow a diet that excludes foods rich in this or other amines, such as putrescine and cadaverine, which can potentiate the adverse effects of histamine.

According to current EU data, the consumption of spoiled fish and fishery products is the main cause of histamine intoxication outbreaks. Although this type of food usually has a low or negligible histamine content, a lack of freshness and poor hygienic conditions may result in the accumulation of high levels and trigger an outbreak. In contrast, whereas fermented foods often have higher histamine contents than fish and fish derivatives, their serving size tends to be lower, which could explain why they are generally less implicated in the outbreaks. Nevertheless, even when the risk of intoxication is low, the accumulation of high levels of histamine in fermented foods may indicate poor hygienic quality and is an argument for extending the legislative criteria to foods other than fish.

The lack of consensus on what quantities of dietary histamine produce intoxication can be explained by the coexistence of other biogenic amines in the same foods, as well as inter- and intra-individual variability in histamine metabolism. The impaired ability to metabolise ingested histamine has led to the description of a relatively new disorder, that of histamine intolerance due to DAO deficiency.

A current challenge for the food industry is to offer products with minimal biogenic amine levels, and it may be recommendable to declare the presence or absence of histamine in food labelling. Private initiatives have already begun to include the message “without histamine” in products as a hallmark of quality. Such labelling could help those with histamine intolerance to make a more informed selection of suitable foods.

### **Acknowledgements**

Sònia Sánchez-Pérez is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF2018).

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

# IntechOpen

## Author details

Oriol Comas-Basté<sup>1,2,3</sup>, Maria Luz Latorre-Moratalla<sup>1,2,3</sup>, Sònia Sánchez-Pérez<sup>1,2,3</sup>,  
Maria Teresa Veciana-Nogués<sup>1,2,3</sup> and Maria del Carmen Vidal-Carou<sup>1,2,3\*</sup>


1 Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain

2 Research Institute of Nutrition and Food Safety of the University of Barcelona (INSA-UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain

3 Catalanian Reference Network on Food Technology (XaRTA), Barcelona, Spain

\*Address all correspondence to: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu)

## IntechOpen

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

## References

- [1] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 2011;**9**:2393. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393
- [2] Taylor SL. Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese and Other Foods. Report VPH/FOS/85.1. Geneva: World Health Organisation Press; 1985. pp. 1-48
- [3] Bover-Cid S, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Processing contaminants: Biogenic amines. In: Motarjemi Y, Moy GG, Todd ECD, editors. *Encyclopedia of Food Safety*. Vol. 2. Waltham: Elsevier Inc; 2014. pp. 381-391. DOI: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00216-X
- [4] Hungerfort JM. Scombroid poisoning: A review. *Toxicol*. 2010;**56**:231-243. DOI: 10.1016/j.toxicol.2010.02.006
- [5] Linares DM, Martín MC, Ladero V, Alvarez MA, Fernández M. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;**51**:691-703. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813
- [6] Gardini F, Özogul Y, Suzzi G, Tabanelli G, Özogul F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2016;**7**:1218. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218
- [7] Biji KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, Mohan CO, Srinivasa Gopal TK. Biogenic amines in seafood: A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;**53**:2210-2218. DOI: 10.1007/s13197-016-2224-x
- [8] Russo P, Spano G, Arena MP, Capozzi V, Fiocco D, Grieco F, et al. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? In: Mendez-Villas A, editor. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. pp. 1087-1095
- [9] Ladero V, Calles M, Fernandez M, Alvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*. 2010;**6**:145-156. DOI: 10.2174/157340110791233256
- [10] Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Frontiers in Microbiology*. 2014;**5**:500. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00500
- [11] Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*. 2010;**75**:139-150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x
- [12] Vidal-Carou MC, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla ML, Bover-Cid S. Biogenic amines: Risks and control. In: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Sebranek JG, Talon R, editors. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2014. pp. 413-428. DOI: 10.1002/9781118522653.ch47
- [13] Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Rabell-González J, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla ML, Vidal-Carou MC. Biogenic amines in plant-origin foods: Are they frequently underestimated in low-histamine diets? *Food*. 2018;**14**:7-12. DOI: 10.3390/foods7120205
- [14] Chong CY, Abu Bakar F, Russly AR, Jamilah B, Mahyudin NA. The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*. 2011;**18**:867-876

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

- [15] Kovacova-Hanusikova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*. 2015;**43**:498-506. DOI: 10.1016/j.aller.2015.05.001
- [16] Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. Histamine stability in Rihakuru at -80, 4 and 30°C. *Food Chemistry*. 2012;**135**:1226-1229. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.066
- [17] Jiang QQ, Dai ZY, Zhou T, Wu JJ, Bu JZ, Zheng TL. Histamine production and bacterial growth in mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) during storage. *Journal of Food Biochemistry*. 2013;**37**:246-253. DOI: 10.1111/jfbc.12021
- [18] Latorre-Moratalla ML, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology*. 2012;**3**:169. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00169
- [19] Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;**85**:1185-1196. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185
- [20] Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Bernacchia R, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;**145**:379-385. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.06.029
- [21] World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products: Meeting Report. World Health Organization; 2013
- [22] Legroux R, Levaditi JC, Segond L. Methode de mise en evidence de l'histamine dans les aliments causes d'intoxications collectives a l'aide de l'inoculation au cobaye. *Comptes Rendus Biologies*. 1946;**140**:863-864
- [23] Legroux R, Levaditi JC, Bouidin G, Bovet D. Intoxications histaminiques collectives consecutives a l'ingestion de thon frais. *La Presse Médicale*. 1964;**54**:545-546
- [24] 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. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.011
- [25] Ricci G, Zannoni M, Cigolini D, Caroselli C, Codogni R, Caruso B, et al. Tryptase serum level as a possible indicator of scombroid syndrome. *Clinical Toxicology*. 2010;**48**:203-206. DOI: 10.3109/15563651003649177
- [26] Schwelberger HG. Histamine intolerance: A metabolic disease? *Inflammation Research*. 2010;**59**:S219-S221. DOI: 10.1007/s00011-009-0134-3
- [27] Reese I, Ballmer-Weber B, Beyer K, Fuchs T, Kleine-Tebbe J, Klimek L, et al. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine: Guideline of the German society for allergology and clinical immunology (DGAKI), the German society for pediatric allergology and environmental medicine (GPA), the German association of allergologists (AeDA), and the Swiss society for allergology and immunology (SGAI). *Allergo Journal International*. 2017;**26**:72-79. DOI: 10.1007/s40629-017-0011-5
- [28] Sattler J, Häfner D, Klotter HJ, Lorenz W, Wagner PK. Food-induced histaminosis as an epidemiological



*Biogenic Amines*

problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*. 1988;**23**:361-365

[29] Maintz L, Yu CF, Rodríguez E, Baurecht H, Bieber T, Illig T, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy*. 2011;**66**:893-902. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02548.x

[30] García-Martín E, Martínez C, Serrador M, Alonso-Navarro H, Ayuso P, Navacerrada F, et al. Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine. *Headache*. 2015;**55**:276-286. DOI: 10.1111/head.12493

[31] Steinbrecher I, Jarisch R. Histamine and headache. *Allergologie*. 2005;**28**:85-91

[32] Worm M, Fielder E, Döle AS, Schink T, Hemmer W, Jarisch R, et al. Exogenous histamine aggravates eczema in a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. 2009;**89**:52-56. DOI: 10.2340/00015555-0565

[33] Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011;**17**:E23-EE5. DOI: 10.1002/ibd.21588

[34] Mušič E, Korošec P, Šilar M, Adamič K, Košnik M, Rijavec M. Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2013;**12**:239-243. DOI: 10.1007/s00508-013-0354-y

[35] Rosell-Camps A, Zibetti S, Pérez-Esteban G, Vila-Vidal M, Ferrés Ramis L, García-Teresa-García

E. Intolerancia a la histamina como causa de síntomas digestivos crónicos en pacientes pediátricos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2013;**105**:201-207. DOI: 10.4321/S1130-01082013000400004

[36] Manzotti G, Breda D, Gioacchino M, Burastero SE. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015;**29**:105-111. DOI: 10.1177/0394632015617170

[37] Hoffmann M, Gruber E, Deutschmann A, Jahnel J, Hauer A. Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Archives of Disease in Childhood*. 2016;**98**:832-833. DOI: 10.1136/archdischild-2013-305024

[38] Wagner N, Dirk D, Peveling-Oberhag A, Reese I, Rady-Pizarro U, Mittel H, et al. A popular myth—Low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria—Fact or fiction? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017;**31**:650-655. DOI: 10.1111/jdv.13966

[39] Kacik J, Wróblewska B, Lewicki S, Zdanowski R, Kalicki B. Serum diamine oxidase in pseudoallergy in the pediatric population. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018;**1039**:35-44. DOI: 10.1007/5584\_2017\_81

[40] Pinzer TC, Tietz E, Waldmann E, Schink M, Neurath MF, Zopf Y. Circadian profiling reveals higher histamine plasma levels and lower diamine oxidase serum activities in 24% of patients with suspected histamine intolerance compared to food allergy and controls. *Allergy*. 2018;**73**:949-957. DOI: 10.1111/all.13361

[41] Son JH, Chung BY, Kim HO, Park CW. A histamine-free diet is helpful for treatment of adult patients with chronic spontaneous urticaria. *Annals*

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

- of Dermatology. 2018;**30**:164-172. DOI: 10.5021/ad.2018.30.2.164
- [42] Izquierdo-Casas J, Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Lorente-Gascón M, Duelo A, Vidal-Carou MC, et al. Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2018;**74**:93-99. DOI: 10.1007/s13105-017-0571-3
- [43] Töndury B, Wüthrich B, Schmid-Grendelmeier P, Seifert B, Ballmer-Weber BK. Histamine intolerance: Is the determination of diamineoxidase activity in the serum useful in routine clinical practice? *Allergologie*. 2008;**31**:350-356. DOI: 10.5167/uzh-5336
- [44] Kofler H, Aberer W, Beibl M, Hawranek T, Klein G, Reider N, et al. Diamine oxidase (DAO) serum activity: Not a useful marker for diagnosis of histamine intolerance. *Allergologie*. 2009;**32**:105-109. DOI: 10.5414/ALP32105
- [45] Wantke F, Götz M, Jarisch R. The red wine provocation test: Intolerance to histamine as a model for food intolerance. *Allergy Proceedings*. 1994;**15**:27-32
- [46] Dalgaard P, Emborg J, Kjolby A, Sorensen N, Ballin N. Histamine and biogenic amines: Formation and importance in seafood. In: Borresen T, editor. *Improving Seafood Products for the Consumer*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd; 2008. pp. 292-324. DOI: 10.1533/9781845694586.3.292.
- [47] NSW Food Authority. Presence of Histamine in Anchovies. NSW/FA/FI079/1007. 2011.
- [48] Demoncheaux JP, Michel R, Mazenot C, Duflos G. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) at a military mass catering in Dakar, Senegal. *Epidemiology and Infection*. 2012;**140**:1008-1012. DOI: 10.1017/S0950268811001701
- [49] Tortorella V, Masciari P, Pezzi M, Mola A, Tiburzi SP, Zinzi MC, et al. Histamine poisoning from ingestion of fish or scombroid syndrome. *Case Reports in Emergency Medicine*. 2014;**2014**:4. DOI: 10.1155/2014/482531
- [50] Fariñas-Cabrero MA, Berbel-Hernández C, Allué-Tango M, Díez-Hillera M, Herrero-Marcos JA. Outbreak due to butterflyfish consumption: Keriorrhea and histamine poisoning. *Revista Española de Salud Pública*. 2015;**89**:99-105. DOI: 10.4321/S1135-57272015000100011
- [51] Petrovic J, Babić J, Jaksic S, Kartalovic B, Ljubojevic D, Cirkovic M. Fish product-borne histamine intoxication outbreak and survey of imported fish and fish products in Serbia. *Journal of Food Protection*. 2016;**79**:90-94. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-190
- [52] Lee YC, Kung HF, Wu CH, Hsu HM, Chen HC, Huang TC, et al. Determination of histamine in milkfish stick implicated in food-borne poisoning. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016;**24**:63-71. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.06.009
- [53] Colombo FM, Cattaneo P, Confalonieri E, Bernardi C. Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;**58**:1131-1151. DOI: 10.1080/10408398.2016.1242476
- [54] Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;**58**:1-37. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8
- [55] Hamada Y, Shinohara Y, Yano M, Yamamoto M, Yoshio M, Satake K,

## Biogenic Amines

- et al. Effect of the menstrual cycle on serum diamine oxidase levels in healthy women. *Clinical Biochemistry*. 2013;**46**:99-102. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.10.013
- [56] Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K, Novak N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: A critical review. *Human Reproduction Update*. 2008;**14**:485-495. DOI: 10.1093/humupd/dmn014
- [57] European Food Safety Authority. Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. *EFSA Supporting Publications*. 2017;**EN-1301**:37. DOI: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301
- [58] Whitworth JJ. Spain Takes Measures to Address Histamine in Tuna RAFFS Alerts [Internet] 2018. Available from: <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/06/12/Audit-of-Spanish-tuna-sector-after-histamine-RASFF-notifications> [Accessed: May 12, 2018]
- [59] Baixas-Noguera S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Effect of gutting on microbial loads, sensory properties, and volatile and biogenic amine contents of European hake (*Merluccius merluccius* var. *mediterraneus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*. 2009;**72**:1671-1676. DOI: 10.4315/0362-028X-72.8.1671
- [60] Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Bover-Cid S, Garriga M, Aymerich T, Zanardi E, et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*. 2008;**107**:912-921. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.046
- [61] Alvarez M, Moreno-Arribas V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*. 2014;**39**:146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007
- [62] Lavizzari T, Veciana-Nogués MT, Weingart O, Bover-Cid S, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;**55**:9514-9519. DOI: 10.1021/jf071307
- [63] Latorre-Moratalla ML, Comas-Basté O, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;**99**:78-85. DOI: 10.1016/j.fct.2016.11.011
- [64] Regulation 2073/2005/EC. Microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2005;**338**:1-26
- [65] Regulation 1019/2013/EU. Amending annex I to regulation EC No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. *Official Journal of the European Union*. 2013;**282**:46-47
- [66] Food and Drug Administration (FDA). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. 4th ed. Washington: United States Department of Health and Human Services; 2011. p. 468
- [67] Emborg J, Dalgaard P. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morgani*—Development and evaluation of predictive models. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;**128**:234-243. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.015
- [68] Calzada J, Del Olmo A, Picón A, Gaya P, Nuñez M. Reducing biogenic-amine-producing bacteria,

*Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84333>

decarboxylase activity, and biogenic  
amines in raw milk cheese by  
high-pressure treatments. *Applied  
and Environmental Microbiology*.  
2013;79:1277-1283. DOI: 10.1128/  
AEM.03368-12

IntechOpen

IntechOpen



## 2.3. Intolerància a la histamina

Segons la revisió de la nomenclatura de les al·lèrgies i reaccions afins que va publicar la *World Allergy Organization* l'any 2004, aquelles reaccions provocades pel consum d'un aliment que manquen de fonament immunològic han de ser anomenades hipersensibilitat alimentària no al·lèrgica, per diferenciar-les clarament de les al·lèrgies alimentàries iniciades per un mecanisme immunològic específic [85]. Precisament, la hipersensibilitat alimentària no al·lèrgica és el que es coneix habitualment com a intolerància alimentària, una resposta desencadenada per un aliment o per algun dels seus components a una dosi normalment tolerada per a la població sana [86,87]. Mentre que la prevalença de l'al·lèrgia alimentària s'estima en un 1-2% en adults, actualment gairebé un 20% de la població en països desenvolupats pateix algun tipus d'intolerància als aliments, essent la intolerància a la lactosa la més freqüent en el nostre entorn [87,88].

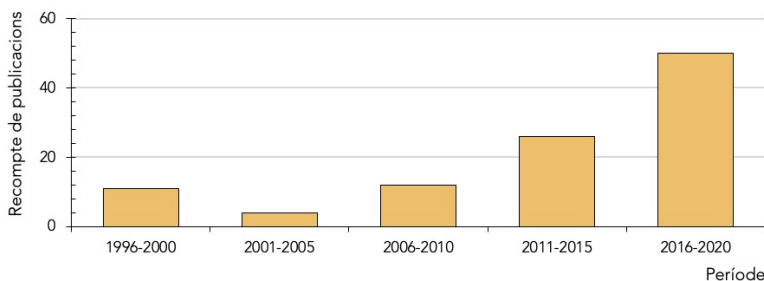


Figura 6. Recoppte de publicacions científiques que contenen les paraules clau *histamine intolerance* o *histaminosis* segons cerca realitzada a través del motor de cerca de PubMed a la base de dades bibliogràfica MEDLINE (Cerca actualitzada el mes de juny de 2020).

La intolerància a la histamina es pot definir com un desordre en l'homeòstasi de la histamina degut a una reduïda capacitat de degradació d'aquesta amina a nivell intestinal, provocant la seva acumulació en plasma i l'aparició d'efectes adversos [22,26,33,46,89]. Com s'ha mencionat anteriorment, l'enzim DAO és l'encarregat de la degradació d'histamina dietètica a nivell intestinal, pel que un dèficit en l'activitat metabòlica d'aquest enzim és la principal causa reconeguda de la intolerància a la histamina [33,46,90]. Malgrat les primeres referències científiques sobre la intolerància a la histamina són de fa més de 20 anys, és significatiu que gairebé el

80% han aparegut durant la darrera dècada, mostrant l'interès creixent dels investigadors en aquest desordre (Figura 6).

L'any 2011, l'EFSA ja va considerar la intolerància a la histamina com un dels riscos associats a la ingesta d'histamina, dotant-la d'entitat clínica diferenciada de la ja coneguda intoxicació histamínica [1]. Tanmateix, en l'informe conjunt de l'OMS i la FAO publicat posteriorment, es subratllava que el NOAEL establert per a la histamina era un llindar únicament vàlid per a persones sanes, però en cap cas per a membres de certs segments poblacionals amb una major susceptibilitat a aquest compost, com és el cas dels intolerants a la histamina [37]. Segons aquestes organitzacions internacionals, seria necessari considerar límits més reduïts del perill en qüestió per tal de garantir la salut de la població susceptible. Concretament, l'EFSA conclou que únicament aliments amb nivells d'histamina inferiors als límits de detecció serien segurs per a la població amb intolerància a la histamina [1].

A diferència de la prèviament descrita intoxicació per histamina, l'aparició de símptomes de la intolerància a la histamina no està lligada al consum d'un aliment en concret, sinó que pot associar-se a un ampli ventall d'aliments amb un contingut d'histamina variable i, fins i tot, baix [1,11]. La figura 7 mostra de forma esquemàtica una comparació entre ambdós desordres associats a la ingesta d'histamina.

	Intoxicació per histamina	Intolerància a la histamina
<b>Altres denominacions</b>	Escumbrototoxicosi, enverinament per escòmbrids i intoxicació escumbroidea	Síndrome d'histaminosi enteral i sensibilitat a la histamina alimentària
<b>Perill responsable</b>	Histamina	Histamina
<b>Causa</b>	Ingesta d'aliments amb un contingut inusualment alt d'histamina	Deficiència en el sistema de degradació d'histamina a nivell intestinal (Dèficit DAO)
<b>Població afectada</b>	Brot que afecta la població que ha consumit l'aliment comú responsable	Població susceptible / sensible
<b>Síntomatologia</b>	Símptomes aguts de tipus al·lèrgic vinculats a l'activació dels 4 receptors de la histamina	Símptomes crònics de tipus al·lèrgic vinculats a l'activació dels 4 receptors de la histamina
<b>Diagnòstic</b>	Nivells elevats d'histamina en sang o en l'aliment causant	Presència de símptomes i remissió per exclusió de la histamina de la dieta
<b>Tractament</b>	Remissió espontània dels símptomes o tractament puntual amb antihistamítics	Seguiment permanent de dieta baixa en histamina i/o suplementació enzimàtica

Figura 7. Comparació conceptual de la intoxicació per histamina i la intolerància a la histamina.

Les manifestacions clíniques de la intolerància a la histamina consisteixen en un ampli ventall de símptomes gastrointestinals i extra-intestinals inespecífics degut a la ubiqüa distribució dels 4 receptors de la histamina en els diferents òrgans i teixits de l'organisme (figura 8) [22,33,86,91]. En un estudi molt recent publicat per un equip d'investigadors austríacs es va fer un anàlisi exhaustiu dels símptomes experimentats per 133 pacients diagnosticats amb intolerància a la histamina [91]. Les manifestacions gastrointestinals van ser les afectacions més freqüents i de més severitat, destacant la presència de distensió abdominal en un 92% dels pacients i la sensació de plenitud postprandial, diarrea, dolor abdominal i restrenyiment en el 55-73% de les persones intolerants. Les afectacions del sistema nerviós i l'aparell cardiovascular, com ara mareig, cefalees i palpitations, es van registrar en segona posició, seguides pels símptomes de caire respiratori i dermatològic. Alhora, aquest estudi va posar de manifest la complexitat del quadre clínic de la intolerància a la histamina, ja que l'aparició de combinacions de 3 o més símptomes amb afectació a diferents òrgans es va registrar en el 97% dels casos i el nombre mig de manifestacions va ascendir a 11 símptomes per pacient.

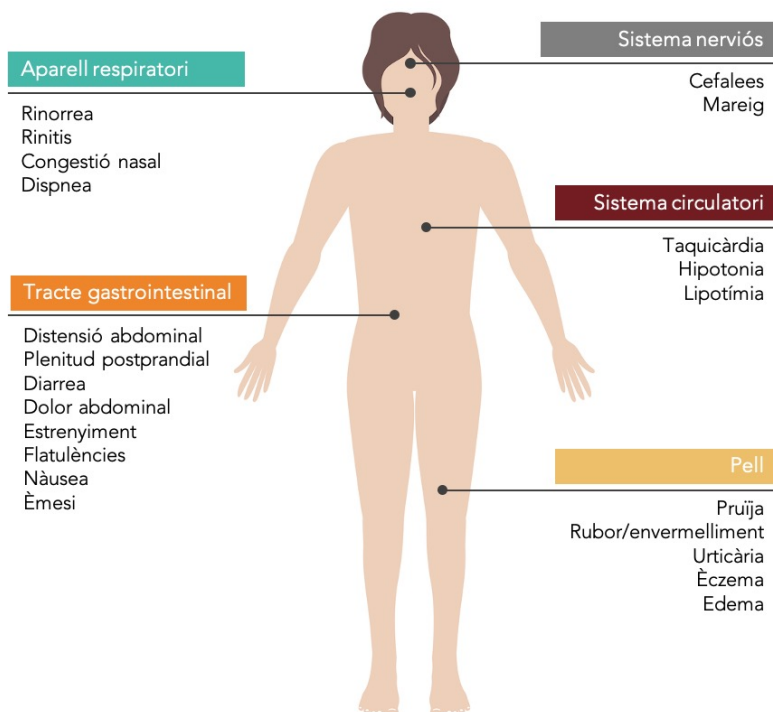


Figura 8. Principals manifestacions clíniques de la intolerància a la histamina.



Indubtablement, la baixa especificitat d'aquests símptomes i la seva complexa variabilitat són algunes de les causes de l'actual dificultat en consensuar el criteri diagnòstic d'aquesta intolerància, com es tractarà de forma detallada més endavant [22]. Tanmateix, la manca de dades fa difícil determinar la incidència actual d'aquest desordre, encara que certs autors han xifrat en un 1-3% el seu abast, percentatge que possiblement augmentarà a mesura que augmenti el coneixement i les eines diagnòstiques disponibles per a la intolerància a la histamina [22,33,92].

### 2.3.1. Etiologia de la intolerància a la histamina

El desencadenant de la intolerància a la histamina és una reduïda capacitat de l'organisme humà per a degradar la histamina ingerida a través dels aliments [69]. Com s'ha comentat en apartats anteriors, l'enzim DAO és el principal encarregat de protegir l'organisme enfront la histamina exògena a nivell intestinal, pel que desenvolupa un efecte barrera fonamental en la prevenció del pas de la histamina cap a circulació sistèmica [22,33,93]. De fet, ja son nombrosos els estudis clínics que han aportat dades sobre la prevalença de dèficit de DAO plasmàtic en poblacions afectades per determinats símptomes relacionats a la intolerància a la histamina, principalment cefalea i desordres gastrointestinals o dermatològics [45,92,102–105,94–101]. Malgrat tots ells presenten certes limitacions, ja sigui pel disseny o nombre de participants, la majoria assenyalen una associació entre una determinada simptomatologia i el dèficit de DAO, assentant una tendència global que dona suport al paper de l'enzim DAO com a factor clau en la etiologia d'aquest trastorn. D'entre les circumstàncies que condueixen a un dèficit funcional d'enzim DAO i, per tant, predisposen un subgrup poblacional a patir intolerància a la histamina, s'hi inclou un origen genètic, patològic o farmacològic [22,33].

Pel que fa al rerefons genètic de la intolerància a la histamina, existeixen diversos treballs que han analitzat detalladament els polimorfismes genètics que afecten als gens que codifiquen els enzims L-histidina descarboxilasa, DAO i HNMT, així com els diferents receptors de la histamina [42,106]. En aquest sentit, diversos treballs han confirmat la presència de més de cinquanta polimorfismes de nucleòtids simples (SNP) no sinònims que afecten el gen que codifica l'enzim DAO i, alguns

d'ells, poden donar lloc a una proteïna amb activitat alterada i esdevenir determinants en l'aparició de símptomes de la intolerància a la histamina [42,106–110]. Concretament, els SNPs més rellevants que afecten la funcionalitat de l'enzim DAO en individus de raça caucàsica són rs10156191, rs1049742, rs2268999 i, especialment, rs1049793 [107,110]. Per altra banda, també ha sigut identificat un SNP present en la regió promotora del gen que provoca una menor activitat transcripcional de l'enzim DAO (rs2052129), així com certes variacions genètiques responsables de dèficit enzimàtic en persones d'origen asiàtic o africà (rs45558339 i rs35070995, respectivament) [42,109]. En la majoria dels casos, l'efecte d'aquestes variacions genètiques en la funcionalitat de l'enzim actuen a través de modificacions en la cinètica enzimàtica que provoquen una elevació de la  $K_M$  i, per tant, una reducció en l'activitat degradant d'histamina [107]. Paral·lelament, tres SNPs han estat identificats com a responsables d'una major activitat de l'enzim DAO (rs2071514, rs1049748 i rs2071517) [109]. També existeix evidència sobre la presència de mutacions en l'enzim DAO en pacients amb determinades patologies cardiovasculars, gastrointestinals i del sistema nerviós; encara que amb resultats encara contradictoris pel que fa a l'efecte positiu/negatiu en alguns casos [106].

L'origen del dèficit de DAO també pot ser adquirit, ja sigui derivat de certes patologies o per interacció amb certs fàrmacs. En primer lloc, diverses patologies inflamatòries intestinals que afecten la integritat de la mucosa han sigut identificades com a causa d'una menor activitat enzimàtica DAO [95,111]. De fet, la severitat del dany en la mucosa correlaciona en certes ocasions amb el grau de disminució de l'activitat d'aquest enzim [95,111,112]. Amb això, l'activitat DAO s'ha suggerit com a marcador eficaç de la integritat de la mucosa intestinal [52,102]. Miyoshi i col. van posar de manifest que l'activitat DAO podia actuar com a un predictor del dany i estat de recuperació de la mucosa intestinal en pacients sotmesos a quimioteràpia [102]. Tanmateix, s'ha observat una associació entre una baixa capacitat de l'enzim DAO i la presència concomitant d'altres intoleràncies vinculades amb problemes de malabsorció intestinal, com ara la intolerància a la lactosa o a la fructosa [95]. En aquest sentit, Enko i col. van concloure que la reducció de les activitats enzimàtiques DAO i lactasa que s'observaven de forma conjunta en certs pacients podien ser conseqüència del dany a la mucosa intestinal ocasionat en l'intestí prim per certs trastorns gastrointestinals (e.g. gastroenteritis,

síndrome de l'intestí curt i cirurgia gastrointestinal) [95]. A més, els pacients amb intolerància a la lactosa i dèficit de DAO mostraren nivells d'hidrogen espirat més elevats i una major aparició de símptomes durant el test de l'hidrogen espirat que els individus intolerants a la lactosa amb una activitat DAO normal [113]. Més recentment, dos treballs han suggerit una relació potencial entre la intolerància a la histamina per dèficit de DAO i la sensibilitat al gluten no celíaca (SGNC) [114,115]. Schnedl i col. van basar aquesta relació en l'ampli paral·lisme entre la simptomatologia de la SGNC i la intolerància a la histamina, mentre que l'estudi pilot realitzat per Griauzdaitė i col. va identificar una forta associació entre l'activitat DAO reduïda i la presència de SGNC, encara que amb un nombre reduït de pacients [114,115]. De fet, Griauzdaitė i col. van identificar una reduïda activitat DAO plasmàtica en 9 dels 10 pacients amb SGNC [115]. Aquesta relació potencial recentment assenyalada requereix ser estudiada més profundament, ja que pot ser d'interès per a la correcta gestió clínica de les persones que pateixen ambdós trastorns.

Per últim, el dèficit de DAO pot ser adquirit transitòriament per l'efecte inhibitori que efectuen determinades substàncies sobre l'enzim DAO i, per tant, reversible un cop desapareix la presència d'aquests agents [33]. Aquest és el cas de certes amines biògenes i l'alcohol, com s'ha tractat anteriorment, però també de diversos fàrmacs àmpliament usats que presenten capacitat per inhibir l'enzim DAO (Taula 2) [1]. De fet, s'ha estimat que aproximadament el 20% de la població europea pren de forma regular algun dels fàrmacs DAO-inhibidors, provocant un augment important de la població susceptible als efectes adversos de la histamina [59]. Resultats experimentals *in vitro* mostren un potent efecte inhibitori (superior al 90%) de la DAO per part de la cloroquina, un històric principi actiu antipalúdic, així com de l'àcid clavulànic, un antibiòtic  $\beta$ -lactàmic àmpliament emprat en combinació amb l'amoxicil·lina [116]. Així mateix, s'ha observat una important inhibició de l'activitat enzimàtica en el cas del fàrmac antihipertensiu verapamil i de l'antagonista del receptor H<sub>2</sub> de la histamina (antihistamínic) cimetidina, encara que l'ús clínic d'aquest últim és actualment anecdòtic [44,116]. Altres substàncies també han mostrat un efecte inhibitori, encara que en menor mesura (taula 2) [44,116,117]. En molts dels casos citats, la similitud estructural entre certes molècules i la histamina explica el seu potencial per unir-se a la zona activa de

l'enzim DAO i provocar la disminució de la degradació enzimàtica de la histamina [44]. En aquesta mateixa línia, les substàncies que provoquin un efecte inhibitori sobre altres enzims involucrats en qualsevol de les rutes metabòliques de la histamina en l'organisme (i.e. HNMT, ALDH i MAO) podrà actuar com a factor desencadenant de hipersensibilitat a aquest compost [20].

Taula 2. Principis actius amb efecte inhibitori de l'enzim DAO.

Principi actiu	Indicació farmacològica
Cloroquina	Antipalúdic
Àcid clavulànic	Antibiòtic
Mesilat de colistina	Antibiòtic
Cefuroxima	Antibiòtic
Verapamil	Antihipertensiu
Clonidina	Antihipertensiu
Dihidralazina	Antihipertensiu
Pentamidina	Antiprotozoari
Isoniazida	Antituberculós
Metamizol	Analgèsic
Diclofenac	Analgèsic i antiinflamatori
Acetilcisteïna	Mucolític
Amitriptilina	Antidepressiu
Metoclopramida	Antiemètic
Suxametoni	Relaxant muscular
Cimetidina	Antihistamínic (antagonista H2)
Prometazina	Antihistamínic (antagonista H1)
Àcid ascòrbic	Vitamina C
Tiamina	Vitamina B1

Com s'ha mencionat anteriorment, existeixen diversos treballs que han avaluat la prevalença de dèficit de DAO plasmàtic en individus amb símptomes associats a la intolerància a la histamina i/o diagnosticats amb certs trastorns o patologies cròniques [59,73,94,108,117–119].

Mušič i col. van reportar un 80% de dèficit de DAO d'entre un grup d'estudi de 316 pacients adults que presentaven símptomes diversos de la intolerància a la

histamina [104]. Els autors van descriure també una activitat DAO plasmàtica significativament menor en aquests pacients en comparació amb el grup control. Similarment, el treball publicat per Manzotti i col. va avaluar retrospectivament l'activitat enzimàtica de 14 pacients amb un diagnòstic confirmat d'intolerància a la histamina que van manifestar, principalment, simptomatologia gastrointestinal i dermatològica, però també cefalees (en un 36% dels casos) [120]. En aquest cas, un 71% dels pacients presentava nivells de DAO deficitaris i una activitat mitja significativament menor que els voluntaris sans. En canvi, el treball realitzat per Pinzer i col. va identificar un menor percentatge de dèficit de DAO en persones intolerants a la histamina (24%), reportant també una elevació dels nivells d'histamina en sang i una constant reducció de l'activitat enzimàtica durant tot el dia [92].

En el camp de la simptomatologia dermatològica, existeixen diversos treballs que han avaluat l'activitat DAO plasmàtica en pacients amb èczema, urticària crònica idiopàtica i dermatitis atòpica [101,121–123]. Aquests estudis mostren una prevalença del dèficit de DAO que oscil·la entre un 19 i 57%. Únicament el treball publicat per Worm i col. va mostrar resultats oposats, ja que no van detectar diferències estadísticament significatives en l'activitat DAO plasmàtica de pacients amb dermatitis atòpica i controls [122].

Pel que fa a símptomes gastrointestinals, Honzawa i col. van valorar la significació clínica dels valors d'activitat DAO plasmàtica d'un total de 98 pacients amb malaltia inflamatòria intestinal [97]. Aquest estudi va demostrar que l'activitat DAO en sang era significativament menor tant en pacients amb malaltia de Crohn com amb colitis ulcerosa en comparació amb la població control; així com la potencial importància d'aquesta mesura per avaluar la permeabilitat intestinal. A més, en població pediàtrica, Rosell-Camps i col. van determinar una prevalença de dèficit de DAO del 88% en pacients menors de 15 anys amb dolor abdominal, diarrea i vòmits, mentre que, contràriament, un altre estudi desenvolupat més recentment per un grup d'investigadors austríacs va reportar únicament un 8% de dèficit de DAO en 394 nens amb dolor abdominal crònic i la manca de correlació entre els nivells d'enzim DAO i d'histamina en sang [45,124].

Finalment, Steinbrecher i Jarisch van desenvolupar un estudi centrat estrictament en cefalea en el qual van reportar un dèficit de DAO en 23 dels 27 pacients (85%) [125]. Paral·lelament, els autors van descriure un augment significatiu d'aquesta activitat enzimàtica després del seguiment d'una dieta baixa en histamina durant quatre setmanes, junt amb una remissió de la cefalea o una reducció de la seva freqüència en gairebé el 90% dels individus.

### 2.3.2. Diagnòstic de la intolerància a la histamina

Malgrat els importants avenços que s'estan duent a terme pel que fa al coneixement de la intolerància a la histamina, definir un algoritme diagnòstic de consens segueix essent un dels reptes pendents. La poca especificitat dels seus símptomes i la manca d'eines diagnòstiques validades fan que molts dels individus afectats sovint facin el que es coneix com a *doctor shopping*, és a dir, recórrer a diversos especialistes mèdics per tal de trobar una explicació i solució per a la diversa simptomatologia que els afecta [22,92]. A falta d'un diagnòstic consensuat i clínicament validat, la figura 9 mostra una proposta esquemàtica d'algoritme diagnòstic de la intolerància a la histamina en base a l'evidència científica disponible que es revisa a continuació.

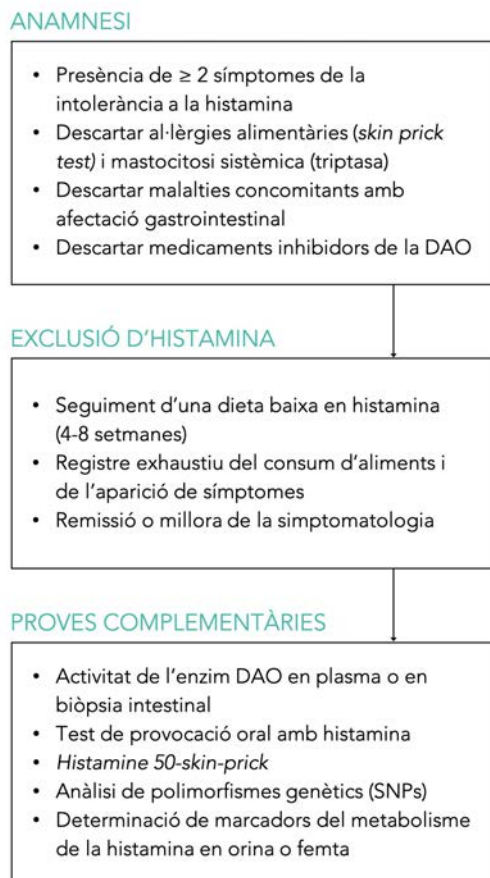


Figura 9. Aproximació proposada per al diagnòstic de la intolerància a la histamina.

Actualment, el diagnòstic s'efectua a través d'una combinació de criteris que consideren la presència de manifestacions clíniques característiques d'aquesta intolerància i l'exclusió d'altres desordres afins [22,33,86]. Dels diferents autors que revisen i proposen un disseny d'algoritme diagnòstic per a la intolerància a la histamina, tots ells subratllen la necessitat de descartar, en una primera etapa, altres causes que puguin ser responsables de l'aparició de símptomes relacionats amb un augment de la histamina plasmàtica [22,33,86]. En aquest sentit, s'aconsella emprar la prova d'al·lèrgia cutània intradèrmica (i.e. *skin prick test*) per tal de descartar una sensibilització per IgE deguda a al·lèrgia alimentària, així com excloure l'existència d'una mastocitosi sistèmica subjacent mitjançant la mesura de la triptasa plasmàtica [33]. Tanmateix, en aquest punt també és important conèixer i considerar si el pacient està prenent algun medicament que pugui estar exercint una inhibició específica sobre l'enzim DAO [89]. Tot seguit, s'ha proposat que la presència de 2 o més símptomes típics de la intolerància a la histamina i la seva millora o remissió al seguir una dieta baixa en histamina (i.e. dieta consistent en la exclusió dels aliments que, a priori, contenen nivells elevats d'aquest compost) permet confirmar el diagnòstic d'intolerància a la histamina [22,33,35,86,126]. Per tal de monitoritzar el seguiment de la dieta es recomana efectuar un registre de 24 hores exhaustiu que reculli detalladament els aliments consumits i els símptomes experimentats amb la finalitat de poder establir una relació, si s'escau, entre un aliment presumiblement ric en histamina i l'aparició de determinats símptomes [22,33]. La durada de la dieta baixa en histamina per tal de confirmar el diagnòstic no es troba degudament estipulada, encara que alguns treballs aconsellen un període d'entre 4 i 8 setmanes [86,126]. Com a complement a la dieta, també s'ha proposat la possibilitat d'assajar l'efecte del tractament amb antihistamínics sobre la simptomatologia, encara que la seva utilitat un cop es retira la histamina procedent dels aliments no està del tot clara [33,86].

Un cop s'ha pogut establir que la histamina alimentària és responsable del desenvolupament de símptomes associats a aquesta intolerància, el diagnòstic d'aquest desordre està pràcticament confirmat [127]. En aquest punt, existeixen un ventall de proves complementàries no validades que han sigut proposades per diversos autors amb la finalitat d'obtenir un marcador que permeti confirmar-ne el diagnòstic [126]. De totes elles, la determinació de l'activitat DAO en plasma és la



que ha estat més estudiada i és, possiblement, també la més controvertida. Aquesta prova analítica consisteix en mesurar la quantitat d'histamina que és capaç de degradar una mostra de sang en un interval de temps determinat, i es pot abordar a través de dos tipus de kits comercials actualment disponibles al mercat, un consistent en un immunoassaig tipus ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) i l'altre en un radioimmunoassaig que utilitza putrescina marcada radioactivament [104,120]. L'evidència sobre la validesa de la mesura de l'activitat DAO en sang per al diagnòstic de la intolerància a la histamina no és abundant ni conclouent en cap sentit. Existeixen estudis que afirmen que la determinació de l'activitat DAO sanguínia pot ser d'ajuda per identificar subjectes amb simptomatologia associada a la intolerància a la histamina [92,104,120]. Aquest és el cas, per exemple, dels treballs de Mušič i col. i Manzotti i col. prèviament mencionats, que van emprar la determinació de l'activitat DAO plasmàtica per confirmar el diagnòstic de pacients amb símptomes de la intolerància a la histamina [104,120]. En canvi, altres estudis no van trobar una relació significativa entre l'historial clínic de pacients amb símptomes relacionats amb la intolerància a la histamina i els valors d'activitat DAO en sang [105,128,129]. Concretament, aquests treballs desaconsellen aquesta tècnica com a eina diagnòstica en la pràctica clínica rutinària fins que es desenvolupin estudis clínics que permetin validar-ne l'eficàcia [105,128,129]. A més, el treball realitzat per Schnoor i col. va alertar també d'una elevada variabilitat inter-assaig en els valors d'activitat de DAO que feia impossible la correcta classificació dels subjectes intolerants a la histamina [129]. Aquesta controvèrsia és, precisament, la que descriu l'article conjunt publicat l'any 2017 per les societats d'al·lèrgologia alemanya i suïssa que emfatitza la necessitat de seguir investigant en aquest camp abans de atorgar a l'activitat DAO plasmàtica un valor diagnòstic definitiu per a la intolerància a la histamina [126].

Alternativament, s'ha valorat emprar la mesura de l'activitat DAO a nivell intestinal a partir d'una biòpsia de colon obtinguda a través d'endoscòpia com un possible marcador de rellevància diagnòstica [130–132]. En aquest camp, certs treballs han mostrat una reduïda activitat intestinal de l'enzim DAO en pacients amb urticària, al·lèrgia alimentària i en persones amb adenoma de colon, acompanyada d'un augment en els nivells d'histamina [130–134]. Malgrat aquesta prova presenta un interessant potencial diagnòstic, són necessaris més estudis que en validin la

significació clínica i la relació amb els símptomes de la intolerància a la histamina [126].

Alguns autors han estudiat també la validesa d'efectuar un test de provocació amb histamina com a eina diagnòstica de la intolerància a la histamina que, a més, permetria establir el llindar de tolerància individual [86,126]. Aquesta prova consisteix en un test doble cec i control amb placebo administrant histamina per via oral i requereix supervisió mèdica i hospitalització del pacient [89,92]. Un cas concret és l'estudi desenvolupat per Wöhrl i col. on es va observar que la meitat dels voluntaris sans van desenvolupar símptomes com a conseqüència de l'administració d'una solució que contenia 75 mg d'histamina [77]. Contràriament, Komericki i col. van realitzar un estudi multicèntric on es va demostrar la manca de fiabilitat de la provocació oral amb la mateixa dosi d'histamina a l'hora de diagnosticar la intolerància a la histamina per falta de reproductibilitat dels símptomes apareguts després de dues repeticions consecutives del test de provocació [100]. A més, la possibilitat de patir efectes adversos greus i l'absència d'una dosi d'histamina estandarditzada i un procediment degudament establert fan que l'aplicació i estudi d'aquesta aproximació siguin encara limitats [121].

Per altra banda, Kofler i col. van proposar l'ús d'una variant de la prova d'al·lèrgia cutània intradèrmica anomenada *histamine 50-skin-prick test* per al diagnòstic de d'aquesta intolerància [135]. Aquesta tècnica consistia en efectuar la lectura d'aquesta prova d'al·lèrgia cutània passats 50 minuts (el temps habitual és de 20 minuts) i va demostrar que, malgrat la mida de la fava (*wheal*) no diferia entre intolerants a la histamina i el grup control, sí que s'observaven importants diferències pel que fa al temps de resolució d'aquesta fava en funció del grup d'estudi. Els pacients amb símptomes d'intolerància a la histamina van mostrar una remissió més tardana de la fava ocasionada per l'administració cutània d'histamina com a signe d'una reduïda capacitat de degradar aquest compost [135]. Els mateixos resultats s'han observat en un estudi recentment publicat per Wagner i col. que ha avaluat de nou aquesta prova cutània com a test discriminatori de la intolerància a la histamina obtenint, a més, una correlació entre el retard en la recuperació de la fava i una menor activitat DAO plasmàtica [136].

Finalment, durant els darrers anys s'estan esmerçant esforços per tal d'identificar un marcador no invasiu que permeti establir un criteri diagnòstic sòlid i clínicament irrefutable de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO. En aquest sentit, la determinació de polimorfismes genètics (SNPs) que caracteritzin la població genèticament susceptible a la histamina, així com la identificació de biomarcadors del metabolisme de la histamina en orina, són algunes de les estratègies actualment plantejades [46,86,106].

### 2.3.3. Abordatge clínic de la intolerància a la histamina

Actualment, la principal estratègia per evitar els símptomes de la intolerància a la histamina és el seguiment d'una dieta baixa en histamina [86]. Més recentment, la suplementació exògena amb enzim DAO s'ha postulat com un tractament complementari que pretén potenciar la capacitat de degradar la histamina procedent dels aliments en individus intolerants que presenten un dèficit d'aquest enzim a nivell intestinal [137].

#### 2.3.3.1. Dieta baixa en histamina

La dieta baixa en histamina, també coneguda com a dieta lliure d'histamina (*free-histamine diet*), ha sigut proposada com a principal estratègia de tractament preventiu de la intolerància a la histamina [20]. Conceptualment, aquestes dietes exclouen un seguit d'aliments que els pacients relacionen amb l'aparició de símptomes, principalment aquells que poden contenir nivells elevats d'aquesta amina (Figura 10) [138]. No obstant això, i com s'ha mencionat anteriorment, la histamina es troba àmpliament distribuïda en les diferents categories d'aliments i en concentracions molt variables, ja que múltiples factors influeixen en la seva acumulació [138,139]. En aliments frescos com el peix i la carn, i en alguns dels seus derivats, la seva presència es deu a una manca de frescor o una inadequada qualitat higiènica de les matèries primeres i/o processos d'elaboració. Per aquest motiu, en el marc d'una dieta baixa en histamina es poden consumir carn i peix sempre i quan la seva frescor estigui assegurada [138]. En canvi, els productes fermentats són sistemàticament exclosos d'aquestes dietes, ja que la probabilitat de trobar-hi histamina és elevada. Altres aliments com els espinacs, l'albergínia i els tomàquets també han d'evitar-se perquè freqüentment contenen histamina.

### Aliments que cal evitar en el marc d'una dieta baixa en histamina

Làctics: formatge curat i semi-curat, formatge ratllat i llet

Peix: peix blau, les seves conserves i semiconserves i marisc

Càrnics: derivats crus-curats/fermentats

Ous

Llegums: llenties, cigrons, soja i derivats fermentats de la soja

Verdures: espinacs, tomàquet, col fermentada, albergínia, alvocat i xampinyons

Fruites: cítrics, maduixa, plàtan, kiwi, pinya, pruna i fruits secs

Xocolata

Begudes alcohòliques: vi i cervesa

- 
- Els exclouen >60% de les dietes descrites
  - Els exclouen el 20-60% de les dietes descrites
  - Els exclouen <20% de les dietes descrites

Figura 10. Exclusió d'aliments en el marc d'una dieta baixa en histamina. Adaptat de [138].

Per altra banda, hi ha certs aliments que, a priori, no contenen histamina però que els pacients els associen amb l'aparició de símptomes. En aquest cas, la presència d'altres amines biògenes que també son substrat de l'enzim DAO, com ara la putrescina i la cadaverina, pot explicar l'exclusió de certs aliments, ja que quantitats rellevants d'aquestes amines biògenes podrien actuar com a agents inhibidors de la degradació intestinal d'histamina per competència enzimàtica amb la DAO [1,20,33,41,140]. Els elevats nivells de putrescina en cítrics, xampinyons, soja, plàtans i fruits secs poden ser els responsables de l'aparició de símptomes derivats del seu consum [20]. En la mateixa línia, els aliments que contenen alts continguts de les poliamines espermidina i espermina, que, en certa mesura, també poden ser metabolitzades per la DAO, serien igualment susceptibles de desencadenar manifestacions clíniques [20]. Per últim, en aquestes dietes també s'eliminen certs aliments sense histamina i amb concentracions massa baixes d'altres amines i poliamines com per justificar-ne l'exclusió. És el cas, per exemple, de la papaia, el kiwi, les maduixes, la pinya i la pruna, aliment que certs autors els han descrit com a alliberadors d'histamina endògena, encara que el mecanisme pel qual desenvolupen la seva acció encara no ha sigut elucidat [3,22,138].

Amb tot això, és evident que les recomanacions en el marc d'una dieta baixa en histamina esdevenen altament restrictives, atesa la gran quantitat d'aliments

implicats. A més, la variabilitat en els nivells d'histamina i la falta de recomanacions de referència, fa que resulti complicat per als dietistes emetre recomanacions de consens i transmetre informació pràctica als pacients [139]. Malgrat això, l'eficàcia de la dieta baixa en histamina ha sigut demostrada en estudis clínics amb resultats favorables pel que fa a la millora o remissió total de símptomes freqüentment associats a la intolerància a la histamina i al dèficit de DAO (Taula 3) [45,94,143–145,101,104,121,122,124,125,141,142]. Com mostra la taula 3, al llarg de les darreres tres dècades s'han desenvolupat diversos estudis clínics centrats en avaluar l'efecte del seguiment d'una dieta baixa en histamina en l'evolució de diversos símptomes, principalment afeccions dermatològiques, gastrointestinals i neurològiques, i en alguns casos la seva combinació. Malgrat la major part dels estudis involucren un grup reduït de pacients (valor mig de 38 pacients per estudi, essent 10 pacients el mínim i 157 pacients el màxim), els treballs publicats mostren una taxa d'eficàcia de la dieta baixa en histamina que oscil·la entre el 33% i el 100%. Concretament, 10 dels 13 estudis revisats reporten la millora de la simptomatologia en més del 50% dels pacients que han seguit aquesta dieta; 2 estudis mostren percentatges d'èxit inferiors al 50% (concretament, 33% i 46%) i hi ha un únic estudi que no recull cap efecte beneficiós atribuïble al seguiment d'aquesta dieta (Taula 3). Els símptomes dermatològics centren la major part dels estudis, que fonamentalment involucren pacients amb urticària crònica idiopàtica, dermatitis atòpica i èczema [94,101,121,122,141,143,145]. En aquest àmbit, una recent revisió bibliogràfica va examinar un total de 1.668 pacients amb urticària crònica sotmesos a diferents dietes d'eliminació, entre les quals la dieta baixa en histamina, la dieta lliure de pseudoal·lèrgens (i.e. conservants i colorants artificials presents en aliments processats i compostos aromàtics de certs productes naturals) o la dieta d'exclusió de peix [146]. En global, el seguiment de qualsevol dieta excloent va suposar la remissió total o parcial de símptomes en un 4,9% i 37,5% dels pacients, respectivament, essent la dieta baixa en histamina amb una durada mitja de 3 setmanes la que va proporcionar una de les majors taxes de remissió [146,147]. A banda dels resultats ambiciosos d'aquesta pauta dietètica en el tractament d'afectacions dermatològiques, les organitzacions científiques de dermatologia encara consideren la dieta baixa en histamina d'utilitat controvertida a l'espera de disposar d'estudis clínics aleatoritzats amb un disseny doble cec i controlats amb placebo que n'avalin l'eficàcia [148].

Pel que fa a la durada del tractament dietètic, generalment és de 3-4 setmanes, i no s'aprecia una relació positiva entre una major durada i el percentatge d'èxit en la remissió de símptomes (Taula 3). Tanmateix, alguns dels estudis avaluen paral·lelament l'efecte de la dieta sobre altres variables, com ara els nivells d'histamina plasmàtica o l'activitat enzimàtica DAO en plasma [94,101,121,125,141,144]. Per ambdós variables, els resultats obtinguts entre els diferents estudis són incongruents, pel que són necessaris més estudis per tal de poder extreure'n conclusions.

Taula 3. Estudis clínics sobre l'eficàcia d'una dieta baixa en histamina en el tractament de símptomes de la intolerància a la histamina.

Disseny i variables d'estudi	Nombre de pacients i simptomatologia	Durada de la dieta	Percentatge de pacients que mostren millora en les variables d'estudi	Ref.
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia	28 pacients amb cefalea crònica i 17 amb altres símptomes dermatològics i respiratoris	4 setmanes	68% reducció de la cefalea crònica i 82% reducció d'altres símptomes	142
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia, nivells plasmàtics d'histamina i activitat DAO	10 pacients amb urticària crònica idiopàtica i 19 individus control	3 setmanes	100% reducció de símptomes, 100% reducció d'histamina plasmàtica i absència de modificació de l'activitat DAO	94
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia, nivells plasmàtics d'histamina i activitat DAO	35 pacients amb cefalea i altres símptomes (urticària, arrítmia, diarrea i asma)	4 setmanes	77% reducció de símptomes, 73% augment activitat DAO i absència de modificació de la histamina plasmàtica	125
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia i l'activitat DAO en 5 dels pacients	17 pacients amb déficit de DAO, èczema atòpic i altres símptomes (cefalea, rubor i símptomes gastrointestinals)	2 setmanes	100% reducció de símptomes i 60% (tres de cinc) augment de l'activitat DAO	101
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia i l'ús d'antihistamínics	13 pacients amb urticària crònica idiopàtica i 35 pacients control (sense dieta)	4 setmanes	Absència de millora en la simptomatologia ni en l'ús d'antihistamínics	145
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia	36 pacients amb dermatitis atòpica i 19 individus control	2 setmanes	33% reducció de símptomes	122
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia i de l'activitat DAO	20 pacients amb déficit de DAO i símptomes dermatològics, gastrointestinals i respiratoris	6-12 mesos	100% reducció de símptomes i 100% augment de l'activitat DAO	104
Estudi retrospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia	16 pacients pediàtrics amb dolor abdominal difús, diarrea, cefalea, vòmit i erupció cutània	4 setmanes	100% reducció de símptomes	45
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia	16 pacients pediàtrics amb dolor abdominal crònic i déficit de DAO	4 setmanes	88% reducció de símptomes	124
Estudi retrospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia	157 pacients amb urticària crònica idiopàtica	4 setmanes	46% reducció de símptomes	143
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia i de l'activitat DAO	56 pacients amb urticària crònica idiopàtica i símptomes gastrointestinals	3 setmanes	75% reducció de símptomes i absència de modificació de l'activitat DAO	121
Estudi prospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia, nivells plasmàtics d'histamina i activitat DAO	22 pacients amb urticària crònica idiopàtica	4 setmanes	100% reducció de símptomes, 100% reducció d'histamina plasmàtica i absència de modificació de l'activitat DAO	141
Estudi retrospectiu amb avaluació de l'evolució de la simptomatologia i de l'activitat DAO	63 pacients amb símptomes gastrointestinals	7-18 mesos	79% reducció de símptomes i 52% augment de l'activitat DAO	144



### 2.3.3.2. Suplementació exògena d'enzim DAO

L'any 1929, Charles H. Best va identificar un enzim en mostres de teixit pulmonar en estat d'autòlisi al qual va anomenar histaminasa per la seva capacitat de degradar histamina [149]. Anys després, i atenent la seva capacitat per degradar també altres diamines, com ja s'ha descrit anteriorment, es va proposar la denominació més ampla DAO per anomenar-lo més acuradament [150,151]. Més enllà del seu rol en humans pel que fa a la degradació d'histamina a nivell intestinal, l'enzim DAO és també present en microorganismes, plantes i animals, on igualment catalitza la desaminació oxidativa del grup amino primari de la histamina al seu corresponent aldehid, donant lloc de forma concomitant a quantitats estequiomètriques d'amoniac i peròxid d'hidrogen (figura 11) [38,39,41,140,152,153].



Figura 11. Desaminació oxidativa de la histamina per l'enzim DAO.

En homologia al tractament actual per a la intolerància a la lactosa, s'ha proposat la possibilitat d'efectuar una suplementació oral amb enzim DAO exogen amb l'objectiu d'ajudar a degradar la histamina procedent de la dieta i millorar la qualitat de vida de les persones intolerants [22,154]. El fet d'aportar capacitat enzimàtica histaminasa permetria complementar la capacitat DAO intestinal i facilitaria el seguiment d'una dieta més laxa, permetent incorporar aliments amb una dosi d'histamina tolerable [33]. En aquest context, la Comissió Europea va donar llum verda a la comercialització d'aquest complement enzimàtic en l'actualització de la llista oficial de nous aliments (*novel foods*) de l'any 2017 en forma de complement alimentós i d'aliment per a usos mèdics especials destinats al maneig dietètic de pacients amb dèficit de DAO [155]. Específicament, la normativa europea autoritza la formulació d'extracte proteic de ronyó de porc encapsulat amb recobriment entèric per tal d'assegurar-ne la integritat en el seu pas per l'entorn gàstric [155].

La presència d'enzim DAO en ronyó porcí ha sigut àmpliament estudiada i, des de l'any 1942, existeix una patent als Estats Units d'Amèrica que descriu l'obtenció d'aquest enzim a través d'un tractament combinat d'extracció amb acetona i el posterior assecatge en condicions controlades que proporciona un concentrat proteic amb un 7% d'enzim DAO [156,157]. Actualment, ja existeixen diversos complements d'enzim DAO disponibles al mercat, tant a nivell nacional com internacional, tots ells amb la mateixa dosi unitària d'enzim DAO procedent de ronyó porcí (4,2 mg d'extracte de ronyó porcí per càpsula que contenen 0,3 mg d'enzim DAO) (Figura 12).

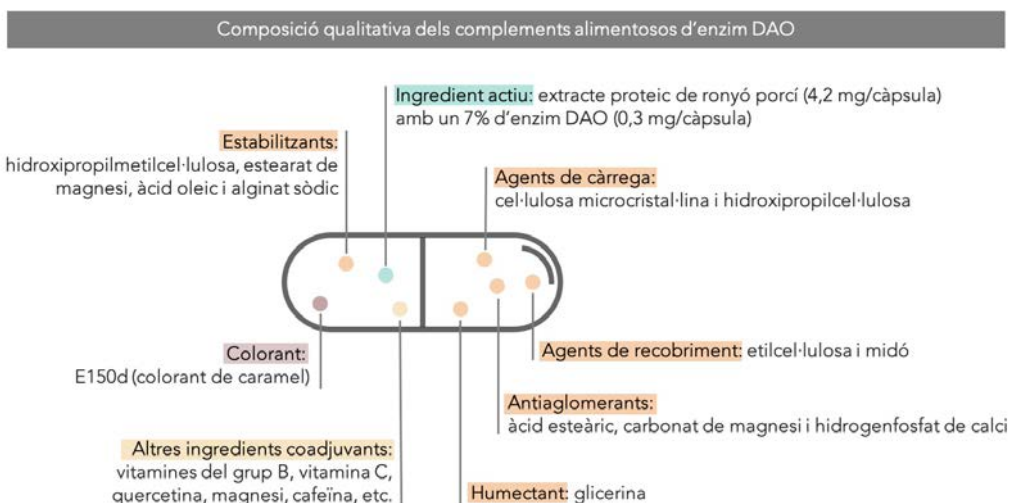


Figura 12. Exemple de composició qualitativa d'un complement alimentós d'enzim DAO.

Pel que fa a la seva eficàcia clínica, fins al moment existeixen únicament 5 estudis clínics descrits en la literatura (4 d'ells publicats en els últims 5 anys) que han assajat la intervenció a través de la suplementació amb enzim DAO exogen en pacients amb símptomes relacionats amb la intolerància a la histamina [100,120,137,158,159]. El més recent és l'estudi pilot d'intervenció desenvolupat per Schnedl i col. fa escassos mesos, que va avaluar l'efecte de la suplementació oral d'enzim DAO en 28 pacients amb símptomes gastrointestinals, cardiovasculars, respiratoris i dermatològics associats a la intolerància a la histamina [137]. Durant 4 setmanes, els pacients van rebre tres dosis diàries d'un dels complements de DAO

actualment disponibles al mercat, sense efectuar cap modificació en la seva dieta habitual, mostrant una reducció significativa dels 22 símptomes registrats, així com de la seva intensitat. Els autors també van reportar una reversió d'aquest efecte protector durant el període de seguiment posterior (4 setmanes) en absència de la suplementació enzimàtica. A més, l'avaluació de l'activitat DAO plasmàtica al llarg de l'estudi va permetre determinar-ne un lleuger augment derivat de la suplementació que els autors van vincular a una possible millora en la integritat de la mucosa intestinal [137].

Encara que amb certa variabilitat, els treballs disponibles apunten l'eficàcia dels complements de DAO en la millora de la simptomatologia, tant pel que fa a la seva presència com en la intensitat de la seva manifestació. Tanmateix, i malgrat els resultats optimistes, és imprescindible el disseny de futurs estudis clínics ambiciosos que presentin un rigorós disseny experimental, períodes més extensos de tractament i una mostra correctament dimensionada per tal de poder establir l'eficàcia clínica d'aquest tractament.

# 3 OBJECTIUS



### 3. OBJECTIUS

Durant els darrers anys, la intolerància a la histamina ha esdevingut un tema d'interès creixent, tant per a la societat com per a la comunitat científica. Tot i això, actualment encara es requereixen esforços en la investigació per tal d'aportar nova evidència científica que ajudi a definir i a gestionar clínicament aquesta intolerància.

En aquest context, aquesta tesi doctoral planteja com a objectiu general **aprofundir en el coneixement de la intolerància a la histamina, així com en el desenvolupament de noves estratègies per al seu diagnòstic i control.**

Concretament, per assolir aquest objectiu general es plantegen diferents àmbits d'estudi amb els seus corresponents objectius específics:

#### **Àmbit 1: Risc associat al consum d'histamina**

Objectiu 1. Avaluar probabilísticament el risc de patir efectes adversos per a la salut associat al consum d'un aliment potencialment ric en histamina i altres amines tant en la població sana com intolerant.

#### **Àmbit 2: Relació entre la intolerància a la histamina i el dèficit de DAO**

Objectiu 2. Estimar la prevalença de dèficit de DAO en la població que pateix símptomes associats a la intolerància a la histamina.

#### **Àmbit 3: Biomarcadors de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO com a nova eina diagnòstica**

Objectiu 3. Desenvolupar i validar un mètode analític per a la determinació d'histamina i els seus metabòlits en orina.

Objectiu 4. Estudiar el perfil d'eliminació d'histamina i metilhistamina en orina per a l'eventual caracterització de persones intolerants a la histamina.

**Àmbit 4: Enzim DAO exogen com a tractament preventiu de la intolerància a la histamina**

Objectiu 5. Desenvolupar un mètode que permeti la determinació *in vitro* de la capacitat de degradar histamina de diverses matrius.

Objectiu 6. Contribuir al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí.

Objectiu 7. Cercar noves fonts d'enzim DAO: potencial dels llegums com a nova font d'enzim DAO per al tractament de la intolerància a la histamina.

# 4 RESULTATS





## 4. RESULTATS

Aquesta secció s'organitza en quatre apartats, atenent els diversos àmbits d'estudi plantejats en els objectius de la tesi doctoral. Els resultats de la tesi doctoral es troben recollits en un total de vuit publicacions, incloent un capítol de llibre d'accés obert i set articles científics publicats en revistes indexades a la base de dades bibliogràfica *Science Citation Index* (SCI). La tesi també inclou una sol·licitud de patent presentada a l'Oficina Espanyola de Patents i Marques (OEPM).

Cada article es presenta precedit per un breu resum que en sintetitza els objectius, la metodologia i els principals resultats obtinguts; i destaca les contribucions més rellevants que se'n poden extreure. Tanmateix, per alguns dels àmbits, l'experimentació descrita als articles científics es complementa amb resultats pendents de publicació o dades obtingudes a partir de l'aplicació de la metodologia desenvolupada.



## ÀMBIT 1

# Risc associat al consum d'histamina

### OBJECTIU 1.

Avaluar probabilísticament el risc de patir efectes adversos per a la salut associat al consum d'un aliment potencialment ric en histamina i altres amines tant en la població sana com intolerant.



4.1. Avaluació probabilística del risc de patir efectes adversos per a la salut associat al consum d'un aliment potencialment ric en histamina i altres amines tant en la població sana com intolerant

## PUBLICACIÓ 2

**Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population**

M. Luz Latorre-Moratalla, **Oriol Comas-Basté**, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou

*Food and Chemical Toxicology*, 2017, 99, 78-85.

Índex d'impacte (JCR 2017): 3,977

Posició en l'àrea "Food Science and Technology": D1 (10/131)

## COMUNICACIÓ ESCRITA 1

M. Luz Latorre-Moratalla, **Oriol Comas-Basté**, Sònia Sánchez-Pérez, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou. **Evaluación del riesgo de efectos adversos de histamina y tiramina por el consumo de embutidos fermentados en grupos sensibles de la población española**. *XII Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2016, Antequera.

## PLANTEJAMENT I OBJECTIU

La histamina és una de les principals amines bioactives causant d'efectes adversos per a la salut dels consumidors, tant a la població sana, en el cas de la ingesta de continguts inusualment elevats d'aquesta amina (intoxicació per histamina), com a persones sensibles amb una reduïda capacitat per degradar-la (intolerància a la histamina). Els derivats carnis fermentats crus curats són susceptibles d'acumular nivells elevats d'histamina com a conseqüència d'una activitat microbiana procedent de l'alteració del producte i/o dels microorganismes responsables de la fermentació. Els derivats carnis fermentats són àmpliament consumits al nostre entorn, ja sigui com a *snack* o com a ingredient d'un dels plats principals.

La determinació de l'exposició de la població a un perill específic és un dels punts claus per tal d'avaluar-ne el risc real d'aparició d'efectes adversos. En aquest sentit, fins al moment s'han realitzat poques avaluacions per estimar el risc que comporta

la ingesta d'histamina dels aliments i cap amb un enfocament que permeti obtenir nivells d'exposició probabilístics.

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'exposició dels consumidors espanyols a histamina derivada del consum de derivats carnis fermentats crus curats a través d'una estimació probabilística i determinar el risc de patir efectes adversos que es deriva d'aquesta exposició tant en persones sanes com per a la població sensible.

## METODOLOGIA

Els continguts d'histamina en embotits es van obtenir de la base de dades actualitzada del grup de recerca, considerant un total de 474 mostres procedents del mercat espanyol, concretament llonganissa ( $n = 357$ ), xoriço ( $n = 87$ ), salami ( $n = 18$ ) i sobrassada ( $n = 12$ ). Les dades de consum d'embotits per part de la població espanyola es van obtenir de l'Enquesta Nacional d'Ingesta Dietètica Espanyola (ENIDE) elaborada l'any 2011 per l'Agència Espanyola de Consum, Seguretat Alimentària i Nutrició (AECOSAN). Els models estadístics que millor s'ajustaren a les distribucions del contingut d'histamina en embotits i del seu consum (test de bondat d'ajustament khi quadrat de Pearson) van ser emprats com a input per a l'avaluació de l'exposició a aquest compost utilitzant la tècnica de simulació estocàstica de Montecarlo amb 10.000 iteracions (@Risk 7.0, Palisade Corporation, NewField, NY).

## RESULTATS

Un 66% de les mostres d'embotits del mercat espanyol van presentar histamina. La concentració d'aquesta amina oscil·lava entre valors per sota del nivell de detecció ( $<0.01$  mg/kg) fins als 474,8 mg/kg. Malgrat aquesta ampla variabilitat, el 95% de les mostres (percentil-95) no superaven els 143 mg/kg d'histamina (model de distribució beta general). Generalment, la presència de nivells elevats d'histamina anava acompanyada amb concentracions també altes d'altres amines bioactives, com ara tiramina, putrescina i cadaverina. Encara que no es van trobar diferències estadístiques entre els diferents tipus de producte ( $p > 0,05$ ), el xoriço va ser l'embotit amb un contingut mig més elevat d'histamina. Per últim, tampoc es va

observar una relació estadística entre el contingut d'histamina i l'any d'anàlisi de les mostres.

Les dades de consum d'embotits per la població espanyola van mostrar també una ampla variabilitat i s'ajustaren a un model de distribució gamma, amb valors que oscil·laven entre els 2 g/àpat fins a més de 250 g/àpat.

La distribució probabilística de l'exposició de la població espanyola a histamina derivada del consum d'embotits s'ajustà a un model de distribució normal logarítmica (log-normal), amb un valor mig de 1,39 ( $\pm 3,2$ ) mg/àpat. Malgrat aquesta exposició mostrava un valor màxim de 45,8 mg/àpat, únicament el 5% dels àpats resultaven en nivells d'ingesta superiors a 6,8 mg d'histamina. El risc de patir efectes adversos aguts (intoxicació) vinculats a la ingesta d'histamina procedent dels embotits fou molt baix per a persones sanes. De fet, en el 95% dels escenaris d'exposició possibles s'efectuava una ingesta d'histamina inferior al 30% del límit segur d'histamina proposat per l'EFSA (25 mg/àpat) i únicament en un escenari de màxima exposició es sobrepassaria aquest nivell segur. La situació esdevé completament diferent per a la població intolerant a la histamina, per a la qual únicament aliments amb nivells d'histamina inferiors als límits de detecció poden considerar-se segurs. En aquest sentit, es va estimar que un 0,7% de la població espanyola podria patir símptomes d'intolerància a la histamina com a conseqüència del consum d'embotits.

Els percentatges de risc es podrien veure augmentats si es considerés l'exposició a histamina derivada de la dieta total, així com si es tingués en compte l'efecte inhibidor sobre la degradació d'histamina que desenvolupen certes substàncies concomitants en l'aliment.

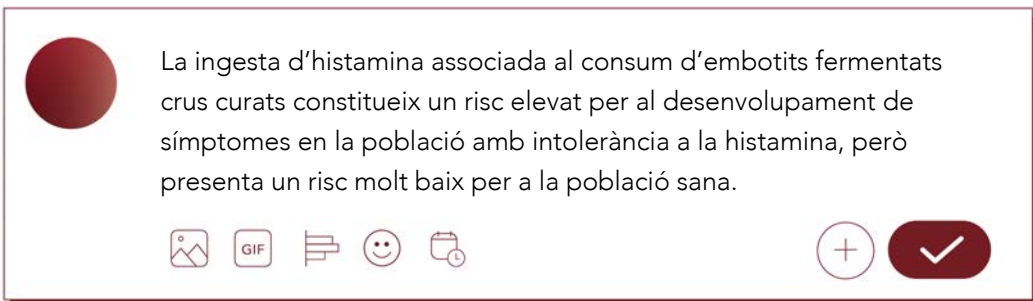
## **APORTACIONS MÉS RELLEVANTS**

- S'ha realitzat per primer cop una avaluació del risc de patir efectes adversos derivats de la ingesta d'histamina mitjançant una aproximació probabilística considerant dades representatives tant del contingut d'histamina en embotits del mercat espanyol com del consum real que la població efectua d'aquests aliments.



- Es determina que el risc per a la població sana és generalment baix però s'identifica un subgrup poblacional (pràcticament 7.000 casos per milió d'habitants) susceptible de patir els símptomes de la intolerància a la histamina com a conseqüència del consum d'embotits fermentats.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



La ingesta d'histamina associada al consum d'embotits fermentats crus curats constitueix un risc elevat per al desenvolupament de símptomes en la població amb intolerància a la histamina, però presenta un risc molt baix per a la població sana.



Contents lists available at ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population

M.L. Latorre-Moratalla<sup>a</sup>, O. Comas-Basté<sup>a</sup>, S. Bover-Cid<sup>b</sup>, M.C. Vidal-Carou<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, XaRTA, INSA, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda Prat de la Riba, 171; E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain<sup>b</sup> IRTA-Food Safety Programme, Institute for Food and Agricultural Research and Technology, Finca Camps i Armet s/n, E-17121 Monells, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 September 2016

Received in revised form

10 November 2016

Accepted 12 November 2016

Available online 14 November 2016

## Keywords:

Tyramine

Histamine

Dry fermented sausages

Risk assessment

Histamine intolerance

Bioactive amines

## ABSTRACT

Tyramine and histamine are the main dietary bioactive amines related to acute adverse health effects. Dry fermented sausages can easily accumulate high levels of these hazards and are frequently consumed in Spain. The present work aims to assess the exposure to tyramine and histamine from the consumption of dry fermented sausages by the Spanish population and to assess the risk to suffer acute health effects from this exposure. A probabilistic estimation of the exposure to these hazards was derived combining probability distributions of these amines in dry fermented sausages ( $n = 474$ ) and their consumption by the Spanish population. The mean dietary exposure to tyramine and histamine was 6.2 and 1.39 mg/meal, respectively. The risk of suffering hypertensive crisis or histamine intoxication by healthy population due to tyramine or histamine intake, respectively, exclusively from dry fermented sausages, can be considered negligible. For individuals under treatment with MAOI drugs, the probability to surpass the safe threshold dose (6 mg/meal) was estimated as 34%. For patients with histamine intolerance, even the presence of this amine in food is not tolerable and it could be estimated that 7000 individuals per million could be at risk to suffer the related symptoms after consuming dry fermented sausages.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bioactive amines are microbial metabolites, which can be found in nearly all types of foods in a wide and variable range of concentrations, even within the same type of product. Fermented food and beverages, such as dry fermented sausages, constitute one of the food products that can accumulate high amine contents, which are formed by the decarboxylation of precursor amino acids by fermentative microorganisms as well as by spoilage microorganisms (EFSA, 2011; Bover-Cid et al., 2014). In the last decades, hygienic improvements at all stages of the food chain along with other specific recommendations, such as the use of starter cultures lacking amino acid-decarboxylase potential, might have contributed to reduce the levels of these compounds in fermented meat products. However, data on biogenic amine content in dry fermented sausages on the Spanish market indicate that there are still many products that contain high levels of amines (Latorre-Moratalla et al., 2012a). In fact, different Member States of EU at

the EFSA Network Meeting on Microbiological Risk Assessment informed about an increase of bioactive amine content in some fermented foods (EFSA, 2011). Therefore, the presence of these compounds in fermented foods could be still of concern from the food safety point of view (Leuschner et al., 2013). Dry fermented sausages are the most consumed fermented products in Spain, either as a snack or part of a main dish.

Tyramine and histamine are the main dietary bioactive amines associated with adverse health effects. Adverse health effects can occur both in case of high intake of these amines or when the ability to metabolize them is compromised by different causes (including enzymatic deficiencies due to genetic or physiological circumstances or enzymatic blockage). Under these circumstances they accumulate in plasma and exert bioactive effects (Maintz and Novak, 2007; Ladero et al., 2010; Kovacova-Hanuszkova et al., 2015). Tyramine may increase blood pressure, especially if its exposure coincides with the antidepressant monoamine oxidase inhibitors (MAOI) drugs (Paulsen et al., 2012; Vidal-Carou et al., 2014). Histamine intoxication, formerly called scombroid or histamine fish poisoning, is caused by the ingestion of high concentrations of this amine, so that normal metabolic mechanisms are insufficient for

\* Corresponding author.

E-mail address: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu) (M.C. Vidal-Carou).

their detoxification. The symptoms associated with this intoxication are allergy-like, characterized by neurological and gastrointestinal effects such as headaches, nausea, vomiting, diarrhea, by cutaneous pruritus, flush and urticaria, and by rhinorrhea and hypotension. The severity of the disorders related to both tyramine and histamine exposure is variable, but it may be considered mild since only sometimes require medical attention. The frequent misdiagnosis is reported as the main reason accounting for the poor statistics about the incidence of health disorders due to dietary amines (FAO/WHO, 2013).

Furthermore, the onset of symptoms related to histamine accumulation in blood has also been associated with a wide range of foods with relatively low histamine content. This is known as histamine intolerance, which derives from the insufficient activity of histamine detoxification systems, concretely a deficiency of DAO enzyme by genetic, pathological (e.g. inflammatory bowel diseases) or pharmacological blockade caused by the treatment with common drugs with known DAO inhibiting side effects (acetylcysteine, clavulanic acid and metoclopramide, etc.) (Jarisch, 2004; Maintz and Novak, 2007). Although the symptoms of histamine intolerance are similar to those of intoxication, some authors associate DAO deficiency with some diseases of high prevalence in the population, such as migraine, atopic dermatitis, irritable bowel syndrome, cyclic vomiting syndrome, and muscular pain (Guida et al., 2000; Maintz and Novak, 2007; Vidal-Carou et al., 2010; Izquierdo et al., 2012; Rosell-Camps et al., 2013; Tormo, 2013; Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

The exposure assessment of any specific hazard is a key point on the risk assessment and data quality and treatment could have a significant impact on the risk estimation (FAO/WHO, 2013). Although the quantitative risk assessment is currently recognized as the relevant scientific approach to assess food safety and to provide scientific criteria for decision making in risk management and development of mitigation strategies, only few assessments have been performed regarding bioactive amines in food. Mainly, these assessments dealt with histamine in fish and fishery products (Lehane & Olley, 2000; Sumner and Ross, 2002; FAO/WHO, 2013), and also tyramine, histamine, putrescine and/or cadaverine in fermented foods based on Austrian data (Rauscher-Gabernig et al., 2009, 2012; Paulsen et al., 2012; Rauscher-Gabernig et al., 2012) and EU data (EFSA, 2011). The deterministic calculations (i.e. point estimates) of the bioactive amine exposure used in most of the above mentioned studies, did not provide exposure level probability. However, a stochastic approach would provide a more representative exposure assessment and hence, a more realistic risk assessment. Therefore, the current work aims to assess the exposure of Spanish consumers to tyramine and histamine from dry fermented sausages by means of a probabilistic estimation, and to quantify until which extend such exposure contributes to reach the maximum tolerable levels generally recognised as safe.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Data on tyramine and histamine contents in dry fermented sausages from the spanish market

Data about contents of tyramine and histamine in dry fermented sausages from retail Spanish market were obtained from the database of our own research group (Vidal-Carou et al., 1990; Hernández-Jover et al., 1997; Bover-Cid et al., 1999; Miguelez-Arriazo et al., 2006; Latorre-Moratalla et al., 2008, 2012a). A total of 474 samples of different kinds of dry fermented sausages were considered: *Salchichón* (n = 357), *chorizo* (n = 87), *salami* (n = 18) and *sobrasada* (n = 12). All these products are manufactured by fermentation and ripening from pork meat and fat with other

additional ingredients (e.g. pepper or red pepper, sugar, wine, garlic, preservatives, etc.) with or without the addition of starter cultures. The determination of bioactive amines in all samples was performed by ion-pair HPLC or UHPLC methods coupled to fluorescence detection (Hernández-Jover et al., 1996; Lavizzari et al., 2006; Latorre-Moratalla et al., 2009).

### 2.2. Data on consumption of dry fermented sausages by Spanish population

Data about consumption of dry fermented sausages was extracted from the Spanish national dietary survey (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética) carried out by the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN, 2011). This survey includes a sample of 3000 individuals randomly selected within the Spanish population, 1500 men and 1500 women aged between 18 and 64 years old. Consumption data (i.e. serving size) of the selected food categories (*salchichón*, *chorizo*, *salami* and *sobrasada*) were expressed in grams. As the toxic effects of tyramine and histamine are of acute nature, the intake was calculated on a meal basis (i.e. grams per meal per person). Only the meals where dry fermented sausages were consumed were considered.

### 2.3. Exposure assessment

Various probability distributions were fitted to tyramine and histamine contents of Spanish dry fermented sausages and consumption data collected from Spanish population using @Risk 7.0 (Palisade Corporation, NewField, NY). The goodness of fit was evaluated using the Chi-square ( $\chi^2$ ) test. The best-fitting distributions describing tyramine or histamine contents and dry fermented sausage consumption were selected as an input for the assessment of the exposure to these compounds by the probabilistic estimation using the Monte Carlo simulation technique with 10,000 iterations.

### 2.4. Hazard characterization

The maximum tolerable safety levels as an approximation of the no adverse health effect level adopted in the EFSA Scientific Opinion (EFSA, 2011) for different types of population were considered. These threshold limits were obtained from studies published in the literature based on toxicological data of dietary amines, clinical studies with volunteers, clinical cases and other expert opinions about tolerance or intoxication levels. For tyramine the thresholds were: 6 mg/meal/person for patients treated with MAOI drugs, 50 mg/meal/person for patients receiving third generation of MAOI drugs, so called RIMA (reversible inhibitors of MAO-A); and 600 mg/meal/person for healthy individuals. For histamine, the safe threshold considered for healthy population was 25 mg/meal/person as the most conservative level. In the case of patients with histamine intolerance, even small amounts of this amine in food may cause adverse effects, so as the EFSA (2011) stated, "only levels below detectable limits can be considered as safe".

To quantify the contribution of the exposure to tyramine and histamine from dry fermented sausages to reach the maximum tolerable levels for healthy and sensitive population a ratio between the exposure level and those thresholds was calculated.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Distribution of tyramine and histamine contents in dry fermented sausages from the Spanish market

Fig. 1 shows the distribution of tyramine contents (mg/kg) in

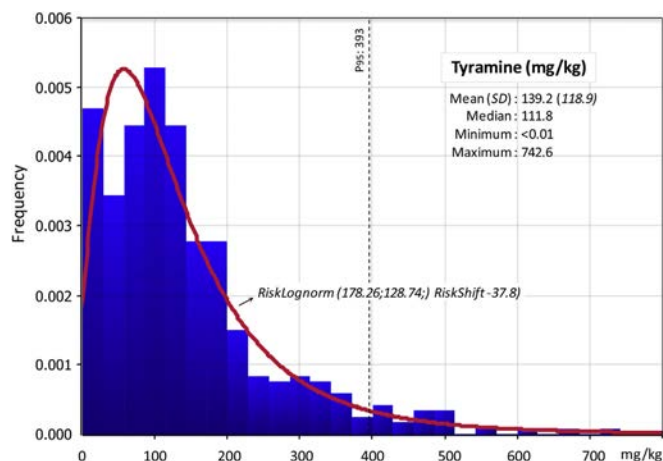


Fig. 1. Distribution of tyramine contents (mg/kg) in Spanish dry fermented sausages.

retail Spanish dry fermented sausages. Tyramine was the most frequent and abundant bioactive amine found in retail dry fermented sausages (detected in the 99.5% of samples) following a *lognormal* distribution with the parameter estimates shown in Table 1. The mean value was 139 mg/kg (relative standard deviation, RSD of 86%) and the range was from not detected (<0.01 mg/kg) to 742 mg/kg, though 95% of samples did not exceed 400 mg/kg. No significant differences were found among contents of tyramine depending on the type of sausage ( $p > 0.05$ ), neither no significant trend was found when assessing tyramine contents as a function of years. Tyramine is extensively reported as the main bioactive amine found in dry fermented sausages, in which is usually produced by fermentative microbial population, mainly lactic acid bacteria (LAB) and more rarely coagulase negative staphylococci (Aymerich et al., 2006; Talon and Leroy, 2011; Latorre-Moratalla et al., 2012b). Latorre-Moratalla et al. (2010) reported that 48% of LAB and 13% of staphylococci isolated from spontaneously dry fermented sausage are able to decarboxylate tyrosine to form tyramine. Likewise some strains of spoilage microbiota have also been described as strongly tyraminogenic (Latorre-Moratalla et al., 2012b).

The occurrence of histamine in retail Spanish dry fermented sausages was less frequent (in the 66% of samples) and usually at lower levels than tyramine. Histamine contents followed a *beta general* distribution (Table 1). The mean value was 27 mg/kg (RSD of 215%) and the 95-percentile 143 mg/kg (Fig. 2). Among samples containing histamine, 57% did not exceed 10 mg/kg. In some particular samples, high histamine contents were found, reaching 475 mg/kg generally accompanied by high amounts of other bioactive amines, such as tyramine, putrescine and cadaverine (data not shown). *Chorizo* sausage showed the highest histamine levels, although the mean value was not statically different when compared with the other products ( $p > 0.05$ ). As in the case of tyramine, histamine contents were not significantly different according to the year of analysis. Some strains of a reduced number of enterobacteria or LAB have the capability to produce histamine in dry fermented sausages. However, the presence of these specific bacteria in this kind of food is not very common unless specific contaminations occur (Roig-Sagués et al., 1996; Bover-Cid et al., 2001). Therefore, high contents of this amine in dry fermented sausages are usually considered as a hygienic indicator of poor

Table 1

Distributions used as inputs for the exposure assessment model and the resulting outputs for dietary exposure of consumers to tyramine and histamine.

	Distributional assumption <sup>a</sup>
Inputs	
Tyramine contents (mg/kg)	Log Normal (178.26 <sup>b</sup> ; 128.74 <sup>c</sup> ; shift [-37.832])
Histamine contents (mg/kg)	Beta General (0.19 <sup>d</sup> ; 10.79 <sup>e</sup> ; 0.01 <sup>f</sup> ; 1510.4 <sup>g</sup> )
Consumption (g/serving size)	Gamma (1.97 <sup>h</sup> ; 22.1 <sup>i</sup> ; shift [1.90])
Outputs	
Exposure of tyramine (mg/meal)	Pearson5 (2.70 <sup>b</sup> ; 14.75 <sup>i</sup> ; Shift [-2.4])
Exposure of histamine (mg/meal)	Log Normal (6.77; 304.2; Shift [-0.000005])

<sup>a</sup> Probability distributions best fitting available data (lowest  $\chi^2$  according to @risk).

<sup>b</sup> Mean.

<sup>c</sup> Standard deviation.

<sup>d</sup>  $\alpha_1$ .

<sup>e</sup>  $\alpha_2$ .

<sup>f</sup> Minimum.

<sup>g</sup> Maximum.

<sup>h</sup> Shape  $\alpha$ .

<sup>i</sup> Scale  $\beta$ .

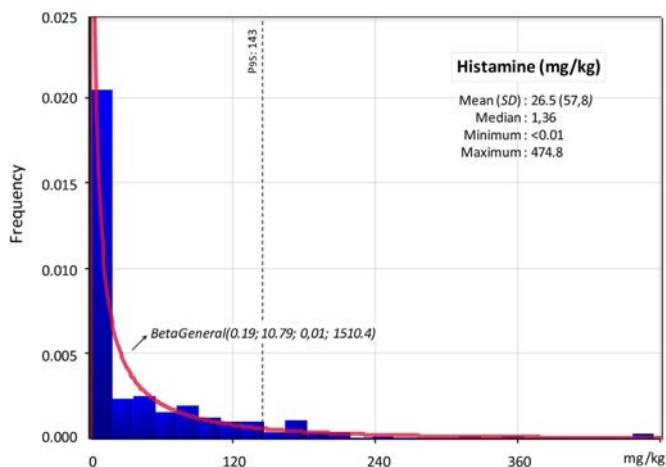


Fig. 2. Distribution of histamine contents (mg/kg) in Spanish dry fermented sausages.

microbiological quality of raw materials and/or improper manufacturing processes.

The large variability of tyramine and histamine contents observed in retail Spanish dry fermented sausages could be explained by multiple factors such as the microbiological quality of raw materials, which varies in each production batch; ingredients and additives (sugar, curing agents, spices, etc.). Additionally, diameter of sausage and technological ripening conditions (temperature and relative humidity) can also influence the phenomena associated with aminogenesis, including microbial growth, acidification, proteolysis and activity of decarboxylases (Suzzi and Gardini, 2003; Spano et al., 2010; Singh et al., 2012). Therefore, the probabilistic exposure assessment from data about biogenic amine in retail products becomes the most suitable approach to

capture and deal with the actual variability of the occurrence of these hazards.

### 3.2. Distribution of the consumption of dry fermented sausages

According to the last extensive national dietary survey performed in Spain (AECOSAN, 2011) a wide variability in the amount of sausage consumption was recorded, ranging from 2 to more than 250 g/meal. The mean consumption was 45 g/meal (RSD of 73%) and the 95-percentile 100 g/meal (Fig. 3). Consumption data described a *gamma* distribution (Table 1). According to this survey, the 19% of meals contain some kind of dry fermented sausages as starter, main dish or snack, although the serving size changed in each case. Concretely, the product most often consumed is *chorizo*

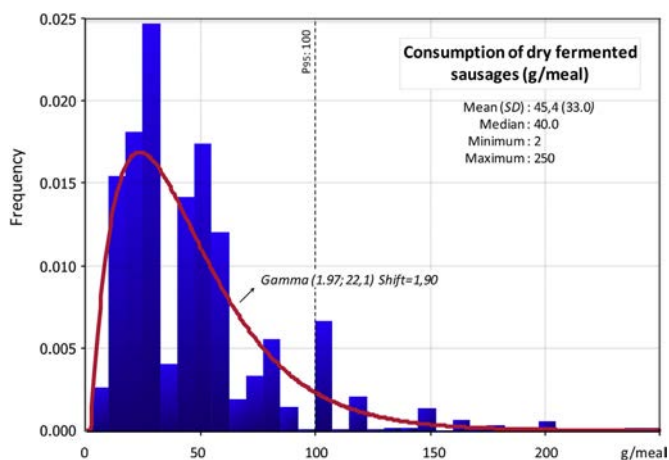


Fig. 3. Distribution of dry fermented sausage consumption by the Spanish population (g/meal).

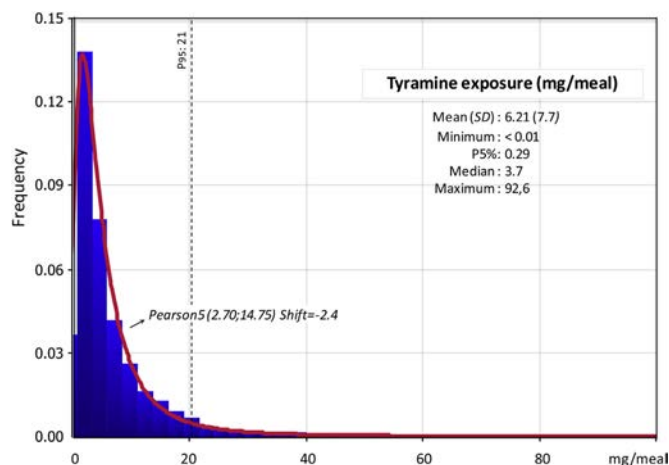


Fig. 4. Results of tyramine exposure (mg/meal) from dry fermented sausages by the Spanish population.

(about once a week) with a mean value of 42 g/meal/person. *Salchichón* sausages type is consumed less frequently (about once every 3 weeks) but in higher amounts (mean of 52 g/meal). *Sobrasada* and *salami* are more sporadically consumed but in similar amounts to *salchichón*. No statistically significant differences were detected in consumption according to age or gender of consumers.

### 3.3. Exposure assessment and hazard characterization of tyramine

The outputs of the probabilistic exposure assessment for tyramine performed by combining probability distributions of tyramine contents and sausages consumption are shown in Fig. 4.

The exposure to tyramine from dry fermented sausages followed a *Pearson5* distribution (Table 1). The mean value for tyramine exposure was 6.2 mg/meal (RSD of 124%). In the 95% of meals involving dry fermented sausages, the exposure to tyramine was below 21 mg, whereas the maximum level was 93 mg/meal.

In the assessment carried out by EFSA, tyramine exposure data on dry fermented sausages from Spain is not available and only a total European 95-percentile was reported, ranging from 17.2 to 99.3 mg/day, depending on the country (EFSA, 2011). Also considering the high level exposure (95-percentile) to tyramine of the Spanish population (21 mg/meal), this data is placed in the lower European range determined by the EFSA. This lower intake of tyramine per meal could be attributed to lower serving size of these products by the Spanish population in comparison with other EU countries, as the occurrence of tyramine in Spanish dry fermented sausages is similar in both assessments.

Table 2 shows the contribution of the exposure to tyramine from Spanish dry fermented sausages to achieve the maximum tolerable levels for healthy population and for vulnerable population under treatment with MAOI or RIMA drugs. The quantification was performed by different exposure estimations: mean, 95-percentile and maximum values. On the basis of the results obtained regarding the tyramine exposure, the risk of suffering a hypertensive crisis by the healthy population was negligible. In fact, even if it is considered a high tyramine exposure (95-percentile and maximum) only a 4 and 16% of the maximum tolerable amount (600 mg/meal) was reached,

respectively. Although this contribution is apparently low, it must be taken into account that meals may also contain other food with variable bioactive amine levels (e.g. cheese, wine, etc.). The assessment of the overall exposure to tyramine by the multiple sources of this bioactive amine remains unknown.

In the case of people under treatment with RIMA drugs, the 95-percentile of exposure of tyramine (21 mg/meal) meant the 42% of the maximum tolerable level. The probability to reach an exposure of 50 mg of tyramine in a meal was very low (0.01%) and only this threshold limit was exceeded with the maximum value of tyramine exposure (92.5 mg/meal). The situation is different in those individuals treated with MAOI drugs, in which the mean exposure to tyramine by the consumption of sausages already exceeded the safe dose (6 mg/meal). According to the tyramine exposure output, the probability to surpass this tolerable exposure level per meal was estimated to be 34%.

According to the last report on antidepressant drug consumption by the Spanish population published by the Spanish Agency on Medicinal Products, the only MAOI and RIMA drugs used for the treatment of depression are tranylcypromine and moclobemide. Nowadays, up to 0.001% of the Spanish population is receiving a daily dose of these drugs, being used only as an alternative therapy in depressive patients resistant to more frequently used antidepressants (AEMPS, 2015). In view of this data and taking into

Table 2

Contribution (%) of the tyramine exposure from dry fermented sausages by the Spanish population to achieve the maximum tolerable levels generally adopted as safe by EFSA for the healthy population and for vulnerable people under treatment with RIMA (reversible inhibitor of monoamine oxidase A) or MAOI (monoamine oxidase inhibitor) drugs.<sup>a</sup>

Tyramine exposure (mg/meal)	Contribution (%)		
	Healthy population	RIMA patients	MAOI patients
Mean	6.2	1	103
95-Percentile	21	4	350
Maximum	92.5	16	1540

<sup>a</sup> 600 mg/meal for healthy population, 50 mg/meal for patients treated with RIMA drugs and 6 mg/meal for patients treated with MAOI drugs.

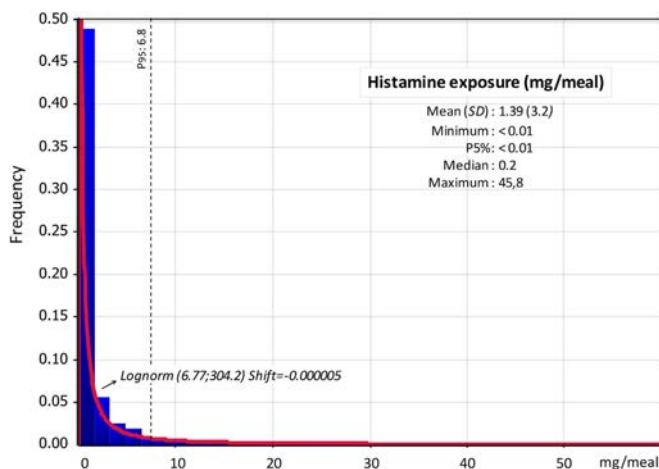


Fig. 5. Results of histamine exposure (mg/meal) from dry fermented sausages by the Spanish population.

account that approximately 46 million people in Spain are potential consumers of dry fermented sausages (i.e. total Spanish population excluding the 1.5% reported as not consumers of meat products according to ENIDE survey), 3 individuals per million (i.e. 156 individuals) would be daily exposed to a level of tyramine above the maximum tolerable threshold when taking MAOI drugs. However patients prescribed with MAOI and RIMA are usually advised to limit or avoid the consumption of dry fermented sausages. Therefore, as MAOI treated individuals could have consumption-patterns different from the data used in the present assessment (from mostly non MAOI treated people), the actual exposure to tyramine of this vulnerable population will be most probably lower than the above estimation.

### 3.4. Exposure assessment and risk characterization of histamine

The outputs of the probabilistic exposure assessment for histamine performed by combining probability distributions of histamine contents and sausages consumption are shown in Fig. 5. Levels of exposure to histamine from the consumption of dry fermented sausages followed a *lognormal* distribution (Table 1) with a mean value of 1.39 mg/meal (RSD of 228%). Only 5% of meals resulted in histamine intake levels higher than 6.8 mg. As in the case of tyramine, in the European exposure assessment histamine exposure data specifically for Spain is not available. The total European 95-percentile reported for histamine exposure in these type of products was from 6.4 to 37.1 mg/day, depending on the country (EFSA, 2011). Spanish exposure levels obtained in the present assessment are clearly placed within the lower interval, which could be explained, as in the case of tyramine, by the lower consumption of these products by the Spanish population in comparison with those reported for the European population.

Table 3 shows the contribution (percentage) of the exposure to histamine from dry fermented sausages to achieve the maximum tolerable level adopted for preventing histamine intoxication (25 mg/meal). Considering the mean exposure, only the 6% of the critical threshold was reached, and even considering 95-percentile of the exposure less than the 30% of this limit was reached. Based on the present results, the risk to suffer acute effects related to

histamine by the consumption of Spanish dry fermented sausages is really low, since only in very rare occasions (maximum exposure value) the threshold was nearly doubled.

An additional concern associated with the occurrence of histamine in food is for people suffering from histamine intolerance, in which even the presence of this amine at very low levels is considered to be capable of triggering adverse effects. This intolerance related to a deficiency in the metabolism of histamine due to the lack of specific enzymes, what produces its accumulation in plasma and the appearance of multi-faced clinical symptoms. For this reason, for individuals with histamine intolerance only food with levels of this amine below detectable limit could be considered as safe (EFSA, 2011). Moreover, it should be taken into account that the occurrence of dietary potentiators, such as other bioactive amines or alcohol and its metabolite acetaldehyde, could also increase or enhance the susceptibility to histamine and, accordingly, the risk of adverse reactions could rise (Maintz and Novak, 2007). In the dry fermented sausages from the Spanish market considered in this study, the 66% contained histamine, and very frequently accompanied with other potentiate bioactive amines such as putrescine and cadaverine.

Some studies estimate that histamine intolerance may affect 1% of the general population (Maintz and Novak, 2007; Kovacova-Hanuszkova et al., 2015). However, the increasingly widespread

Table 3

Contribution (%) of the histamine exposure from dry fermented sausages by the Spanish population to achieve the maximum tolerable levels generally adopted as safe by EFSA for the healthy population (histamine intoxication) and for histamine intolerance<sup>a</sup>.

Histamine exposure (mg/meal)	Contribution (%)	
	Healthy population	Histamine intolerance patients <sup>b</sup>
Mean	1.4	6
95-Percentile	6.8	27
Maximum	45.8	183

<sup>a</sup> 25 mg/meal for healthy population.

<sup>b</sup> According to EFSA, for people with histamine intolerance even small amounts of histamine may cause adverse health effects and no maximum tolerable threshold has been adopted. Therefore, no contribution has been calculated.

diagnosis of histamine intolerance by DAO deficiency could augment this population percentage. In fact, it has been published recently more evidence about the relationship between a reduced capacity to metabolize dietary histamine by a deficit of DAO and health problems such as migraine, gastrointestinal disorders, skin reactions and muscle pain, among others (Guida et al., 2000; Vidal-Carou et al., 2010; Izquierdo et al., 2012; Rosell-Camps et al., 2013; Tormo, 2013). Some recent interventional studies have shown a high incidence rate of DAO deficiency (up to 80%) among this type of susceptible population (Izquierdo et al., 2012; Rosell-Camps et al., 2013). In addition, it should be considered that histamine intolerance can be a consequence of inhibition of DAO activity as a side effect caused by a number of commonly used drugs, including acetylcysteine, clavulanic acid, metoclopramide, verapamil, isoniazid, etc. (Maintz and Novak, 2007; Kovacova-Hanuszkova et al., 2015). Indeed, it was estimated that approximately 20% of the European population could be taking some of the DAO inhibitor drugs (EFSA, 2011).

Considering that 46 million people in Spain are potential consumers of dry fermented sausages and that the histamine intolerance could affect at least the 1% of the population and taking into account the estimation that the 66% of retail dry fermented sausages contained histamine (percentage obtained in the present study), it could be expected that the 0.7% of Spanish population (303,600 individuals) may suffer some of the related symptomatology after the consumption of dry fermented sausages. Moreover, it should be taken into account the existence of other potential sources of histamine, such as cheese, fish or fish products, fermented beverages and some vegetables, that are fairly widespread making the risk of suffering this intolerance higher.

#### 4. Conclusions

A reliable estimation of exposure has been achieved through the probabilistic assessment from representative Spanish data of amine contents and consumption of dry fermented sausages, in which the actual distribution of the content of the hazard and the mathematical function describing the probability of occurrence of every value is described. According to this probabilistic estimation, tyramine and histamine intake would hardly contribute to reach their maximum tolerable threshold for healthy individuals. However, sensitive people treated with MAOI drugs or with histamine intolerance by deficit of DAO would be at risk of suffering adverse effects due to the consumption of dry fermented sausages. Concretely, the maximum tolerable limit established for patients under MAOI treatment (6mg/meal) was exceeded in the 34% of meals containing dry fermented sausages. Therefore, it could be estimated that 3 habitants per million of the Spanish population could suffer adverse health effects due to the exposure to tyramine from dry fermented sausages and the concomitant consumption of MAOI drugs. This estimated risk is very low compared with that found for individuals with histamine intolerance, which rises up to practically 7000 cases per million habitants.

Due to the estimated risk of suffering adverse effects attributed to histamine in food, it seems important that food industry accepts the challenge to proceed with measures focussed on the minimization of the occurrence of histamine in food. This implies to control the potentially aminogenic microorganisms, its growth and its amino acid-decarboxylase activity during the whole production and merchandising chain. Moreover, the statement of tyramine and histamine content in food labelling would be another additional measure to prevent the occurrence of the related adverse effects of those bioactive amines in sensitive individuals, especially for histamine intolerant individuals. Additional studies are needed to estimate the maximum level of histamine and eventually other

amines in food to provide histamine intolerant patients with clearly labelled products.

#### Acknowledgments

Authors would like to thank the Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya (2014-01438 SGR) for their support and the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) through the Project AGL- AGL 2012-39995. Authors also thank the Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición-AECOSAN (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad) for the ENIDE survey data.

#### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.011>.

#### References

- AECOSAN (Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición) (2011). ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española).
- AEMPS (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios) (2015). Informe de utilización de medicamentos U/A/D/V1/14012015.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 100, 40–49.
- Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 1999. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 51, 305–311.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 185–189.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2014. Biogenic amines. In: Motarjemi, Y., Moy, G.G., Todd, E.C.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety*, vol. 2. Elsevier Inc, Amsterdam, pp. 381–391.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* 9 (10), 2393.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2013. Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products (Meeting report).
- Guida, B., De Martino, C., De Martino, S., Tritto, G., Patella, V., Trio, R., D'Agostino, C., Pecoraro, P., D'Agostino, L., 2000. Histamine plasma levels and elimination diet in chronic idiopathic urticaria. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 155–158.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 1996. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2710–2715.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 1997. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2098–2102.
- Izquierdo, J., Soler, I., Balaguer, E., Mon, D., 2012. Déficit de Diaminoxidasa como desencadenante de la migraña. *Rev. Neurol.* 55, 177.
- Jarisch, R. (2004). *Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit (Histamine intolerance. Histamine and motion sickness)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., Plevkova, J., 2015. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia Immunopathol.* 43, 498–506.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M., Alvarez, M.A., 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6, 145–156.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2009. Validation of an Ultra High Pressure Liquid Chromatographic (UHPLC) method for the determination of biologically active amines in food. *J. Chromatogr. A* 1216, 7715–7720.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., Lauková, A., Vidal-Carou, M.C., 2010. Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures. *J. Food Prot.* 73, 524–525.
- Latorre-Moratalla, M.L., Margarida, I., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2012a. Aminas biogénas en embutidos fermentados crudos-cuadros listos para el consumo. 5th International Congress Own-Checks and Food Safety, Barcelona.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2012b. Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Front. Food Microbiol.* 3, 1–9.
- Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Garriga, M.,



- Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., Drosinos, E.H., Lauková, A., Talon, R., Vidal-Carou, M.C., 2008. Biogenic amine in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chem.* 107, 912–921.
- Lavizzari, T., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 2006. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1129, 67–72.
- Leuschner, R., Hristova, A., Robinson, T., Hugas, M., 2013. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food. *J. Food Compos. Analysis* 29, 37–42.
- Lehane, L., Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 1–37.
- Maintz, L., Novak, N., 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185–1196.
- Migueluez-Arrizado, M.J., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Vidal-Carou, M.C., 2006. Biogenic amine in Spanish fermented sausages as a function of diameter and artisanal or industrial origin. *J. Sci. Food Agric.* 88, 549–557.
- Paulsen, P., Grossgut, R., Bauer, F., Rauscher-Gabernig, E., 2012. Estimates of maximum tolerable levels of tyramine content in foods in Austria. *J. Food Nutr. Res.* 51, 52–59.
- Rauscher-Gabernig, E., Grossgut, R., Bauer, F., Paulsen, P., 2009. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food control.* 20, 423–429.
- Rauscher-Gabernig, E., Gabernig, R., Brueller, W., Grossgut, R., Bauer, F., Paulsen, P., 2012. Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 209–220.
- Roig-Sagués, A., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E., Rodríguez-Jerez, J., Mora-Ventura, M., 1996. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened salchichón, a Spanish cured sausage. *J. Food Prot.* 59, 516–520.
- Rosell-Camps, A., Zibetti, S., Perez-Esteban, G., Vila-Vidal, M., Ramis, L., Garcia, T., 2013. Histamine intolerance as a cause of chronic digestive complaints in pediatric patients. *Rev. Española enfermedades Dig.* 105, 201–207.
- Singh, V.P., Pathak, V., Verma, A.K., 2012. Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—a review. *Am. J. Food Technol.* 7, 278–288.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Alvarez, M., Fernandez, M., Lopez, P., Barcelo, P., Corbi, A., Lolkema, J.S., 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 95–100.
- Sumner, J., Ross, T., 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 55–59.
- Suzzi, G., Gardini, F., 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 41–54.
- Talon, R., Leroy, S., 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentation. *Meat Sci.* 89, 303–309.
- Tormo, R. (2013). Dietary treatment and blood diaminoxidase (DAO) values in patients affected vomiting and other gastrointestinal and neurological symptoms, Congress of the European Society for parenteral and Enteral Nutrition (ESPEN) and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism, Germany.
- Vidal-Carou, M. C., Izquierdo-Pulido, M., Martín, M., & Mariné-Font, A. (1990). Histamina y tiramina en derivados cárnicos, Revisión de Agroquímica y Tecnología Alimentaria, 30, 101–108. histamine intolerance; al., 2006. tiramina en derivados de carne de cerdo y de origen artesanal o industrial. *Journal of Science o.*
- Vidal-Carou, M. C., Titus, F., & Guayta-Escobias, R. (2010). Evaluación del déficit de diaminoxidasa en pacientes con migraña (Estudio MigraDAO). *Jornada Internacional de Sensibilización sobre la migraña.*
- Vidal-Carou, M.C., Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., 2014. Biogenic amines. In: Nollt, M.L., Todrà, F. (Eds.), *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 665–686.





## 4.2. Estimació de la prevalença de dèficit de DAO en la població que pateix símptomes associats a la intolerància a la histamina

### PUBLICACIÓ 3

#### Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine

Joan Izquierdo-Casas, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, M. Carmen Vidal-Carou, Luis Soler-Singla  
*Journal of Physiology and Biochemistry*, 2018, 74, 93-99.

Índex d'impacte (JCR 2018): 2,523

Posició en l'àrea "Physiology": Q2 (38/81)

### COMUNICACIÓ ESCRITA 2

M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Joan Izquierdo-Casas, Luis Soler-Singla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, M. Carmen Vidal-Carou. **Actividad diaminooxidasa (DAO) sérica en pacientes migrañosos. XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)**, 2016, Santiago de Compostela.

### PLANTEJAMENT I OBJECTIU

D'entre l'ampli ventall de símptomes associats a la intolerància a la histamina, les cefalees són probablement un dels més freqüentment reportats i, alhora, amb un major impacte sobre la qualitat de vida, ja que limiten dràsticament el desenvolupament normal d'activitats quotidianes. L'elevació dels nivells plasmàtics d'histamina s'ha reportat com un possible agent responsable de l'aparició de cefalees, que provocaria l'alliberació d'àcid nítric a través de la estimulació dels receptors de la histamina localitzats a les artèries intracranials. Així doncs, un dèficit de DAO, enzim responsable de la degradació d'histamina en l'organisme, podria potencialment esdevenir un dels factors desencadenants d'aquesta patologia neurològica. De fet, existeixen diversos estudis que han demostrat una relació entre alguns dels símptomes de la intolerància a la histamina, principalment afectacions dermatològiques i gastrointestinals, i una reduïda activitat DAO a nivell plasmàtic.

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar la prevalença del dèficit de DAO en pacients amb un diagnòstic confirmat de migranya episòdica.

## METODOLOGIA

L'estudi va involucrar un total de 198 voluntaris adults reclutats a la Unitat de Cefalees de l'Hospital General de Catalunya: 137 pacients que complien el diagnòstic de migranya episòdica (segons criteris establerts per la *International Headache Society*, IHS) i 61 individus com a grup control. L'activitat DAO plasmàtica es va determinar en mostres de sang recol·lectades en dejú a través d'un test ELISA (D-HIT, Sciotec, Àustria) en un laboratori d'anàlisis clínics especialitzat. Segons aquest mètode, valors d'activitat DAO inferiors a 80 HDU/mL (unitats degradadores d'histamina/mL) són indicadors d'un dèficit de DAO.

## RESULTATS

Un 87% dels pacients diagnosticats de migranya van presentar un dèficit en l'activitat DAO a nivell plasmàtic, mentre que en el grup control aquesta prevalença fou del 44%. Malgrat els pacients migranyosos eren majoritàriament dones, el percentatge de dèficit de DAO en dones i en homes va ser molt similar (83% i 90%, respectivament).

L'activitat DAO plasmàtica de les persones amb migranya va mostrar un valor mig ( $64,5 \pm 33,5$  HDU/mL) significativament inferior que en la població control ( $91,9 \pm 44,3$  HDU/mL) ( $p < 0,0001$ ). La variabilitat observada en els nivells d'activitat DAO entre els individus del grup control va ser marcadament més elevada que entre els pacients. De fet, l'amplitud interquartílica (IQR, diferència entre el percentil-75 i el percentil-25 que representa estadísticament el 50% dels casos) va ser més de tres vegades superior en el grup control (58,7 HDU/mL) que per als pacients amb migranya (17,6 HDU/mL).

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS

- S'ha observat una elevada prevalença de dèficit de DAO plasmàtic en pacients amb migranya (87%) en comparació amb la població no migranyosa
- El 44% de la població no migranyosa va mostrar dèficit de DAO plasmàtic. Es podria hipotetitzar que aquests individus, encara que amb absència de

migranya, podrien presentar altres símptomes de la intolerància a la histamina que no van ser considerats en aquest estudi.

- L'elevada variabilitat observada en els valors d'activitat DAO plasmàtica fa palesa la necessitat de realitzar futurs estudis per determinar-ne adequadament el valor de tall (*cut-off value*) adequat per al diagnòstic del dèficit de DAO.

### L'ARTICLE EN UN TUIT



La majoria dels pacients diagnosticats amb migranya episòdica presenten un dèficit en l'activitat plasmàtica de l'enzim DAO.







## Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine

Joan Izquierdo-Casas<sup>1,2</sup> · Oriol Comas-Basté<sup>3</sup> · M. Luz Latorre-Moratalla<sup>3</sup> · Marian Lorente-Gascón<sup>2</sup> · Adriana Duelo<sup>4</sup> · M. Carmen Vidal-Carou<sup>3</sup> · Luis Soler-Singla<sup>1,2</sup>

Received: 27 January 2017 / Accepted: 2 June 2017 / Published online: 17 June 2017  
© University of Navarra 2017

**Abstract** Histamine intolerance is a disorder in the homeostasis of histamine due to a reduced intestinal degradation of this amine, mainly caused by a deficiency in the enzyme diamine oxidase (DAO). Among the several multi-faced symptoms associated with histamine intolerance, headache is one of the most recognized and disabling consequences. The aim of this study was to determine the prevalence of DAO deficiency in patients with a confirmed migraine diagnosis according to the current International Headache Society (IHS) and in non-migraine subjects. DAO activity was assessed in a total of 198 volunteers recruited at the Headache Unit of the Hospital General de Catalunya, 137 in the migraine group and 61 as a control group. DAO enzyme activity in blood samples was determined by ELISA test. Values below 80 HDU/ml (Histamine Degrading Unit/ml) were considered as DAO deficient. Mean value of DAO activity from migraine population ( $64.5 \pm 33.5$  HDU/ml) was significantly lower ( $p < 0.0001$ ) than that obtained from

healthy volunteers ( $91.9 \pm 44.3$  HDU/ml). DAO deficiency was more prevalent in migraine patients than in the control group. A high incidence rate of DAO deficiency (87%) was observed in the group of patients with migraine. On the other hand, 44% of non-migrainous subjects had levels of DAO activity lower than 80 HDU/ml. Despite the multifactorial aetiology of migraine, these results seem to indicate that this enzymatic deficit could be related to the onset of migraine.

**Keywords** Headache · Migraine · Histamine · Diamine oxidase (DAO) · Histamine intolerance

### Introduction

Diamine oxidase (DAO), also called histaminase, is one of the main enzymes in the metabolism of histamine, playing an important role in the degradation of this amine in the intestinal epithelium, regulating its passage into the systemic circulation. A reduced DAO activity could be one of the causes of histamine intolerance, a disorder in the homeostasis of histamine, which provokes the accumulation of this amine in plasma and the appearance of multi-faced allergy-like clinical symptoms. DAO deficiency may be the result of a genetic mutation [1, 7] or related to certain diseases that limit the secretion of this enzyme, especially inflammatory or degenerative intestinal disorders [9, 15]. Finally, certain medications can also cause a specific and reversible inhibition of DAO activity [14, 17].

Unlike the well-known histamine intoxication, appearing after consumption of products with high histamine contents, histamine intolerance symptoms may appear even after the intake of low amounts of this amine [5]. Consequently, the dietary management is the main clinical tool to prevent the symptomatology related to histamine intolerance, based on the follow up of histamine-free diets [3, 24, 29, 30]. Apart

This article forms part of a special issue of the *Journal of Physiology and Biochemistry* entitled “Impact of lifestyles patterns on human health: Integrated approach from the child to the elderly”

✉ M. Carmen Vidal-Carou  
mcvidal@ub.edu

<sup>1</sup> Department of Neurology, Hospital General de Catalunya, C/ Pere i Pons 1, 08915 Sant Cugat del Vallès, Spain

<sup>2</sup> Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, C/ Pere i Pons 1, 08915 Sant Cugat del Vallès, Spain

<sup>3</sup> Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, XaRTA, INSA, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>4</sup> Department of Nutrition, Instituto Clínico del Déficit de DAO (ICDDAO), C/ Pere i Pons 1, 08195 Sant Cugat del Vallès, Spain



from histamine, the presence of other bioactive amines, such as putrescine, could be co-responsible of the triggering of adverse health effects by competing for the same metabolic pathway [4, 14]. In addition, although there is lack of evidence about the mechanism, certain foods have been associated with an endogenous ability to release histamine, such as egg white, citrus, chocolate and crustaceans [27]. More recently, the supplementation with exogenous DAO enzyme has been postulated as a complementary preventive treatment for histamine intolerance, improving the quality of life of patients undergoing those dietary restrictions [13, 14].

Symptoms associated with the accumulation of histamine in plasma may occur due to the actions of histamine in multiple organs according to the expression of histamine receptors, including gastrointestinal tract, lung, skin, cardiovascular system and brain. Therefore, the main symptoms described for histamine intolerance are headache, flatulence, diarrhoea, abdominal pain, sneezing, rhinorrhea, hypotonia, arrhythmias, idiopathic urticaria and pruritus [14, 17]. Although there is no general consensus on histamine intolerance diagnosis, the most commonly used diagnostic algorithm includes the presentation of at least two of these symptoms and the clinical improvement after following a histamine-free diet. Negative results for food allergen-specific IgE are also required [14, 17].

Headache is one of the most recognized and disabling consequences of histamine intolerance [25, 31]. Migraine is a chronic neurovascular disorder that may be caused by several triggers (physiological, hormonal, behavioural, environmental and nutritional) as has been recently reported by Kokavec [12]. In patients diagnosed with migraine, increased plasmatic levels of histamine were reported during and among attacks [14]. According to Maintz and Novak [17], the association between headache and DAO deficit could be explained because the enzymatic deficiency would provoke an increase of plasmatic histamine that would be responsible for the appearance of headaches by releasing nitric oxide upon stimulation of HIR receptors found in intracranial arteries. In addition, a high DAO production by the placenta could potentially explain the improvement of migraine that some women experience during pregnancy [18].

Clinical studies have shown an association between a reduced DAO activity and some of the above-mentioned symptoms related to histamine intolerance. Mušič et al. [22] reported that 80% of 316 patients with suspected histamine intolerance showed a reduced serum DAO activity. Moreover, mean DAO activity levels of these patients were significantly lower than in healthy controls. Likewise, the study carried out by Manzotti et al. [19] evaluated DAO activity in 14 patients with a potential diagnosis for histamine intolerance, with the most reported symptoms being functional bloating, abdominal pain, tachycardia, diarrhoea, headache, pruritus, flushing, rhinorrhea or nausea. In this case, it was found that 71% of patients had serum DAO activity under the threshold

considered as cut-off for histamine intolerance with a mean DAO activity value significantly lower than healthy controls. Apart from these studies dealing with patients with coexisting histamine intolerance symptoms, other clinical studies have correlated DAO deficiency with some specific pathologies, mainly gastrointestinal and dermatological complaints [6, 8, 9, 16, 21, 23, 25, 26]. However, according to our knowledge, there is little information available about serum DAO levels in patients clinically diagnosed with migraine. The aim of this study was to determine the prevalence of DAO deficiency in patients with a confirmed episodic migraine diagnosis according to the current International Headache Society (IHS) and in non-migraine subjects.

## Material and methods

### Subjects of the study

The study was performed in the Headache Unit of the Hospital General de Catalunya (Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain) with a total of 198 adult volunteers aged between 18 and 65 years. Episodic migraine, as established by the IHS in the International Classification of Headache Disorders, is mainly characterized by the presence of 0 to 14 headache days per month. Two different groups were considered: a migraine group including 137 patients (122 females [89%] and 15 males [11%]) diagnosed according to current IHS criteria [10] and a control group of 61 volunteers (34 females [56%] and 27 males [44%]) without clinical criteria for migraine. For the migraine group, individuals with the onset of migraine over 50 years old, the diagnosis of other kind of headache, the possibility of pregnancy and the following of a preventive treatment for episodic migraine during 3 months prior to the study were excluded. The mean age of patients with migraine was 41.95 years ( $\pm 11.3$ ) and for control volunteers, it was 42.46 years ( $\pm 14.4$ ) (Table 1).

The Ethics Committee of the Hospital General de Catalunya approved the study, and all participants signed an informed consent form. This study is listed on the ISRCTN registry with trial ID ISRCTN10091019.

**Table 1** Information about study subjects including migraine and control groups

Characteristic	Migraine group	Control group
N	137	61
Age (mean)	41.95	42.46
Gender (%)		
Female	89	56
Male	11	44

**DAO activity analysis**

Blood samples were collected from all subjects by venipuncture in an EDTA tube after an 8-h fasting period, and samples were analysed with ELISA to determine DAO enzyme activity in accordance with the manufacturer instructions (D-HIT, Sciotec, Austria). This method was previously used for the same purpose by Mušič et al. [22]. Values above 80 HDU/ml (Histamine Degrading Unit/ml) were considered normal while values below 80 HDU/ml were considered DAO deficient. One HDU corresponds to the DAO activity that degrades 1 pmol/ml of histamine.

**Statistical analysis**

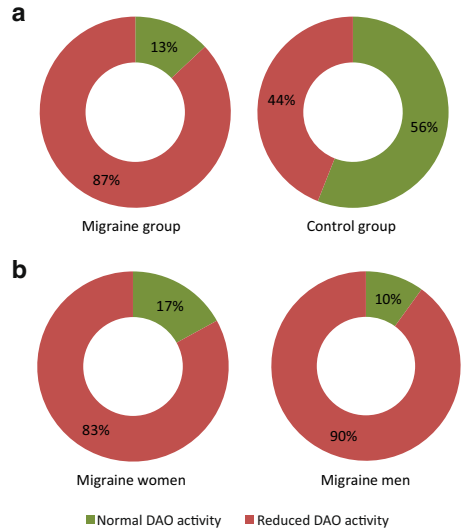
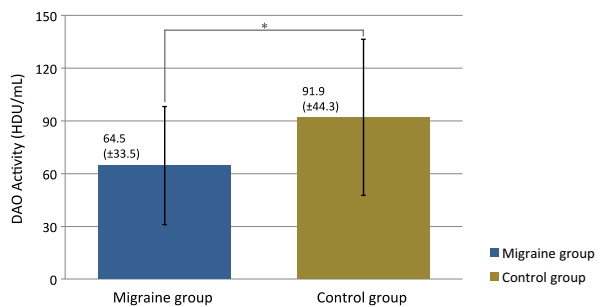
Data distribution and statistical analysis was performed using SPSS for Windows, version 22 (Chicago, IL). Data distribution was obtained using the Kolmogorv-Smirnov test. As data were not normally distributed, Mann-Whitney test was used to compare DAO activity between both groups. Probability values of  $p < 0.05$  were accepted as significant.

**Results**

The prevalence of DAO deficiency (<80 HDU/ml) assessed in migraine patients and individuals without clinical criteria for migraine as control group is shown in Fig. 1a. A high prevalence of DAO deficiency was observed in the migraine group with 87% of subjects with this enzymatic deficiency in comparison to 44% in the control group. Within the migraine group, the percentage of individuals that showed normal DAO activity levels was 13%. Figure 1b shows the proportion of DAO deficiency in the migraine group by gender. Although the number of women included in the study was higher than men, DAO deficiency was similar in both cases (86 and 90%).

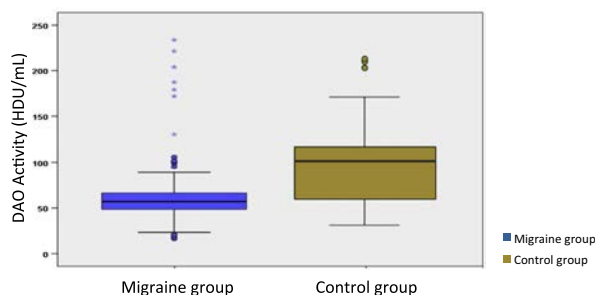
Figure 2 shows the mean DAO activity ( $\pm$ SD) obtained for both study groups. Mean DAO activity in migraine

**Fig. 2** DAO activity (mean  $\pm$  SD) in migraine patients and individuals without clinical criteria for migraine as control group. A Mann-Whitney test was applied to compare DAO activity in both groups. \* $p < 0.0001$



**Fig. 1** Percentage of individuals with deficiency (<80 HDU/ml, red) and normal (>80 HDU/ml, green) DAO activity in both study groups (a) and depending on the gender in the migraine group (b)

population was  $64.5 \pm 33.5$  HDU/ml, being significantly lower (Mann-Whitney U value = 2090.5, Wilcoxon W value = 11,001.5,  $p < 0.0001$ ) than that obtained from control volunteers ( $91.9 \pm 44.3$  HDU/ml). Additionally, Fig. 3 graphically shows the distribution of DAO activity values in both groups. It seems important to highlight that the variability of DAO activity values observed in migraine patients is low, with 50% of cases comprised from 49.5 to 67.1 HDU/ml (percentile 25 and percentile 75, respectively). However, in this group, some extremely high values, statistically considered as outliers, were recorded, reaching DAO activity values close to 250 HDU/ml. On the other hand, greater variability was found in DAO activity values from control individuals. For this group, the interquartile range, calculated as the difference between percentile 75 (118.5 HDU/ml) and percentile 25



**Fig. 3** Distribution of DAO activity in migraine patients and individuals without clinical criteria for migraine as control group. The *bottom* and *top* of the box (interquartile range) are the percentile 25 and the percentile 75, respectively. *Central line* represents the median. *Lines* extending

vertically from the boxes (*whiskers*) indicate variability outside the interquartile range. Values statistically considered as outliers are plotted as *circles* (atypical value) or *asterisks* (extremely atypical value)

(59.80 HDU/ml), was 58.7 HDU/ml, threefold higher than the interquartile range obtained for migraine group (17.6 HDU/ml). Similarly to the migraine group, some atypically high DAO activity values were found, with maximum levels up to 211 HDU/ml.

## Discussion

Headache has been reported as one of the most prevalent and disabling disturbances associated with an excess of histamine based on a deficit of DAO [17]. Back in 1993, Wantke et al. [29] described that headaches of 33 out of 45 patients decreased in frequency, duration and intensity after 4 weeks of avoiding histamine-rich foods, such as fish, cheese, hard cured sausages, pickled cabbage and alcoholic beverages. These authors hypothesised that a diminished histamine degradation based on a deficiency of DAO could be the cause of this food intolerance. Recently, a relationship between functional SNPs in the DAO gene and the risk for migraine has been proposed. García-Martín et al. [7] studied the frequency of four different genotypes and allelic variants in 197 patients with migraine and 245 healthy controls from Spain. The DAO SNP rs10156191, associated with decreased DAO enzyme activity, seemed to be more frequent in the migraine population. In the same vein, another study performed by Meza-Velázquez et al. [20] also found that a mutant DAO SNP was significantly more frequent in a group of women with migraine than in the control group. Despite that published studies seem to indicate that DAO deficit could be one of the triggers for headaches, data about serum DAO activity levels in affected populations would be important to support this association.

In this work, serum DAO activity was studied in patients diagnosed with migraine in comparison with a non-migranous population. The prevalence of DAO deficiency within migraine patients was elevated, finding that 87% of these individuals had serum DAO levels below the cut-off

value of 80 HDU/ml (Fig. 1a). DAO deficiency was not found to be higher in women (Fig. 1b) despite that several authors have associated DAO levels with some female sex hormonal changes [11, 14]. Moreover, the mean value of DAO activity in the migraine group was significantly lower than that obtained in the control group (Fig. 2). These results point out that this enzymatic deficit could be related to the onset of migraine. On the other hand, the fact that 13% of migraine patients showed normal DAO activity levels evidenced that this enzymatic deficit could be one of the triggers of migraine but not the single trigger responsible for this pathology with multifactorial aetiology.

In the control group, 44% of volunteers showed DAO enzyme deficiency but absence of migraine. As was previously mentioned, impaired intestinal histamine degradation by a deficit of DAO leads to the appearance of multi-faced clinical symptoms, which can coexist in histamine intolerants. In fact, headache is just one of the many symptoms associated with this intolerance. Unfortunately, no other symptoms were recorded in this study and therefore, it cannot be concluded that those individuals were actually asymptomatic for histamine intolerance.

It also has to be stated that DAO activity values found in the control group were more variable than those reported by migraine patients. This wide variability was also observed in the study performed by Manzotti et al. [19], which reported a larger range of DAO activity values for the cohort of healthy controls than in individuals suffering from histamine intolerance.

As in the present work, other clinical studies have been focused in the evaluation of serum DAO activity in specific pathologies (Table 2). In a previous study also focusing on neurological symptomatology, Steinbrecher and Jarisch [25] described that 23 out of 27 potential histamine-intolerant patients suffering from headache (85%) had decreased DAO levels. Furthermore, after 4 weeks of histamine-free diet, a

**Table 2** Summary of the studies that measured serum DAO activity levels in patients with generic symptoms potentially related to histamine intolerance or other specific pathologies

Reference	Pathology	Study subjects	% of DAO deficiency	DAO activity <sup>a</sup>
[22]	Generic symptoms of histamine intolerance	316 patients with clinically suspected histamine intolerance 55 healthy controls	80 22	—
[19]	Generic symptoms of histamine intolerance	14 patients with clinically suspected histamine intolerance	71	7.04
[25]	Headache	34 healthy controls	—	39.5
[16]	Atopic eczema	35 histamine intolerant patients with headache 162 patients with atopic eczema	85 19	—
[28]	Chronic spontaneous urticaria	124 patients with symptoms of histamine intolerance but without atopic eczema	20	—
[30]	Atopic dermatitis	85 healthy controls 55 patients suffering for chronic urticaria and gastrointestinal disturbances	0 14	17.8
[2]	Chronic idiopathic urticaria	58 patients with atopic dermatitis 19 healthy controls 75 patients with chronic idiopathic urticaria	— — 57	10 14 —
[9]	Inflammatory bowel diseases	25 healthy controls	40	—
[6]	Lactose malabsorption	55 patients with Crohn's disease	—	8.5
[26]	Damage of intestinal mucosa	43 patients with ulcerative colitis 17 healthy controls	— —	8.9 10.3
[21]	Damage of intestinal mucosa	121 patients with lactose malabsorption	36	13.6
[8]	Chronic abdominal pain	21 patients with anorexia nervosa restricting type 15 patients with anorexia nervosa binge-eating/purging type 20 healthy controls	— — —	8.2 12.3 12.1
		20 patients with unresectable metastatic gastric cancer	—	2.4
		16 paediatric patients diagnosed with two of more digestive complaints	88	—
		394 paediatric patients	8	4.5

<sup>a</sup> Reduced DAO activity <10 U/mL

significant rise in DAO activity was noted and the majority of patients reported a complete remission or improvement in headache frequency.

Considering dermatological symptoms, Maintz et al. [16] evaluated serum DAO activity in patients with atopic eczema in comparison with histamine-intolerant patients without atopic eczema and also with healthy volunteers. No individuals with this enzymatic deficiency were found in the healthy control group. On the contrary, the percentage of patients with DAO deficiency was 19% in atopic eczema group and 20% in histamine intolerants without this dermatological affection. Thus, both a significantly lower mean DAO activity and a higher total number of individuals with a reduced DAO activity was found in atopic eczema patients and histamine intolerants without atopic eczema in comparison with healthy controls. In another study that considered patients with chronic spontaneous urticaria accompanied by gastrointestinal disturbances, a prevalence of DAO deficiency of 44% was observed [28]. Conversely, other studies involving patients with atopic dermatitis and urticaria did not find statistically significant association between a reduced DAO activity and high plasma histamine levels in patients suffering from these skin diseases [2, 30].

In the field of gastrointestinal disorders, Honzawa et al. [9] evaluated the clinical significance of serum DAO activity in 98 patients with inflammatory bowel disease. This study demonstrated that DAO activity was significantly lower in patients with Crohn's disease or ulcerative colitis than in healthy controls, indicating a relationship between DAO levels and intestinal permeability. Furthermore, Enko et al. [6] measured serum DAO levels in 121 patients with lactose malabsorption, finding that 36.4% of this cohort showed a deficiency in this enzyme. Additionally, it was observed that individuals with lactose malabsorption and deficit of DAO tended to report more gastrointestinal symptoms during the lactose hydrogen breath test than those with normal DAO activity. Other authors concluded that low serum DAO activity levels could act as indicator of intestinal mucosal disturbances in patients with anorexia nervosa [26] or under chemotherapy treatment [21].

In clinical studies dealing with paediatric populations, an observational retrospective study performed by Rosell-Camps et al. [23] that involved 16 children with abdominal pain, chronic diarrhoea and vomiting found a direct relation between reduced serum DAO levels and these digestive complaints. Concretely, 88% of these paediatric patients showed DAO deficiency. More recently, in an observational study performed by Hoffmann et al. [8] in 394 children with chronic abdominal pain, only 8% showed DAO activity levels under the normal threshold.

The high prevalence of DAO deficiency in migraine patients found in the current study (87%) coincides with that described by Steinbrecher and Jarisch [25] in patients with headache (85%) and by Rosell-Camps et al. [23] in paediatric

patients with digestive complaints (88%). Moreover, these percentages are in good agreement with those described by Mušič et al. [22] and Manzotti et al. [19], which considered patients clinically suspected as histamine intolerants with diverse coexisting symptoms (Table 2). However, other studies addressing different specific pathologies, such as atopic eczema, chronic urticaria, lactose malabsorption and chronic abdominal pain, reported lower percentages of DAO deficit, with values ranging between 8 and 57% [2, 6, 8, 16, 28].

In view of the results of this study, it can be concluded that DAO deficiency is more prevalent in migraine patients than in non-migranous individuals. More studies are needed to better establish the cut off value of DAO activity to allow not only a more accurate diagnosis of histamine intolerance but also to potentially become an additional diagnosis criterion for migraine. Likewise, further research is necessary to reasonably explain the variability found in serum DAO activity levels.

**Acknowledgements** The authors would like to thank DR Healthcare SL for its funding support. Oriol Comas-Basté is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF2015).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. Ayuso P, Garcia-Martin E, Martínez C, Agundez JA (2007) Genetic variability of human diamine oxidase: occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. *Pharmacogenomics* 17:687–693. doi:10.1097/FPC.0b013e328012b8e4
2. Cho HJ, Cho SI, Kim HO, Park CW, Lee CH (2013) Lack of association of plasma histamine with diamine oxidase in chronic idiopathic urticaria. *Ann Dermatol* 25:189–195. doi:10.5021/ad.2013.25.2.189
3. Chung BY, Cho SI, Ahn IN, Lee HB, Kim HO, Park CW, Lee CH (2011) Treatment of atopic dermatitis with a low-histamine diet. *Ann Dermatol* 23:91–95. doi:10.5021/ad.2011.23.S1.S91
4. Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC (2016) Dietary management of histamine intolerance: influence of putrescine in the metabolism of histamine by DAO enzyme. XII Reunión de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria, Antequera (Spain)
5. EFSA Panel on Biological Hazards (2011) Scientific opinion on scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J* 9:2393
6. Enko D, Kriegshäuser G, Halwachs-Baumann G, Mangge H, Schnedl W (2016) Serum diamine oxidase activity is associated with lactose malabsorption phenotypic variation. *Clin Biochem* 50:50–53. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.08.019
7. García-Martín E, Martínez C, Serrador M, Alonso-Navarro H, Ayuso P, Navacerrada F, Agundez JA, Jiménez-Jiménez FJ (2015) Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine. *Headache* 55:276–286. doi:10.1111/head.12493

8. Hoffmann M, Gruber E, Deutschmann A, Jahnel J, Hauer A (2016) Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Arch Dis Child* 98:832–833. doi:10.1136/archdischild-2013-305024
9. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T (2011) Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm Bowel Dis* 17:E23–E25. doi:10.1002/ibd.21588
10. International Headache Society (IHS) (2013) The international classification of headache disorders 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33(9):629–808. doi:10.1177/0333102413485658
11. Jarisch R (2014) Histamine intolerance, histamine and seasickness. Springer Heidelberg, New York
12. Kokavec A (2016) Migraine: a disorder of metabolism? *Med Hypotheses* 97:117–130. doi:10.1016/j.mehy.2016.10.029
13. Komericki P, Klein G, Reider N, Hawranek T, Strimitzer T, Lang R, Kranzelbinder B, Aberer W (2011) Histamine intolerance: lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien Klin Wochenschr* 123:15–20. doi:10.1007/s00508-010-1506-y
14. Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol* 43:498–506
15. Kuefner MA, Schwelberger HG, Ulrich P, Hahn EG, Raithe M (2002) Total histamine degradation capacity (THDC) as an important biological marker of histamine metabolism in human colonic mucosa. *Inflamm Res* 51:87–88
16. Maintz L, Benfadal S, Allam JP, Hagemann T, Fimmers R, Novak N (2006) Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 117:1106–1112. doi:10.1016/j.jaci.2005.11.041
17. Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 85:1185–1196
18. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K, Novak N (2008) Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Hum Reprod Update* 14:485–495. doi:10.1093/humupd/dmn014
19. Manzotti G, Breda D, Gioacchino M, Burastero SE (2015) Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1:7. doi:10.1177/0394632015617170
20. Meza-Velázquez R, López-Márquez F, Espinosa-Padilla S, Rivera-Guillen M, Ávila-Hernández J, Rosales-González M (2016) Association of diamine oxidase and histamine N-methyltransferase polymorphisms with presence of migraine in a group of Mexican mothers of children with allergies. *Neurologia*. doi:10.1016/j.nrl.2016.02.025
21. Miyoshi J, Miyamoto H, Goji T, Taniguchi T, Tomonari T, Sogabe M, Kimura T, Kitamura S, Okamoto K, Fujino Y, Mugeruma N, Okahisa T, Takayama T (2015) Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anti-cancer drugs. *J Gastroenterol Hepatol* 30:1582–1590. doi:10.1111/jgh.13004
22. Mušič E, Korošec P, Šilar M, Adamič K, Košnik M, Rijavec M (2013) Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wien Klin Wochenschr* 125:239–243. doi:10.1007/s00508-013-0354-y
23. Rosell-Camps A, Zibetti S, Perez-Esteban G, Vila-Vidal M, Ramis L, Garcia T (2013) Histamine intolerance as a cause of chronic digestive complaints in pediatric patients. *Rev Esp Enferm Dig* 105:201–207. doi:10.4321/S1130-01082013000400004
24. Siebenhaar L, Melde A, Magerl T, Zuberier T, Church MK, Maurer M (2016) Histamine intolerance in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30:1774–1777. doi:10.1111/jdv.13778
25. Steinbrecher I, Jarisch R (2005) Histamin und Kopfschmerz. (Histamine and headache.) *Allergologie* 28:84–91
26. Takimoto Y, Yoshiuchi K, Shimodaira S, Akabayashi A (2014) Diamine oxidase activity levels in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 47:203–205
27. Vlieg-Boerstra BJ, Van der Heide S, Oude JNG, Kluijn-Nelemans JC, Dubois AEJ (2005) Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods. What is the evidence? *Neth J Med* 63:244–249
28. Wagner N, Dirk D, Peveling-Oberhag A, Reese I, Rady-Pizarro U, Mitzel H, Staubach P (2016) A popular myth—low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria – fact or fiction? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. doi:10.1111/jdv.13966
29. Wantke F, Gotz M, Jarisch R (1993) Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clin Exp Allergy* 23:982–985
30. Worm M, Fielder E, Döle AS, Schink T, Hemmer W, Jarisch R, Zuberier T (2009) Exogenous histamine aggravates eczema in a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 89:52–56. doi:10.2340/00015555-0565
31. Zaeem Z, Zhou L, Dilli E (2016) Headaches: a review of the role of dietary factor. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16:101. doi:10.1007/f11910-016-0702-1









### 4.3. Desenvolupament i validació d'un mètode analític per a la determinació d'histamina i els seus metabòlits en orina

#### PUBLICACIÓ 4

**New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine**

**Oriol Comas-Basté**, M. Luz Latorre-Moratalla, Roberta Bernacchia, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 145, 379-385.

Índex d'impacte (JCR 2017): 2,831

Posició en l'àrea "Analytical Chemistry": Q2 (23/80)

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 3

**Oriol Comas-Basté**, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **A new approach for the diagnosis of histamine intolerance: histamine metabolites UHPLC-FL determination in urine.** *XI International Mediterranean Diet Conference*, 2016, Barcelona.

#### PLANTEJAMENT I OBJECTIU

Actualment, el diagnòstic de la intolerància a la histamina s'efectua a través d'una combinació de criteris que inclouen l'absència d'altres causes que puguin ser responsables d'un augment d'histamina en l'organisme (i.e. al·lèrgia alimentària i mastocitosi) i la presència de dos o més símptomes típics de la intolerància a la histamina i la seva millora o remissió al seguir una dieta baixa en histamina. Sovint també es fa servir la determinació de l'activitat de l'enzim DAO a nivell plasmàtic, encara que és una eina diagnòstica controvertida que requereix de més estudis sobre la seva validesa clínica. La definició d'un algoritme de consens per al diagnòstic de la intolerància a la histamina i el desenvolupament de tècniques validades segueixen essent imprescindibles per facilitar el correcte diagnòstic d'aquesta intolerància i el seu abordatge clínic eficaç. La recerca de marcadors no invasius que permetin conèixer l'estat dels sistemes de degradació d'histamina en l'organisme podria ser de gran utilitat per tal d'establir un criteri diagnòstic sòlid i clínicament irrefutable de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO.

La histamina present a l'organisme humà és metabolitzada pels enzims DAO o HNMT en funció de la seva localització. El perfil d'excreció urinària d'histamina podria aportar informació rellevant pel que fa a la capacitat de l'organisme per degradar aquest compost. L'abordatge analític per a la determinació simultània de la histamina i els seus metabòlits és complexa. Actualment, existeixen mètodes per determinar els diferents analits de manera individual o bé simultània en certes matrius biològiques però no en orina.

Per tant, l'objectiu d'aquest estudi va ser desenvolupar i validar un mètode analític per a la determinació d'histamina i metilhistamina en orina que permeti la quantificació d'aquests analits per tal de poder estudiar-ne la validesa com a potencials biomarcadors de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO.

## METODOLOGIA

La preparació de les mostres d'orina va consistir en una hidròlisi àcida seguida d'una etapa de purificació i concentració a través d'extracció en fase sòlida amb cartutxos d'intercanvi catiònic mixt (MCX). La separació cromatogràfica dels analits es va dur a terme mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució i detecció fluorimètrica (UHPLC-FL) i la derivatització *online* post-columna dels analits amb *orto*-ftaldehid (OPA). La identificació d'ambdós analits conjugats amb OPA va ser confirmada mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució (UHPLC-HRMS), tant en patrons com en mostres d'orina. El mètode desenvolupat va ser validat en termes de linealitat, sensibilitat, precisió i recuperació en base a les recomanacions establertes per la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC). L'aplicabilitat del mètode va ser avaluada en 12 mostres d'orina de 24 hores procedents de voluntaris sans.

## RESULTATS

El mètode desenvolupat va permetre l'adequada purificació i concentració dels analits (fins a 50 vegades) i la seva determinació en orina en menys d'onze minuts. El mètode va ser lineal en l'interval de concentracions comprés entre 0,05 mg/L i 10 mg/L per ambdós analits i va presentar un límit de detecció adient per a mesurar els nivells d'histamina i metilhistamina presents en orina (0,025 mg/L i 0,028 mg/L,

respectivament). La precisió i recuperació del mètode va ser molt satisfactòria, amb valors de desviació standard relativa inferiors al 5,5% i percentatges de recuperació superiors al 99% per a ambdós analits i per a tots els nivells d'addició. Per últim, l'estructura dels conjugats de la histamina i la metilhistamina amb el reactiu derivatitzant va ser confirmada mitjançant UHPLC-HRMS amb una elevada exactitud de massa (errors de massa inferiors a 2 ppm).

L'anàlisi de mostres d'orina de 24 hores de voluntaris sans va mostrar un valor mig d'excreció d'histamina de  $0,14 \pm 0,08 \mu\text{mol}/\text{dia}$  i de metilhistamina de  $0,92 \pm 0,43 \mu\text{mol}/\text{dia}$ . Cal destacar una ampla variabilitat interindividual en ambdós analits en orina i que dues persones van mostrar nivells d'excreció de metilhistamina anormalment elevats.

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS

- S'ha desenvolupat i validat un mètode analític que permet determinar de forma ràpida i inequívoca la concentració d'histamina i del seu metabòlit metilat (metilhistamina) en mostres d'orina.
- Aquest mètode constitueix una eina d'interès per a futurs estudis enfocats a valorar el potencial d'aquests dos analits com a biomarcadors no invasius de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



La histamina i els seus metabòlits es poden determinar en orina mitjançant un mètode cromatogràfic, fet que obre la porta a disposar d'una nova eina diagnòstica per a la intolerància a la histamina.







Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine



Oriol Comas-Basté<sup>a</sup>, M.Luz Latorre-Moratalla<sup>a</sup>, Roberta Bernacchia<sup>b</sup>,  
M.Teresa Veciana-Nogués<sup>a</sup>, M.Carmen Vidal-Carou<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, XaRTA, INSA, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Commodity Science, Department of Management, Sapienza University of Rome, Via del Castro Laurenziano 9, 00161, Rome, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 March 2017

Received in revised form 7 June 2017

Accepted 8 June 2017

Available online 5 July 2017

## Keywords:

Histamine

Methylhistamine

Histamine intolerance

Diamine oxidase

Solid phase extraction

Ultra high pressure liquid chromatography

## ABSTRACT

Histamine intolerance is a disorder in the homeostasis of histamine due to a reduced intestinal degradation of this amine, mainly caused by diamine oxidase (DAO) enzyme deficiency, which provokes its accumulation in plasma and the appearance of adverse health affects. A new approach for the diagnosis of this intolerance could be the determination of histamine and its metabolites in urine. The aim of this work was to develop and validate a rapid method to determine histamine and methylhistamine in human urine by Ultra High Performance Liquid Chromatography and Fluorimetric detection (UHPLC-FL). The proposed method is a consistent procedure to determine histamine and methylhistamine in less than 11 min with adequate linearity and sensitivity. Relative standard deviation was always lower than 5.5%, ensuring method precision; and mean recovery was greater than 99% for both analytes. The structure of histamine and methylhistamine conjugated with OPA were confirmed by UHPLC-ITD-FTMS which enabled to unequivocally identify both analytes in standards and also in urine samples. The analysis of histamine and methylhistamine in urine samples could be a potential new approach for the routine diagnosis of histamine intolerance, more patient-friendly and with clear advantages in terms of equipment and personnel demand for sample collection in comparison with current plasmatic DAO activity determination.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1 Introduction

Histamine (2-[4-imidazolyl]ethylamine) is a bioactive amine discovered in 1910 by Dale and Laidlaw [1] which is synthesized by decarboxylation of the amino acid histidine, using pyridoxal phosphate (vitamin B6) as cofactor. It is mainly produced in mast cells, basophils, platelets, histaminergic neurons and enterochromaffin cells; where it is stored intracellularly in vesicles until its release upon stimulation. Histamine (HA) is involved in the regulation of different physiological functions such as the secretion of gastric juice, cell growth and cellular differentiation, the day-night rhythm, neurotransmission and immunomodulation [2,3].

Two metabolic pathways for HA are known in humans. Histamine-*N*-methyltransferase (HNMT) is the enzyme responsible for the ring methylation of HA and is mainly located in the liver and kidney and it carries out the conversion of HA to 1-methylhistamine

(MHA), which will be finally converted to *N*-methylimidazoleacetic acid. As a cytosolic protein, HNMT metabolizes HA only in the intracellular space of cells [4–6]. On the other hand, diamine oxidase (DAO) is an enzyme of mainly intestinal location that performs the oxidative deamination of HA producing imidazole acetaldehyde, which will later be converted to imidazoleacetic acid and finally combined with ribose for its urinary excretion. As a secretory protein, DAO is responsible for scavenging extracellular HA after mediator release, being the main enzyme for the metabolism of intestinal HA [4–6].

Histamine intolerance (HIT) is a disorder in the homeostasis of HA due to a reduced intestinal degradation of this amine resulting in its accumulation in plasma and the appearance of multifaceted clinical symptoms, mainly headaches, flatulence, diarrhea, abdominal pain, sneezing, rhinorrhea, hypotonia, arrhythmias, idiopathic urticaria and pruritus [2,3,7]. An enzymatic deficiency of DAO, key enzyme in the intestinal degradation of histamine, can occur based on genetic predisposition, in inflammatory and degenerative intestinal disorders or by pharmacological blockade [3,8,9]. The incidence of HIT has been estimated to be 1% of the population

\* Corresponding author.

E-mail address: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu) (M.Carmen Vidal-Carou).

although this percentage may increase as a consequence of a better knowledge and diagnostic of this enzymatic deficiency. Current therapy for HIT is the limitation of foods containing HA, which may be complemented with encapsulated DAO enzyme to contribute to the degradation of intestinal HA [3,10].

Currently, the identification of individuals with HIT is based on plasmatic DAO activity through a biochemical assay that measures the amount of HA that can be degraded by this enzyme [11]. An alternative for the diagnosis of HIT by DAO deficiency could be the determination of HA and its metabolites in urine, considering that individuals with insufficient DAO activity would have a distribution profile of these compounds significantly different from healthy individuals. In fact, individuals with symptoms associated with HIT would show a higher urinary content of HA and its major metabolite produced by the HNMT metabolic pathway (MHA) than healthy population.

The analytical approach for the simultaneous determination of HA and its metabolites is complex. There are commercial kits that allow the determination of HA through ELISA and of its metabolites through radioimmunoassay (RIA) techniques. However, these immunological-based techniques do not allow simultaneous determination of HA and its metabolites, while, in the case of RIA, they also involve complications related to the use of radioactive material [12]. Alternatively, chromatographic methods, mainly based on high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with various detection systems, appear to be the most appropriate for the simultaneous separation and quantification of these compounds [13]. Few HPLC methods are available in the literature for the simultaneous determination of HA and MHA, mainly focused on the quantification of both compounds in laboratory animal plasma and other biological specimens, such as brain or intestinal tissues [14–19]. Although UV detection has been widely used, the high sensitivity and specificity necessary to detect these compounds in samples such as blood makes fluorescence (FL) or mass spectrometry (MS) detection systems more suitable for this purpose. More recently, ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) has been proposed for the simultaneous determination of HA and MHA in mice hair and cerebrospinal fluid [20–22]. A fast chromatographic procedure (UHPLC) coupled with FL detection could be an advantageous approach for the routine determination of these analytes in human urine.

In order to have a new approach for the diagnosis of histamine intolerance, the aim of this work was to develop and validate a rapid and reliable method to quantify HA and MHA in urine. An UHPLC procedure coupled with an on-line *o*-phthaldehyde (OPA) post-column derivatization and FL detection has been validated in terms of linearity, sensitivity, precision and recovery. Structural analysis of HA and MHA OPA derivatives using UHPLC-ITD-FTMS was carried out to unequivocally identify these compounds in urine samples.

## 2 Material and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

Histamine dihydrochloride and 1-methylhistamine dihydrochloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ultra pure water (18.2 M $\Omega$ cm) was produced using a LaboStar System from Evoqua Water Technologies (Warrendale, PA, USA). Methanol and acetonitrile (both HPLC grade) were obtained from Fisher Scientific (Loughborough, UK). The other reagent-grade chemicals used were: acetic acid, formic acid, sodium acetate anhydrous, OPA, 2-mercaptoethanol and Brij 35 from Merck (Darmstadt, Germany); hydrochloric acid 0.1 M (HCl), potassium hydroxide, boric acid and ammonium 30% from Panreac (Barcelona, Spain);

and sodium octanesulphonate from Romil Chemicals (Cambridge, UK).

### 2.2. Standard solutions

Stock solutions of HA and MHA were prepared in 0.1 M HCl for a given concentration of 20 mg/L. Pooled working standard solutions (ranging from 0.05 to 10 mg/L) were prepared diluting and mixing aliquot of each compound stock solution with 0.1 M HCl. Standard solutions were protected from light and stored at 4 °C until use and filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane filter (GHP, Waters Corp., Milford, MA, USA).

### 2.3. Samples preparation and MCX SPE procedure

Urine samples from twelve subjects aged 22–40 years were collected for 24 h without the addition of preservatives. All volunteers received an information kit, including an informed consent form and a questionnaire to record any symptomatology associated with HIT. Samples were stored in a freezer (–20 °C) until analysis. Prior to experiments, samples were thawed at room temperature and completely homogenized. Sample preparation consisted of an acidic hydrolysis by adding 750  $\mu$ L of 0.1 M HCl to 10 mL of urine sample. The solution was placed in a heater at 90 °C for 30 min and subsequently cooled at room temperature. Later, a purification and concentration procedure was performed by solid phase extraction (SPE) using mixed cation exchange (MCX, 3 mL, 60 mg) cartridges acquired from Waters Corporation (Milford, MA, USA). The cartridges were conditioned with 2 mL of methanol, followed by 2 mL of distilled water. After adsorption of the sample, the cartridge was washed with 10 mL of 0.1 M HCl and dried for 1 min under vacuum to remove the excess of water. The elution of HA and MHA was performed with 2 mL of 5% NH<sub>4</sub>OH in methanol (v/v). The eluate was evaporated to dryness with a centrifugal vacuum concentrator (30 °C, 1465 rpm) and later redissolved in 200  $\mu$ L of 0.1 M HCl and filtered through a 0.22  $\mu$ m filter (GHP, Waters Corp., Milford, MA, USA) before UHPLC injection.

### 2.4. UHPLC-FL determination of HA and MHA

#### 2.4.1. Equipment

Chromatographic separation was performed using an UHPLC-FL system consisting of a Waters Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography equipment, which involved a quaternary pump, an auto-sampler and a FL detector; accomplished with a post-column reagent manager (Waters 510). The post-column pump was connected to a zero dead volume installed between the column outlet and the detector. An Acquity UPLC™ BEH C<sub>18</sub> column (1.7  $\mu$ m, 2.1 mm x 50 mm) (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used as the analytic column. Data acquisition was managed with the Empower version 3 system.

#### 2.4.2. Chromatographic conditions

Mobile phase consisted of the eluent A as a solution of 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulphonate adjusted to pH 4.8 with acetic acid, and the eluent B as a mixture of solvent B-acetonitrile (6.6:3.4), where solvent B was a solution of 0.2 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulphonate adjusted to pH 4.5 with acetic acid. The mobile phase was filtered through a 0.22  $\mu$ m filter. The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/min. A linear gradient was applied: 0 min, 80% A; 6 min, 70% A; 6.5 min, 0% A; 8.5 min 0% A; 9 min, 80% A. Finally, the system was re-equilibrated for 2 min at the initial conditions before the next injection. Derivatization reagent was prepared by mixing and aqueous solution of 31 g of boric acid and 26.2 g of potassium hydroxide

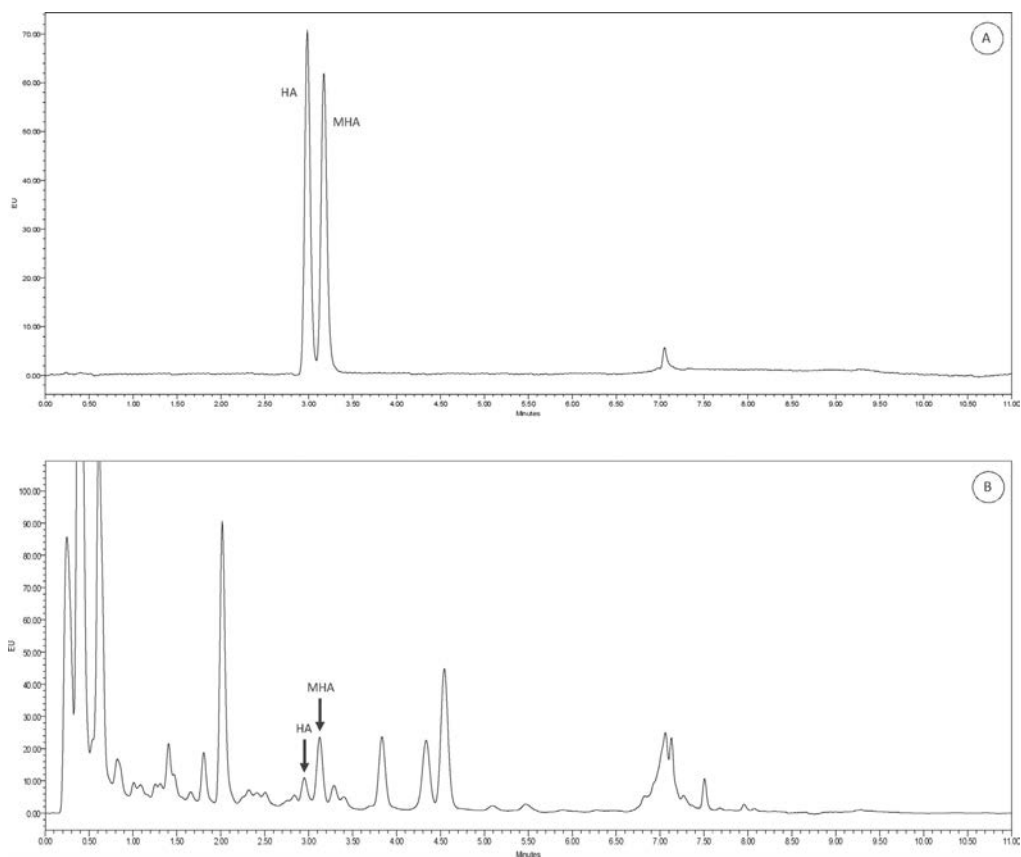


Fig. 1. Chromatograms of HA and MHA standard solution of 10 mg/L (A) and a urine sample (B).

with 0.2 g of OPA dissolved in 5 mL of methanol. To the above solution, 3 mL of 30% Brij and 3 mL of 2-mercaptoethanol as a reducing agent were added and final volume was brought to 1 L with water. The daily prepared post-column derivatization reagent was filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter and protected from light. The flow rate of the derivatization reagent was 0.4 mL/min. Automatic injection of 1  $\mu\text{L}$  of the standard solution and samples was carried out. Vials filled with standard solutions or samples were cooled to 4  $^{\circ}\text{C}$  in the auto sampler, the column was kept at 42  $^{\circ}\text{C}$  and post-column reaction equipment was maintained at room temperature. Fluorescence detection at 340 nm for excitation and 445 nm for emission was applied.

### 2.5. LC-MS system

An LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with an ESI source working in positive mode was used for accurate mass measurements. Mass spectra were acquired in profile mode with a setting of 30,000 resolution at  $m/z$  400. Operation parameters were as follows: source voltage, 3.5 kV; sheath gas, 50 (arbitrary units); auxiliary gas, 20 (arbitrary units); sweep gas, 2 (arbitrary units); and capil-

lary temperature, 375  $^{\circ}\text{C}$ . Default values were used for most other acquisition parameters (FT Automatic gain control (AGC) target  $5 \cdot 10^5$  for MS mode and  $5 \cdot 10^4$  for MS<sup>n</sup> mode). Samples were analysed in full scan mode at a resolving power of 30,000 at  $m/z$  400 and MS<sup>2</sup> events acquired at a resolving power of 15,000. An isolation width of 1 amu was used and precursors were fragmented by collision-induced dissociation C-trap (CID) with normalised collision energy of 35 V and an activation time of 10 ms. The mass range in FTMS mode was  $m/z$  100–1000. Data analysis was achieved using XCalibur software v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). An external calibration for mass was carried out before the analysis.

Liquid chromatography analysis was performed using an Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump and a thermostated autosampler. Chromatographic separation was accomplished with an Acquity UPLC<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub> column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  50 mm) (Waters Corp., Milford, MA, USA) kept at 40  $^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B), and was delivered at a constant flow rate of 0.8 mL/min following a gradient elution: 0 min, 100% A; 3 min, 80% A and 20% B; 3.5 min, 80% A and 20% B; 3.6 min 40% A and 60% B; 4.6 min, 40% A and 60% B; 5 min, 100% A. Finally, the



**Table 1**  
Summary of validation results.

	Sensitivity		Precision		Recovery <sup>c</sup>			Cochran's test $C_{exp}$ <sup>d</sup>
	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Urine		Addition level I	Addition level II	Addition level III	
HA	0.025	0.035	RSD (%) <sup>a</sup>	RSDH (%) <sup>b</sup>	0.01 mg/L of HA and MHA	0.15 mg/L of HA and MHA	0.53	
			2.15	8.12–10.83	RSD (%)	RSDH (%)	100.58 (2.27)	97.91 (5.13)
MHA	0.028	0.045	RSD (%) <sup>a</sup>	RSDH (%) <sup>b</sup>	0.04 mg/L of HA and MHA	0.15 mg/L of HA and MHA	0.74	
			2.77	6.03–8.04	RSD (%)	RSDH (%)	99.95 (2.93)	99.65 (1.71)

<sup>a</sup> Relative standard deviation (RSD) for seven determinations.<sup>b</sup> Acceptable range for relative standard deviations according to Horwitz's formula for intra-laboratory studies ( $1/2-2/3$  of the interlaboratory study calculate by the formula).<sup>c</sup> Mean recovery percentages and standard deviation in parentheses.<sup>d</sup> Variance outlier test Cochran  $C_{tab}$  (6,2,0.005) = 0.8554.

system was re-equilibrated for 2 min at the initial conditions before the next injection. The autosampler plate was held at 10 °C and the injection volume was 1  $\mu$ L.

For the pre-column derivatization, 2% acid formic in water was used for the preparation of standard solutions and to resuspended urine samples. To 100  $\mu$ L of standard solution, or redissolved urine sample, 400  $\mu$ L of the derivatization reagent were added and thoroughly mixed using a vortex. UHPLC–MS analysis was performed immediately after the derivatization reaction due to the low stability of OPA derivatives.

## 2.6. Statistical analysis

The statistical analysis of data was performed with Statistical Software Package for Windows SPSS, version 22 (SPSS, Chicago, IL, USA). Analysis of the variance for linear regression was used to test the reliability of the method. The Student's *t*-test was used to compare between data sets and the homogeneity of variances was assessed through Cochran's C test.

## 3. Results and discussion

To properly determine total content of HA and MHA in urine, sample preparation consisted in the acid hydrolysis (0.1 M HCl) combined with heat treatment. As reported in previous works, higher levels of these compounds were obtained in hydrolysed urine than in non-hydrolysed samples [17]. In order to set final sample hydrolysis parameters, several time and temperature conditions were assayed. Total conversion of conjugated analytes to free HA and MHA was achieved after submitting the sample at 90 °C for 30 min.

Purification and concentration procedure through MCX SPE cartridges was implemented attending the low concentration of HA and MHA in urine and the need to minimize potential interferences of this matrix. When loading urine sample onto the SPE cartridge, acid pH values achieved by previous acidic hydrolysis facilitated the strong interaction of positively charged amine groups of HA and MHA with the sulfonic anion of MCX sorbent. A proper cleanup step washing with 0.1 M HCl allowed the reduction of matrix interferences. Later elution with a basic 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  in methanol (v/v) solution ensured cleavage of the electrostatic interactions between ammonium ion of HA and MHA and sulfonic anion of the sorbent. The use of MCX SPE cartridges allowed five-fold pre-concentration of analytes and greater sample concentration was achieved by eluate evaporation to dryness with a centrifugal vacuum concentrator. Overall analytical procedure achieved a final concentration of the analytes of fifty-fold in relation to initial urine content.

Due to the low natural fluorescence of the analytes, the use of a derivatizing reagent in order to detect HA and MHA and increase the sensitivity of the method was required. The presence of amino groups in the structures of HA and MHA makes both compounds suitable for the derivatization with a large number of fluorogenic reagents, being OPA, fluorescamina and DBD-F (4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole) the most commonly used [12,13,20]. In this method, an online post-column OPA derivatization procedure was used, which ensured a high reproducibility by minimizing sample manipulation prior to the injection. Moreover, OPA reacts rapidly with amines in the presence of a reducing agent, improving detection sensitivity, reducing the polarity of original amino compounds and increasing method selectivity [23]. The current method provides a significant improvement in comparison with some previous methods that mostly used pre-column derivatization techniques, which could face problems related to the low stability of OPA-amine derivatives [12,13].

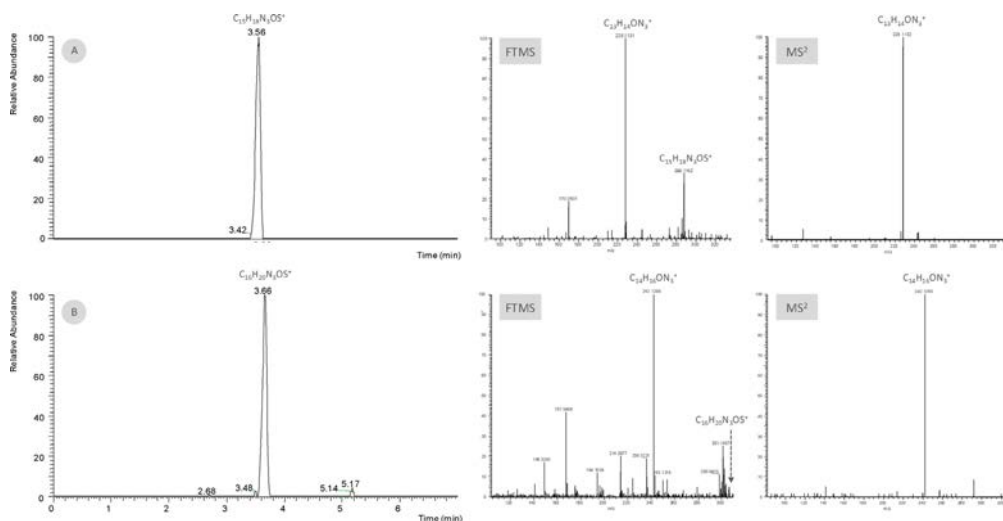


Fig. 2. Representative chromatogram, FTMS spectra and MS<sup>2</sup> spectra of OPA derivative HA (A) and MHA (B) standars.

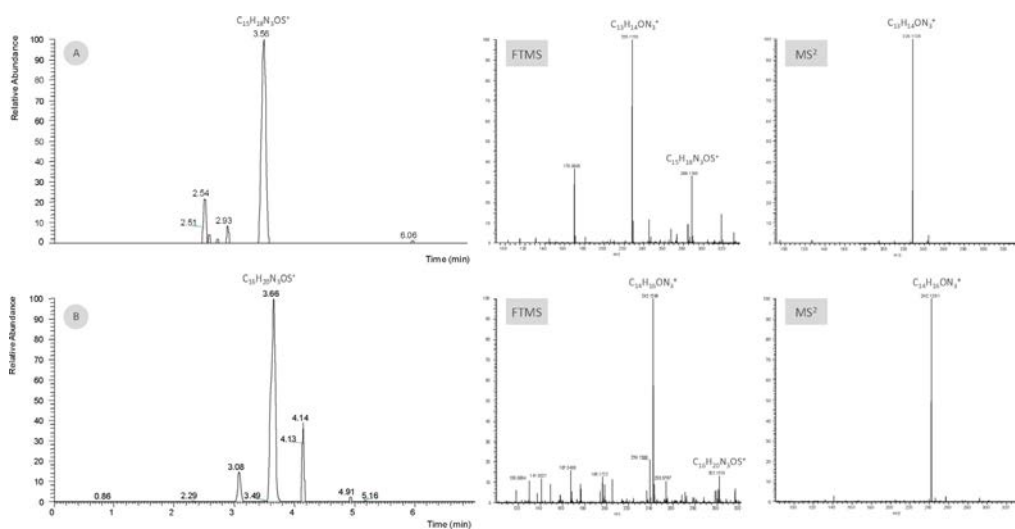


Fig. 3. Representative chromatogram, FTMS spectra and MS<sup>2</sup> spectra of OPA derivative HA (A) and MHA (B) in a urine sample.

According to previous methods, several mobile phase compositions and gradient programmes were assayed to get the best resolved peaks for HA and MHA [12,13,24]. Considering the slightly structural differences of the analytes, a mobile phase consisting in two eluents of different polarity and pH permitted to establish the necessary gradient in order to properly separate HA and MHA. This was achieved by a gradual and linear slight increase of eluent B, the less polar eluent of the mobile phase, during the first minutes of the chromatographic run. Just after the separation of both analytes, the proportion of acetonitrile was markedly incremented aiming to completely elute less polar urinary compounds, which

consequently incremented the chromatographic run up to the final 11 min. Moreover, sodium octanesulphonate as ion-pairing reagent was added to the mobile phase in order to improve chromatographic separation of these hydrophilic and polar compounds. Fig. 1 shows the chromatograms of the standard solutions and of urine samples. The proposed method accomplished an acceptable separation between HA and MHA with a chromatographic resolution (R) of 1.5. HA and MHA were identified on the basis of the retention time by comparison with the standard.

The present UHPLC method reduces considerably the time required for urinary determination of HA and MHA in compari-

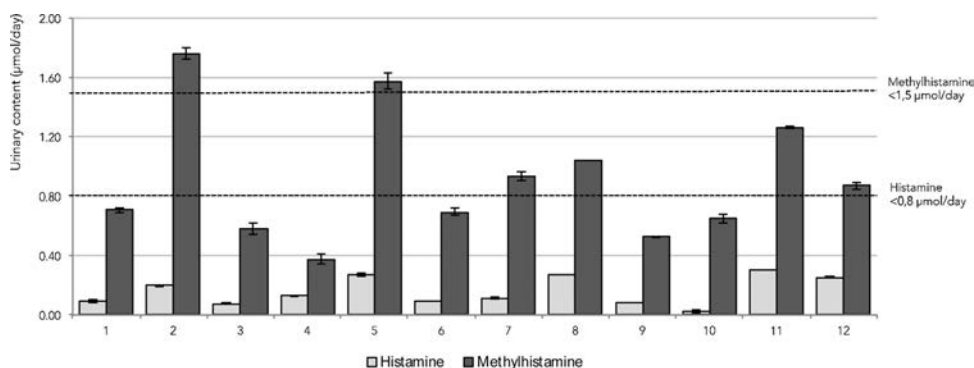


Fig. 4. Urinary content of HA and MHA ( $\mu\text{mol/day}$ ) in twelve volunteers. Dashed lines indicate normal levels of HA and MHA reported by literature.

son with previously published HPLC-FL methods, resulting in turn in decreased reagent costs and reduced environmental impact [14,15,17]. The reliability of this UHPLC method for routine analysis of urine samples was assessed in terms of linearity, sensitivity, precision and recovery.

### 3.1. Linearity

Linearity was tested at twelve different concentrations between 0.05 and 10 mg/L, performing seven measurements at each level. Analysis of the variance of the regression allowed assessing the linearity of the UHPLC method. Least-squares analysis resulted in a correlation coefficient of  $r \geq 0.9999$  for both analytes ( $p < 0.001$ ). Calibrations data fit a linear regression model with determination coefficients ( $r^2$ ) higher than 99.99% for all standard curves.

### 3.2. Sensitivity

The chromatographic limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were obtained following the IUPAC guidelines and using low-concentration HA and MHA standard regression curves ranging from 0.05 to 0.8 mg/L [25]. A blank consisting in 0.1 M HCl was used to determine baseline noise. LODs were 0.025 mg/L for HA and 0.028 mg/L for MHA. LOQs were 0.035 mg/L and 0.045 mg/L for HA and MHA, respectively. To confirm the established LODs and LOQs a standard solution at those level concentrations was analysed (Table 1).

### 3.3. Precision

Method precision was evaluated through repeatability by carrying out seven independent determinations of a urine sample from a volunteer using the same analytical conditions (Table 1). Urine and spiked urine with known amounts of HA and MHA (0.01, 0.04 and 0.15 mg/L) were studied in septuplicate in order to test the precision at different levels. The relative standard deviation (RSD) for HA and MHA at all concentration levels was lower than 5.5%, representing a satisfactory level of precision. The Horwitz equation for intra-laboratory studies confirmed the acceptability of these precision results.

### 3.4. Recovery

Method recovery was determined via accuracy evaluation by the standard addition procedure using urine samples spiked with three

addition levels (0.01, 0.04 and 0.15 mg/L of HA and MHA). Seven determinations were performed for each addition level (Table 1). The mean recovery of HA was 99.25% (SD = 1.86), which was not statistically different from the theoretical value of 100% ( $p > 0.005$  according to the Student's *t*-test). For MHA, mean recovery was 99.8% (SD = 0.21), which neither was statistically different from the theoretical value of 100% ( $p > 0.005$ ). The assumption of homogeneity of variances among the three spiking levels was tested using Cochran's C test. Experimental values for both analytes remained under the Cochran's test tabled value, confirming that the variance of recovery values was not dependent on the analyte content ( $p > 0.005$ ).

### 3.5. Structural analysis of HA and MHA OPA derivatives using UHPLC-HRMS

The structure of HA and MHA conjugated with OPA were confirmed by UHPLC-ITD-FTMS which enabled specific detection of both compounds in a complex matrix such as urine. The spectra showed the protonated molecule with a mass error of less than 2 ppm.

The mass spectra shown in Fig. 2 and Fig. 3 confirmed that the OPA complex for HA was formed with a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z = 288.1162$  ( $-1.2$  ppm error) in the standard and a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z = 288.1165$  (0.0 ppm error) in the urine sample. For MHA, OPA conjugated complex was observed with a molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z = 302.1319$  ( $-1.1$  ppm error) and at  $m/z = 302.1318$  ( $-0.8$  ppm error) in the standard and urine sample, respectively.

Moreover, injection in MS<sup>2</sup> mode was performed. The MS<sup>2</sup> spectra gave as result an ion with  $m/z$  228.1132 for HA and an ion with  $m/z$  242.1290 for MHA. Confirmation in samples was accomplished by injection of urine samples in the same conditions. Results are shown in Fig. 2 and Fig. 3.

### 3.6. UHPLC-FL sample analysis

Urine samples from twelve volunteers were analysed using the proposed method (Fig. 4). No significant differences were found in HA urinary content from different volunteers with a mean value of  $0.143 \pm 0.08 \mu\text{mol/day}$ , which is in good agreement with the values obtained by other works [17,26]. On the contrary, greater differences in MHA content were found in analysed urine samples. Concretely, two individuals who reported symptomatology related to HIT showed a significantly higher urinary content of

MHA. Moreover, the increased MHA contents exceeded the threshold established as normal level of this analyte in urine [27]. These results support the initial hypothesis according to which the decrease in DAO activity would cause an accumulation of MHA, the metabolite produced by HNMT. Therefore, this method could be an advantageous and more patient-friendly alternative to current plasmatic DAO activity determination used to diagnose histamine intolerance, being less invasive and avoiding the need for specific equipment and qualified personnel required for plasma sample extraction. Additionally, the distribution profile of histamine and its main metabolite in urine could provide a complementary evaluation of DAO activity, specifically considering that some authors have reported a wide variability in DAO activity both in healthy volunteers and patients diagnosed with HIT according to their symptomatology [28,29].

#### 4. Conclusions

The proposed UHPLC method allows the satisfactory determination of urinary HA and MHA in less than 11 min. The use of MCX SPE cartridges was effective for the selective purification and concentration of HA and MHA in human urine. Overall sample treatment procedure achieved a final concentration of the analytes of fifty-fold in relation to initial urine content. Online post-column derivatization of the analytes with OPA permitted the sensitive detection of the analytes while minimizing sample manipulation prior to UHPLC injection. Unequivocal identification of HA and MHA OPA derivatives in standard and in urine samples has been accomplished through UHPLC-ITD-FTMS. To our knowledge, this is the first UHPLC-FL method with OPA post-column derivatization used to determine HA and MHA in human urine; thus becoming a potential new approach for the routine diagnosis of histamine intolerant individuals. Further studies involving more volunteers are needed to validate MHA as a biomarker for the diagnosis of HIT.

#### Funding

This work was supported by Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya (SGR 2014-1438) and the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AGL 2012-39995). Oriol Comas-Basté is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF 2015).

#### References

- [1] H.H. Dale, P.P. Laidlaw, The physiological action of  $\beta$ -iminazolyethylamine, *J. Physiol.* 41 (1910) 318–344.
- [2] L. Maintz, N. Novak, Histamine and histamine intolerance, *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (2007) 1185–1196.
- [3] E. Kovacova-Hanusova, T. Buday, S. Gavljakova, J. Plevkova, Histamine, histamine intoxication and intolerance, *Allergol. Immunopath.* 43 (2015) 498–506.
- [4] R. Jarisch, Histamine intolerance, in: *Histamine and Motion Sickness*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2004.
- [5] H.G. Schwelberger, Histamine intolerance: overestimated or underestimated? *Inflamm. Res.* 58 (Suppl. 1) (2009) 51–52.
- [6] H.G. Schwelberger, Histamine intolerance: a metabolic disease? *Inflamm. Res.* 59 (Suppl. 2) (2010) 219–221.
- [7] M.L. Latorre-Moratalla, O. Comas-Basté, S. Bover-Cid, M.C. Vidal-Carou, Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population, *Food Chem. Toxicol.* 99 (2017) 78–85.
- [8] P. Ayuso, E. García-Martín, C. Martínez, J.A. Agúndez, Genetic variability of human diamine oxidase: occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity, *Pharmacogenet. Genomics* 17 (2007) 687–693.
- [9] E. García-Martín, C. Martínez, M. Serrador, H. Alonso-Navarro, P. Ayuso, F. Navacerrada, J.A.G. Agúndez, F.J. Jiménez-Jiménez, Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine, *Headache* 55 (2015) 276–286.
- [10] G. Manzotti, D. Breda, M. Gioacchino, S.E. Burastero, Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 29 (2016) 105–111.
- [11] E. Mušič, P. Korosec, M. Silar, K. Adamič, M. Rijavec, Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance, *Wien.Klin. Wochenschr* 125 (2013) 239–243.
- [12] S. Oguri, Y. Yoneya, Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 781 (2002) 165–179.
- [13] T. Toyooka, Separation assay of histamine and its metabolites in biological specimens, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 919–930.
- [14] Y. Itoh, R. Oishi, N. Adachi, K. Saeki, A highly sensitive assay for histamine using ion-Pair HPLC coupled with postcolumn fluorescent derivatization. Its application to biological specimens, *J. Neurochem.* 58 (1992) 884–889.
- [15] K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi, H. Nakazawa, High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization, *J. Chromatogr.* 595 (1992) 163–168.
- [16] C.M. Van Haaster, W. Engels, P.-J. Lemmens, G. Hornstra, G.J. van der Vusse, Rapid and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 3-methylhistamine in biological samples using fluorescamine as the derivatizing agent, *J. Chromatogr.* 617 (1993) 233–240.
- [17] K. Saito, M. Horie, H. Nakazawa, Determination of urinary excretion of histamine and 1-methylhistamine by liquid chromatography, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 654 (1994) 270–275.
- [18] N. Kitanaka, J. Kitanaka, M. Nishiguchi, H. Kinoshita, H. Ouchi, T. Minami, S. Hishida, M. Takemura, Decreased histamine-stimulated phosphoinositide hydrolysis in the cerebral cortex of a rat line selectively bred for high alcohol preference, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 1431–1436.
- [19] V. Von Vietinghoff, G. Gabel, J.R. Aschenbach, High-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 1-methylhistamine in biological buffers, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 844 (2006) 335–339.
- [20] H. Kawashishi, T. Toyooka, K. Ito, M. Maeda, T. Hamada, T. Fukushima, M. Kato, S. Inagaki, Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 148–156.
- [21] M. Croyal, Y. Dauvilliers, O. Labeeuw, M. Capet, J.-C. Schwartz, P. Robert, Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry with precolumn derivatization, *Anal. Biochem.* 409 (2011) 28–36.
- [22] Y. Zhang, F.D. Tingley, E. Tseng, M. Tella, X. Yang, E. Groeber, J. Liu, W. Li, C.J. Schmidt, R. Steenwyk, 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 (CSF), *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 879 (2011) 2023–2033.
- [23] M.C. Vidal-Carou, M.L. Latorre-Moratalla, S. Bover-Cid, Biogenic amines, in: L.M.L. Nollet, F. Toldrà (Eds.), *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*, CRC Press, Boca Raton, 2011, pp. 399–420.
- [24] M.L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, T. Lavizzari, S. Bover-Cid, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7715–7720.
- [25] M. Thompson, R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855.
- [26] T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, A sensitive and selective determination method of histamine by HPLC with intramolecular excimer-forming derivatization and fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 509–516.
- [27] Fact Sheet on Histamine and 1-Methylhistamine, *Neurochemistry Laboratory of the Sydney South West Pathology Service*, 2016, <http://www.sshd.nsw.gov.au/SSW/PS/> (Accessed 8 June 2016).
- [28] B. Töndury, B. Wüthrich, P. Schmid-Grendelmeier, B. Seifert, B.K. Ballmer-Weber, Histamine intolerance: is the determination of diamine oxidase activity in the serum useful in routine clinical practice? *Allergologie* 31 (2008) 350–356.
- [29] H. Kofler, W. Aberer, M. Beibl, T. Hawranek, G. Klein, N. Reider, N. Fellner, Diamine oxidase (DAO) serum activity: not a useful marker for diagnosis of histamine intolerance, *Allergologie* 32 (2009) 105–109.



#### 4.4. Estudi del perfil d'eliminació d'histamina i metilhistamina en orina per a l'eventual caracterització de persones intolerants a la histamina

### RESULTATS PENDENTS DE PUBLICACIÓ

#### PLANTEJAMENT I OBJECTIU

L'interès per identificar potencials marcadors no invasius que facilitin informació sobre la capacitat de l'organisme per degradar la histamina va motivar el desenvolupament del mètode analític per a la determinació d'histamina i metilhistamina en orina (apartat 4.3.1). Per tal de valorar la utilitat diagnòstica que pot presentar en un futur aquesta tècnica és condició *sine qua non* estudiar si els individus amb intolerància a la histamina presenten un perfil de distribució de la histamina i metilhistamina en orina significativament diferent al dels individus sense aquesta intolerància. Amb aquesta finalitat, també es va avaluar la idoneïtat d'una mostra d'orina puntual (i.e. *spot urine sample*) per tal de garantir la comoditat en la recollida de mostra per a la futurible aplicació rutinària d'aquesta prova.

#### METODOLOGIA

Es va comparar l'excreció urinària d'histamina i metilhistamina entre mostres de 24 hores i mostres d'orina puntuals (primera hora del matí) en un subgrup de 14 voluntaris sans.

L'estudi dels metabòlits de la histamina es va dur a terme amb la orina de primera hora d'un total de 66 voluntaris adults. Les persones amb intolerància a la histamina ( $n = 22$ , edat mitja =  $46,8 \pm 9,7$  anys, 100% dones) es van reclutar d'un centre de nutrició i dietètica especialitzat en dèficit de DAO (AD-Dietistes, Barcelona). Aquests pacients presentaven un mínim de 2 símptomes associats a aquesta intolerància i reportaven una relació entre l'aparició o exacerbació d'aquesta simptomatologia amb el consum de certs aliments potencialment rics en histamina. En el moment de la recollida de la mostra, els pacients iniciaven el seguiment d'una dieta baixa en histamina. Únicament 7 pacients presentaven un dèficit d'enzim DAO a nivell plasmàtic ( $< 80$  HDU/mL). Els individus del grup control ( $n = 42$ , edat mitja =  $31,5 \pm 5,2$  anys, 67% dones) eren voluntaris reclutats al Campus de

l'Alimentació de Torribera (Santa Coloma de Gramenet) amb absència de símptomes associats a la intolerància a la histamina (absència total o presència d'un símptoma com a màxim) i sense altres intoleràncies o al·lèrgies alimentàries.

L'anàlisi d'histamina i metilhistamina en mostres d'orina es va dur a terme a través de la metodologia prèviament desenvolupada i validada (apartat 4.3.1) que consisteix fonamentalment en un procés de purificació i concentració dels analits i la seva posterior separació cromatogràfica i quantificació mitjançant UHPLC-FL. Per tal de normalitzar els valors d'excreció urinària, es va efectuar la determinació de la creatinina en orina a través del mètode colorimètric del picrat alcalí (reacció de Jaffé) adaptat a microplaques (Thermo Scientific™ 96-Well Microtiter Microplates) [160]. Breument, 3 µL d'orina es barregen amb 60 µL de solució aquosa d'àcid pícric (1%) i 5 µL d'hidròxid de sodi (10%), s'agiten i la mescla es deixa reposar durant 15 minuts a la foscor i temperatura ambient. Posteriorment, s'addicionen 232 µL d'aigua Milli-Q i s'efectua la lectura de l'absorbància a 500 nm en un espectrofotòmetre UV/VIS. La concentració d'histamina i metilhistamina en orina s'expressà en µg d'analit per g de creatinina.

La significació estadística de la diferència entre les mostres d'orina va ser avaluada amb la prova t de Student per a dades aparellades o no aparellades, tenint en compte les característiques de cada cas. També es va emprar el coeficient de correlació de Pearson per tal d'estimar la bondat de la correlació entre les mostres d'orina de 24 hores i les mostres d'orina puntuals.

Els voluntaris van rebre un kit informatiu que consistia en un full d'informació que detallava l'objectiu i condicions de l'estudi, un document de consentiment informat, un qüestionari per a la recollida de dades i un protocol de recollida de mostres d'orina. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona (*Institutional Review Board IRB00003099*).

## RESULTATS

### Estudi de la validesa d'una mostra d'orina puntual

La mostra d'orina puntual és el tipus de mostra urinària més freqüentment emprat actualment en el disseny d'estudis clínics, ja que la recollida de mostres d'orina de 24 hores no resulta pràctic. Per aquest motiu, en una fase prèvia es va voler avaluar la idoneïtat d'una mostra puntual (primera hora del matí) per a la determinació del perfil d'excreció urinària d'histamina i metilhistamina.

El valor mig d'histamina en mostres de primera hora i de 24 hores va ser de  $30,9 \pm 17,3 \mu\text{g/g}$  de creatinina i  $30,0 \pm 14,7 \mu\text{g/g}$  de creatinina, respectivament. Per a la metilhistamina, l'excreció mitja en mostres de primera hora va ser de  $143,5 \pm 43,0 \mu\text{g/g}$  de creatinina i en mostres de 24 hores de  $145,1 \pm 41,1 \mu\text{g/g}$  de creatinina. En la figura 13 es pot observar la correlació lineal entre les mostres d'orina de primera hora del matí i de 24 hores tant pel que fa al contingut d'histamina com de metilhistamina. Per tant, no existeixen diferències significatives en l'excreció urinària d'histamina ( $p = 0,952$ ,  $t = 0,551$ ) i metilhistamina ( $p = 0,957$ ,  $t = 0,643$ ) entre els diferents tipus de mostra de cadascun dels individus.

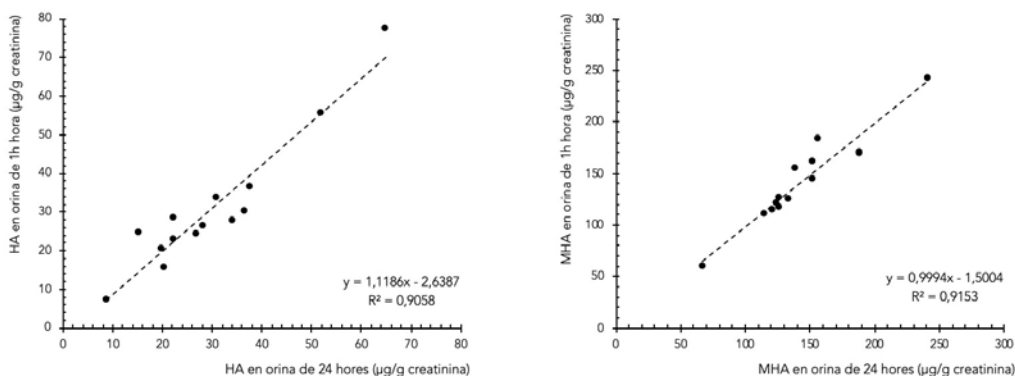


Figura 13. Relació entre l'excreció d'histamina (esquerra) i metilhistamina (dreta) en mostres d'orina de primera hora i de 24 hores de 14 voluntaris sans.



## Perfil d'eliminació d'histamina i metilhistamina en individus sans i persones intolerants a la histamina

L'excreció mitjana de creatinina en orina es va trobar dins els valors de normalitat tant en el grup control ( $1,33 \pm 0,6$  mg/mL) com per a les persones amb intolerància a la histamina ( $1,36 \pm 0,7$  mg/mL) i sense diferències significatives entre ambdós grups d'estudi ( $p = 0,894$ ) [161].

La figura 14 mostra la distribució dels continguts d'histamina i metilhistamina en orina de la població control i d'individus amb intolerància a la histamina. Els valors dels dos analits van mostrar una àmplia variabilitat per ambdós grups d'estudi, especialment en el cas de la metilhistamina, amb una amplitud interquartílica (IQR) de  $63,8 \mu\text{g/g}$  de creatinina i  $43,3 \mu\text{g/g}$  de creatinina en el grup control i les persones intolerants, respectivament.

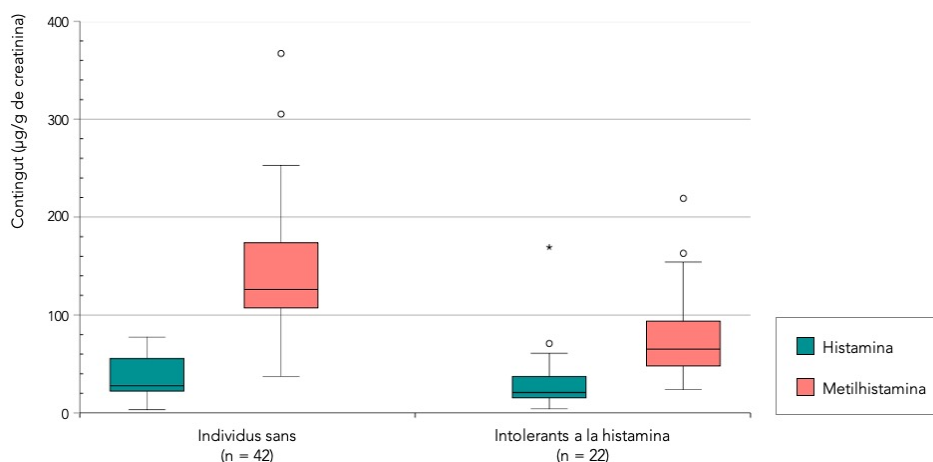


Figura 14. Distribució dels continguts d'histamina i metilhistamina en orina de primera hora del matí de la població control i persones intolerants a la histamina. Les línies situades a la part inferior i superior de la caixa indiquen el percentil-25 i el percentil-75, respectivament. La línia central representa la mediana i les línies que s'estenen verticalment des de les caixes (bigotes) indiquen la variabilitat que excedeix l'IQR. Els valors considerats estadísticament com a *outliers* s'il·lustren amb un cercle (dada atípica) o un asterisc (dada extremadament atípica).

Pel que fa a l'excreció urinària d'histamina, no es van obtenir diferències estadísticament significatives ( $p = 0,695$ ) entre la població control ( $34,7 \pm 21,7 \mu\text{g/g}$

de creatinina) i els individus amb intolerància a la histamina ( $31,9 \pm 35,0 \mu\text{g/g}$  de creatinina). Per altra banda, l'excreció urinària de metilhistamina de les persones amb intolerància a la histamina ( $79,3 \pm 48,6 \mu\text{g/g}$  de creatinina) va ser significativament inferior a la de les persones sanes ( $145,1 \pm 64,8 \mu\text{g/g}$  de creatinina) ( $p = 0,0001$ ).

En estratificar el grup d'intolerants a la histamina en funció de la presència o absència de dèficit de DAO plasmàtic, no s'observen diferències significatives en el contingut urinari d'histamina ( $p = 0,500$ ) i metilhistamina ( $p = 0,438$ ) (Figura 15). Per tant, sí que sembla que el perfil metabòlic de la histamina en orina de persones intolerants a la histamina va ser significativament diferent al del grup control. A més, mentre que la mesura de l'activitat DAO plasmàtica només va ser capaç d'identificar positivament 7 de les persones amb símptomes d'intolerància, l'excreció de metilhistamina va permetre diferenciar la població intolerant de la població sense símptomes de la intolerància a la histamina.

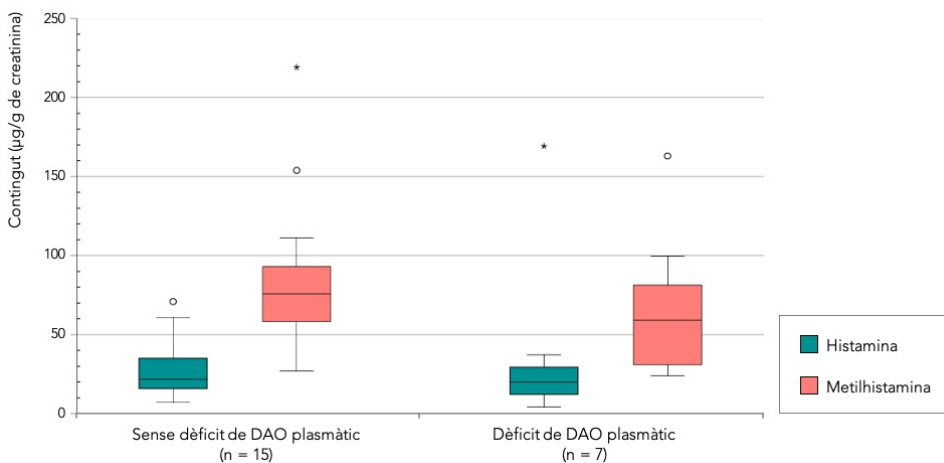


Figura 15. Distribució dels continguts d'histamina i metilhistamina en orina de primera hora del matí de persones intolerants a la histamina amb i sense dèficit de DAO. Les línies situades a la part inferior i superior de la caixa indiquen el percentil-25 i el percentil-75, respectivament. La línia central representa la mediana i les línies que s'estenen verticalment des de les caixes (bigotis) indiquen la variabilitat que excedeix l'IQR. Els valors considerats estadísticament com a *outliers* s'il·lustren amb un cercle (dada atípica) o un asterisc (dada extremadament atípica).

Tenint en compte que el grup d'intolerants a la histamina estava constituït íntegrament per dones, es van comparar els nivells d'excreció d'ambdós analits en funció del sexe dels individus. Mentre que no es va observar diferències significatives en la concentració d'histamina i metilhistamina entre homes i dones del grup control ( $p = 0,241$  i  $p = 0,665$ , respectivament), sí que es va mantenir la significació estadística per a la metilhistamina entre les dones del grup control i les pacients amb símptomes d'intolerància a la histamina ( $p = 0,0005$ ).

Els pacients amb intolerància a la histamina van presentar una mitja de  $4,5 \pm 1,1$  símptomes, i un 82% dels pacients van reportar la presència de combinacions de més de 3 símptomes. La simptomatologia més freqüent va ser de caire gastrointestinal (100% dels pacients), seguida per les afectacions dermatològiques (86%). De fet, més del 80% dels pacients van manifestar patir la combinació de simptomatologia gastrointestinal i dermatològica simultàniament. No es van observar diferències significatives pel que fa a les manifestacions clíniques reportades en funció del valor d'activitat DAO plasmàtica ( $p = 0,244$ ) ni una correlació entre els nivells d'excreció d'histamina o metilhistamina i la freqüència o tipologia d'aquesta simptomatologia.

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS

- S'ha confirmat la validesa de la recollida d'una mostra d'orina puntual (primera hora del matí) per a la determinació del perfil de la excreció urinària d'histamina i metilhistamina.
- No s'observen diferències estadísticament significatives en el nivell d'histamina en orina entre persones amb i sense símptomes de la intolerància a la histamina.
- Les persones amb intolerància a la histamina mostren una excreció urinària de metilhistamina significativament menor en comparació amb la població control.
- No s'han observat diferències en el perfil urinari d'histamina i metilhistamina en persones amb i sense dèficit de DAO plasmàtic.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



Les persones amb símptomes d'intolerància a la histamina mostren un perfil d'excreció urinari d'histamina i metilhistamina modificat, amb una reducció significativa del nivell del metabòlit metilat de la histamina.





## ÀMBIT 4

# Enzim DAO exogen com a tractament preventiu de la intolerància a la histamina

### OBJECTIU 5.

Desenvolupar un mètode que permeti la determinació *in vitro* de la capacitat de degradar histamina de diverses matrius.

### OBJECTIU 6.

Contribuir al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí.

### OBJECTIU 7.

Cercar noves fonts d'enzim DAO: potencial dels llegums com a nova font d'enzim DAO per al tractament de la intolerància a la histamina.



#### 4.5. Desenvolupament d'un mètode per a la determinació de la capacitat de degradar histamina de diverses matrius

##### PUBLICACIÓ 5

**In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL**

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411, 7595-7602.

Índex d'impacte (JCR 2019): 3,637

Posició en l'àrea "Analytical Chemistry": Q1 (18/86)

##### SOL·LICITUD DE PATENT

**Procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa**

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

*Oficina Espanyola de Patents i Marques*, 2020.

Registre de la patent: P32924ES00.

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 4

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Salvador Hernández-Macias, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Determination of histamine-degrading activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL.** *Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2019, Alicante.

##### PLANTEJAMENT I OBJECTIU

La suplementació amb enzim DAO exogen s'ha proposat com una estratègia complementaria a la dieta baixa en histamina per al tractament de la intolerància a la histamina que consisteix en aportar l'enzim a nivell intestinal per ajudar a degradar la histamina procedent dels aliments. Actualment, els complements existents al mercat contenen extracte de ronyó porcí com a font d'enzim DAO, encara que també s'han descrit altres teixits amb continguts destacables d'aquest enzim, com és el cas de les llavors de pèsol germinades.



D'entre les poques tècniques descrites per determinar l'activitat DAO, la majoria són mètodes espectrofotomètrics basats en la quantificació de la degradació o generació de compostos involucrats en la reacció de desaminació, com ara l'oxigen o el peròxid d'hidrogen. Aquestes tècniques presenten una sensibilitat limitada en l'anàlisi de mostres poc purificades i es veuen influenciades per altres activitats enzimàtiques concomitants a l'enzim DAO, com és el cas de la catalasa, que provoquen una infravaloració d'aquesta activitat. Per altra banda, existeixen tècniques per radioimmunoassaig que ofereixen una major sensibilitat, encara que comporten desavantatges pel que fa a la seguretat i gestió de residus radioactius. En tots els casos, els substrats de la reacció més freqüentment utilitzats són putrescina i cadaverina, dues amines biògenes que presenten diferent afinitat i paràmetres cinètics que la histamina. Per tant, s'ha fet evident la necessitat de disposar de tècniques analítiques més adequades per avaluar l'activitat enzimàtica dels complements de DAO i dels ingredients actius que els componen.

En aquest context, s'ha desenvolupat i validat un mètode analític per a la determinació de l'activitat DAO *in vitro* de diferents matrius font d'enzim DAO emprant histamina com a substrat i basat en la quantificació directa de la seva degradació al llarg de la reacció enzimàtica per UHPLC-FL.

A més, també s'ha posat a punt una variant/modificació del mètode en el que la tècnica UHPLC es troba acoblada a espectrofotometria de masses en tàndem (MS/MS) que permet la determinació de l'activitat DAO sense necessitat de derivatitzar el substrat. Aquesta característica va suposar un avantatge analític respecte la resta de mètodes existents i va fer que la tècnica fos susceptible de patent.

## METODOLOGIA

Les dues aproximacions desenvolupades per a la determinació de l'activitat DAO *in vitro* consisteixen en un assaig enzimàtic acoblat a la determinació cromatogràfica de la histamina degradada al llarg d'un temps determinat. Concretament, la mostra s'incuba en presència d'una concentració coneguda d'histamina (45  $\mu\text{M}$ ) i s'extreuen alíquotes a diferents temps de reacció. La histamina romanent s'analitza de forma ràpida i inequívoca per:

- a) UHPLC amb derivatització post-columna amb OPA i detecció fluorimètrica,
- b) UHPLC i detecció per espectrometria de masses en tàndem amb ionització per electroesprai (UHPLC-ESI-MS/MS).

L'activitat DAO s'expressa en nmol d'histamina degradada en un minut per un mil·ligram de mostra (mU/mg). El potencial efecte interferent de la catalasa es va assajar incubant aquest enzim juntament amb la DAO durant l'assaig enzimàtic.

## RESULTATS

La metodologia proposada es mostrà com un procediment lineal, sensible, precís i amb un elevat grau de recuperació per a la determinació de l'activitat DAO *in vitro* tant en mostres d'origen animal com vegetal. Concretament, el mètode manté una linealitat satisfactòria en el rang d'activitats enzimàtiques compreses entre 0,7 mU i 4,5 mU. La sensibilitat del mètode es determinà amb un límit de detecció de 0,025 mU i un límit de quantificació de 0,038 mU. Pel que fa a la precisió, es van obtenir desviacions estàndard relatives inferiors al 3% per ambdues matrius, i els assajos de recuperació van reportar percentatges que no diferien del valor teòric de 100% ( $p > 0,05$ ) per a qualsevol dels 3 nivells d'addició considerats. Així mateix, l'activitat DAO no va diferir significativament en absència o presència de catalasa ( $p > 0,05$ ), i amb independència de la concentració d'aquesta addicionada a la mostra.

En termes d'aplicabilitat, el mètode desenvolupat va permetre determinar la capacitat de degradar histamina de 13 lots diferents d'extracte de ronyó porcí (valor mig de  $0,23 \pm 0,01$  mU/mg), així com de 7 lots dels brots de pèsol liofilitzats ( $0,40 \pm 0,01$  mU/mg). L'activitat DAO *in vitro* de 6 complements alimentosos del mercat va variar àmpliament, amb valors que oscil·laven entre els 0,04 i els 0,20 mU/mg, malgrat estar tots formulats, segons la informació de l'etiquetatge, amb la mateixa quantitat de matèria primera (4,2 mg d'extracte de ronyó porcí).

A més, es va determinar l'activitat DAO en dos lots d'extracte de ronyó porcí, brots de pèsol liofilitzats i complements d'enzim DAO mitjançant UHPLC-ESI-MS/MS. L'activitat enzimàtica de cada tipologia de producte no va diferir de l'obtinguda pel mètode descrit a l'apartat previ (UHPLC-FL) en què la determinació de la histamina

romanent al llarg del temps s'efectua a través de la seva derivatització química i posterior detecció fluorimètrica.

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS

- S'ha desenvolupat un nou mètode per determinar l'activitat DAO *in vitro* de diferents matrius alimentàries que utilitza histamina com a substrat i es basa en la quantificació directa de la seva degradació al llarg de temps de reacció.
- Aquest mètode presenta una elevada sensibilitat que en fa possible l'aplicació en matrius complexes no purificades, com ara aliments i potencialment mostres biològiques.
- Així mateix, aquest mètode evita la interferència d'altres enzims concomitants en diverses matrius complexes, com és el cas de la catalasa, que resultava un factor interferent en gran part dels mètodes disponibles.
- La determinació de l'activitat DAO a través d'una aproximació MS/MS evita la derivatització del substrat, fet que suposa un avantatge respecte a les tècniques existents fins al moment. Aquest mètode ha sigut objecte d'una sol·licitud de patent.
- Els brots de pèsol liofilitzats mostren una activitat DAO *in vitro* superior a la de l'extracte de ronyó porcí.
- Aquest treball és un punt de partida que facilita la recerca de noves fonts d'enzim DAO de diferents orígens i permet estudiar la influència de múltiples factors sobre aquesta activitat enzimàtica.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



Un nou mètode per mesurar l'activitat DAO ha permès confirmar aquesta activitat enzimàtica en extracte de ronyó porcí, en els complements alimentosos que el contenen i també en brots de pèsol.







## In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL

Oriol Comas-Basté<sup>1,2,3</sup> · M. Luz Latorre-Moratalla<sup>1,2,3</sup> · Sònia Sánchez-Pérez<sup>1,2,3</sup> · M. Teresa Veciana-Nogués<sup>1,2,3</sup> · M. Carmen Vidal-Carou<sup>1,2,3</sup>

Received: 25 April 2019 / Revised: 17 September 2019 / Accepted: 27 September 2019 / Published online: 26 October 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Intestinal diamine oxidase (DAO) acts as a protective barrier against exogenous histamine. A deficit of DAO activity can lead to the appearance of histamine intolerance, a clinical condition that may be treated by a low-histamine diet and oral DAO supplementation to enhance intestinal histamine degradation. As sources of DAO, porcine kidneys and certain legume seedlings are suitable components for the formulation of a DAO supplement. The aim of this work was to develop a rapid and reliable methodology for the in vitro determination of DAO activity in food matrices based on an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. The proposed method showed a satisfactory linearity and sensitivity and provided a relative standard deviation lower than 3%, guaranteeing method precision, and a mean recovery greater than 99% both for lyophilized pea sprouts and porcine kidney protein extracts. A high specificity is a key attribute of this method due to the use of histamine as the reaction substrate and the direct quantification of its degradation. Moreover, the lack of interference of catalase and hydrogen peroxide is another advantage in comparison with previously published methods. Lyophilized pea sprouts showed the greatest histamine-degrading activity ( $0.40 \pm 0.01$  mU/mg), followed by porcine kidney protein extracts ( $0.23 \pm 0.01$  mU/mg) and commercial DAO supplements ( $0.09 \pm 0.06$  mU/mg). This technique could be used as a tool to validate the DAO activity of food matrices of potential interest for the treatment of histamine intolerance.

**Keywords** UHPLC-FL · Enzymatic assay · Histamine · Diamine oxidase (DAO) enzyme · Porcine kidney · Pea sprouts

### Introduction

The enzyme with histamine-degrading capacity, discovered in 1929 by Charles H. Best in autolyzing lung tissues, was first known as histaminase [1]. After subsequent studies revealed its ability to deaminate other diamines, such as putrescine and cadaverine, the enzyme was renamed diamine oxidase (DAO) [2, 3]. DAO (EC 1.4.3.22), which belongs to the category of

copper-containing amine oxidases, is a homodimeric and ubiquitous enzyme found in microorganisms, plants, and animals, generally in the range of 140 to 200 kDa [4–8]. In particular, DAO catalyzes the oxidative deamination of the primary amino group of histamine to imidazole acetaldehyde, consuming dioxygen with the concomitant release of stoichiometric amounts of ammonia and hydrogen peroxide (Fig. 1) [9, 10].

In humans, DAO is mainly located in the intestines, placenta, and kidneys [6, 11]. Intestinal DAO acts as a protective barrier against exogenous histamine, especially of food origin [12–14]. A deficiency of DAO enzyme may thus lead to excess the normal plasmatic levels of histamine (0.3–1.0 ng/mL) and the subsequent appearance of histamine intolerance symptoms [15, 16]. Due to the diverse effects and functions of histamine in multiple organs and systems of the body, histamine intolerance is characterized by a variety of complaints, including gastrointestinal (abdominal pain, diarrhea, or vomiting), dermatological (urticaria, dermatitis, or pruritus), respiratory (rhinitis, nasal congestion, or asthma),

✉ M. Carmen Vidal-Carou  
mcvidal@ub.edu

<sup>1</sup> Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>2</sup> Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>3</sup> Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA), C/ Baldrii Reixac 4, 08028 Barcelona, Spain



Fig. 1 Oxidative deamination of histamine by DAO

cardiovascular (hypotonia or arrhythmias), or neurological (headaches) [14–17]. The most frequently used treatment for histamine intolerance consists of following a low-histamine diet [15, 18]. Only foods with histamine levels below detectable limits can be considered safe for histamine-intolerant patients, and unfortunately for this population, histamine is widespread among all food categories in highly variable concentrations [19, 20]. In this context, considering that DAO is the key enzyme in the breakdown of dietary histamine at the intestinal level, orally administered DAO supplements have been proposed as a strategy to enhance histamine degradation and improve the quality of life of intolerant individuals undergoing those dietary restrictions [21, 22]. As sources of DAO, porcine kidneys and certain legume seedlings are suitable components of such an enzymatic supplement [21, 23].

A wide range of methods to detect *in vitro* DAO activity are described in the literature. With the aim of measuring the rate of substrate degradation or the generation of by-products of this enzymatic reaction, most methods are based on the detection of hydrogen peroxide, aldehyde, or dioxygen by spectrophotometric [13, 21, 24, 25], fluorometric [26], polarographic [27, 28], or amperometric [29, 30] techniques. Radioimmunoassay techniques have also been extensively described, consisting of the radioactive labeling of the substrate and the scintillation counting of its consumption [3, 11, 31]. Although chromatographic analytical procedures are widely used, this approach has only been applied to measure histamine or other biogenic amine degradation capacity in microbial starter cultures involved in food-fermenting processes [10, 32, 33]. Despite some of these methods may be advantageous in terms of rapidity or automation, they generally have a limited sensitivity, require a laborious experimental setup, or entail a high cost in the correct storage and handling of radioactive waste. Moreover, in those methods in which the DAO activity is estimated through the determination of hydrogen peroxide or dioxygen, the action of other enzymes, such as catalase, may interfere by  $\text{H}_2\text{O}_2$  consuming or  $\text{O}_2$  releasing [34, 35]. Additionally, the most extensively used reaction substrates in the methods reported so far are putrescine and cadaverine, which have different affinity or kinetic parameters to histamine [36, 37].

Therefore, the aim of this work was to develop a reliable, rapid, and highly sensitive methodology for the determination of *in vitro* DAO activity of several matrices using histamine as the substrate and based on the direct quantification of its degradation during the reaction process. Specifically, an enzymatic assay coupled to an ultra-high performance liquid

chromatography and fluorimetric (UHPLC-FL) detection method was proposed, validated, and tested for applicability in porcine kidney protein extracts, legume sprouts, and commercialized DAO supplements.

## Material and methods

### Reagents and chemicals

Histamine dihydrochloride, purified DAO from porcine kidney, and catalase from bovine liver were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). UHPLC-grade methanol and acetonitrile, hydrochloric acid 0.1M, perchloric acid 70%, sodium di-hydrogen phosphate anhydrous, and disodium hydrogen phosphate anhydrous were obtained from PanReac Química (Castellar del Vallès, Spain). Acetic acid, boric acid, 1-octanesulfonic acid sodium salt, ammonium formate, phthaldialdehyde (OPA), and brij® L23 solution were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); and formic acid, sodium acetate anhydrous, potassium hydroxide, and 2-mercaptoethanol from Merck (Darmstadt, Germany). A LaboStar System from Evoqua Water Technologies (Warrendale, PA, USA) was used to produce ultrapure water (18.2 MΩcm).

### Samples

For the analytical method development and validation, porcine kidney protein extracts and lyophilized pea sprouts (*Pisum sativum*) were used. Porcine kidney extracts were provided by a biotechnology company specialized in the extraction of biomolecules from animal tissues. These extracts consisted of a homogenate powder obtained by an acetic extraction followed by a drying process. Porcine kidney extracts consisted of 84% of protein, estimated by applying the nitrogen-to-protein conversion factor (6.25) to the total nitrogen determined following the Kjeldahl method (2200 Kjeltec® Auto Distillation Unit, Foss Iberia S.A.U., Barcelona, Spain). Etiolated pea sprouts were obtained in our laboratory through the germination of peas at 27 °C and 70% HR. After the sprouts were freeze-dried (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Spain), a lyophilized extract consisting of 39% of protein was obtained. Samples were kept under refrigeration (4–8 °C) until analysis.

The applicability of the method was assayed with 13 different production batches of porcine kidney protein extract, 7

batches of lyophilized pea sprouts and 6 commercialized DAO supplements available in the market. These dietary supplements were in the form of gastro-resistant-coated capsules or tablets, all of them containing 4.2 mg of porcine kidney protein extract.

### In vitro determination of DAO activity

The capacity of the DAO enzyme to degrade histamine in a working solution with a defined initial concentration of histamine was tested under controlled optimal conditions (37 °C, pH 7.2). The subsequent analysis of degraded histamine during the reaction time was performed by UHPLC-FL. Specific DAO activity is expressed in mU/mg, referring to the amount of histamine that is degraded by a milligram of sample per minute (nmol of degraded histamine per minute/mg of sample).

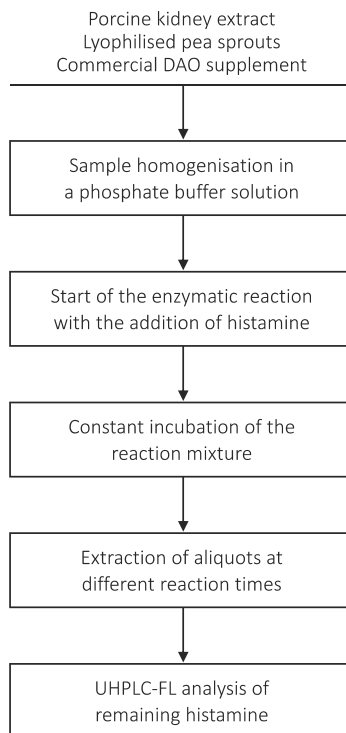
### Enzymatic assay

Figure 2 illustrates in a schematic manner the experimental procedure of the enzymatic assay for the in vitro determination of DAO activity. In detail, 1 to 20 mg of porcine kidney protein extract, lyophilized pea sprouts, or the content of one tablet or capsule of dietary supplement were thoroughly homogenized in 20 mL of 0.05M phosphate buffer solution (pH 7.2) and placed in a shaker incubator (Ivymen® 100-D, JP SELECTA S.A., Abrera, Spain) for at least 30 min (37 °C, 200 rpm). The addition of a histamine standard solution to reach an initial concentration of 45 µM in the homogenized sample marked the start of the enzymatic reaction. The enzyme in contact with its substrate was kept in constant incubation and 500 µL aliquots were progressively extracted at different sampling times ( $t = 0, 1, 2, 4, \text{ and } 6 \text{ h}$ ). To stop the enzymatic reaction, 15 µL of 2N perchloric acid solution was added to the extracted aliquot, vigorously mixed with a vortex mixer, and centrifuged (4 °C, 5 min, 15000 rpm). The supernatant was filtered through a 0.22-µm GHP filter and stored at 4 °C until UHPLC analysis. Each sample was analyzed in duplicate and a positive control was performed with 1 mg of purified DAO.

To assay the potential interference effect of catalase on the DAO activity determination, porcine kidney protein extract was assayed with the addition of catalase enzyme at two different concentrations (100 and 500 U/mL) using the same experimental procedure.

### UHPLC-FL analysis

Chromatographic separation was performed using a UHPLC-FL system consisting of a Waters Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography apparatus, which comprised a quaternary pump, an auto-sampler and a fluorescence



**Fig. 2** Schematic experimental procedure of the enzymatic assay for the in vitro determination of DAO activity

detector, and a post-column reagent manager connected to a zero dead volume union between the column outlet and the detector. Data acquisition was performed using the Empower™ 3 software (Waters Corp., Milford, MA, USA).

The chromatographic determination of histamine was performed by ion-pair reverse-phase UHPLC coupled with post-column online derivatization with OPA and fluorescence detection. Elution time was 7 min. Chromatographic conditions were as previously described by Latorre-Moratalla et al. [38], briefly summarized in Table 1.

### Statistical analysis

The software package IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) for Windows (version 22) was used for the statistical analysis of data. The reliability of the method was tested by means of analysis of variance for linear regression and the data sets were compared using the Student's *t* test. Cochran's *C* test was used to assess the homogeneity of variances.



**Table 1** Chromatographic conditions for the UHPLC-FL determination of histamine

Stationary phase	
Column	Acquity UPLC™ BEH C18 column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm)
Column temperature	42 °C
Mobile phase	
Eluent A	H <sub>2</sub> O solution with 0.1 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (adjusted to pH 4.8 with acetic acid)
Eluent B	H <sub>2</sub> O solution with 0.2 M sodium acetate and 10 mM sodium octanesulfonate (adjusted to pH 4.5 with acetic acid); Acetonitrile (6.6:3.4)
Linear gradient	0 min, 80% A; 2 min, 80% A; 3 min, 60% A; 4 min 50% A; 5 min, 40% A; 6 min, 20% A; 6.40 min, 80% A; 7 min, 80% A
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	1 μL
Fluorescence detection	
Derivatization reagent	OPA (0.2 mg/mL), brij®, 2-mercaptoethanol, methanol, potassium hydroxide and boric acid
Excitation and emission wavelengths	340 nm and 445 nm
Flow rate	0.4 mL/min

## Results and discussion

The method developed in this work is based on the direct addition of a defined amount of histamine to a food matrix homogenized in an aqueous solution. During the incubation period of the mixture, the DAO enzyme potentially present in the sample progressively degrades the substrate. DAO activity was determined by comparing the absolute amount of histamine degraded during the reaction time with the initial substrate concentration. The absence of histamine degradation when assaying the same amount of substrate but lacking the DAO enzyme or samples as a negative control proved that the degradation of histamine in the proposed method is exclusively mediated by the enzyme.

The UHPLC-FL method allowed us to unequivocally determine the remaining histamine in the samples with a chromatographic elution time of 7 min and without the need for tedious pre-column derivatization procedures. The selected substrate concentration was 45 μM of histamine, in accordance with published kinetic data for DAO activity on this specific amine, to ensure optimal performance of the enzymatic reaction [9, 39, 40]. The degradation of histamine was monitored for 48 h to study the enzymatic reaction. A linear histamine degradation rate was observed in the first 6 h of the assay ( $r > 0.9990$ ) for both porcine and legume matrices.

### Method reliability

The linearity of the method was assessed by performing in triplicate seven determinations of different enzymatic activities using purified DAO and verified by analysis of the variance of the regression. A correlation coefficient of  $r = 0.9998$  and a coefficient of determination ( $r^2$ ) higher than 99% were

obtained ( $p < 0.001$ ), demonstrating the satisfactory performance of the method within the DAO activity range of 0.7 to 4.5 mU. Regarding method sensitivity, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were estimated using a regression curve with low DAO activity values and considering the mean response of a blank plus three or ten times the standard deviation of the blank, respectively [41]. Specifically, the value obtained for LOD was 0.025 mU, and for the LOQ, it was 0.038 mU.

The precision and recovery of the proposed method for routine analysis of DAO activity were assessed with different batches of porcine kidney protein extract and lyophilized pea sprouts. The precision was evaluated by performing 7 independent determinations of DAO activity for each food matrix (Table 2). The relative standard deviation was in both cases lower than 3%, showing a satisfactory level of precision. The Horwitz equation for intra-laboratory studies confirmed the acceptability of this precision data [42]. Recovery was evaluated by performing 7 independent determinations of porcine kidney extract and lyophilized pea sprouts, considering 3 addition levels with purified DAO (Table 2). The recovery values obtained for the three levels of addition were satisfactory and no statistical differences from the theoretical value 100% were found ( $p > 0.05$ ) [42]. The variance of the recovery values was not dependent on the content of the analyte according to Cochran's *C* test ( $p > 0.05$ ).

Among the range of methodologies described in the literature that challenge the determination of DAO activity, the majority are based on the measurement of the liberation of hydrogen peroxide or the consumption of oxygen occurring along the oxidative deamination reaction [13, 21, 24–30]. Those largely used approaches face an important drawback, as the presence of hydrogen peroxide and dioxygen may be

**Table 2** Precision and recovery results for porcine kidney extracts and lyophilized pea sprouts

	Precision		Recovery <sup>c</sup>			
	RSD (%) <sup>a</sup>	RSDH (%) <sup>b</sup>	Addition level I	Addition level II	Addition level III	Cochran's test $C_{exp}$ <sup>d</sup>
Porcine kidney extract	2.76	3.45-4.60	100.54 (4.98)	102.69 (5.44)	99.14 (2.52)	0.41
Lyophilized pea sprouts	2.80	3.27-4.36	101.28 (0.90)	100.00 (0.76)	100.51 (2.61)	0.05

<sup>a</sup> Relative standard deviation (RSD) for seven determinations

<sup>b</sup> Acceptable range for relative standard deviations according to the Horwitz equation for intra-laboratory studies (1/2–2/3 of the interlaboratory study calculate by the formula)

<sup>c</sup> Mean recovery percentages and standard deviation in parentheses for three addition levels corresponding to enzymatic activities of 0.5, 1.0, and 2.0 mU for porcine kidney extract and 1.0, 2.0, and 4.0 mU for lyophilized pea sprouts

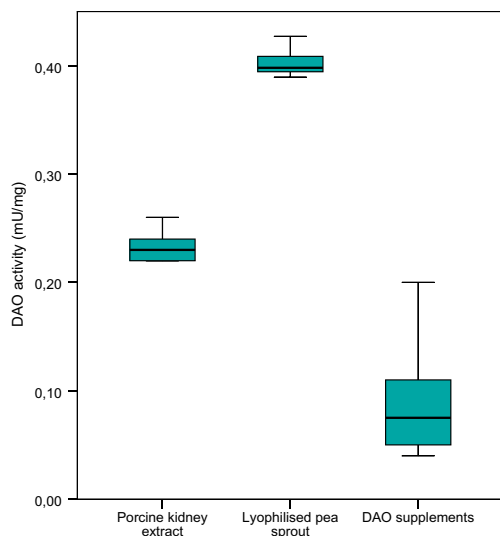
<sup>d</sup> Cochran's C variance outlier test,  $C_{tab}$  (6, 2, 0.05) = 0.8534.

markedly influenced by the concomitant presence of other enzymatic capacities in certain complex biological matrices [34, 35]. This is the case of catalase, an enzyme commonly found in plant and animal tissues, which can lead to the underestimation of DAO activity by consuming H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and releasing O<sub>2</sub> [34, 35]. Therefore, the frequent occurrence of catalase in DAO-positive matrices makes those techniques unadvisable due to major interference effect. In this sense, Ahmadifar et al. [35] have recently proposed a zymographic approach consisting in an electrophoretic separation of DAO enzyme followed by its densitometric image analysis capable to evaluate the DAO activity of a sample in the presence of interfering catalase. Concurrently, all those methods consisting in the monitoring of hydrogen peroxide release through a coupled reaction with peroxidase entail further complexities, such as a potential partial substrate inhibition produced by excess of hydrogen peroxide [43]. In general, coupled peroxidase assays may be targeted as unreliable when working with purified DAO enzyme and totally unadvisable when studying non-purified complex samples due to the presence of peroxidase inhibitors or other enzymatic activities [34, 44]. In fact, Calinescu et al. [34] evaluated the DAO capacity of formulation containing a vegetal extract with the presence of catalase, using both a peroxidase-coupled assay and an alternative assay non-related to peroxidase enzyme. In this context, the authors described the unsuitability of the peroxidase-coupled assay due to the diminution of released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by catalase enzyme, emphasizing the need to seek for enzymatic tests not affected by the presence of catalase [34]. In this sense, methods based in the direct measurement of the degradation of the amine substrate, hitherto scarcely described in the literature, may overcome this limitation. In the proposed method, DAO activity of the porcine kidney extract did not significantly differ ( $p > 0.05$ ) when it was determined with or without the addition of catalase, and independently of the concentration of this enzyme added to the sample. Therefore, the proposed method herein is not influenced by the presence of catalase present in the analyzed food matrices, since it is based in the direct determination of histamine.

Although the largely used spectrophotometric techniques seem to be sensitive enough for the analysis of samples with an elevated degree of purification, there is a lack of a reliable and sensitive methods that allow to determine DAO activity in complex biological or food matrices, which will not only contain several potential interferences but will also show relatively low enzymatic rate. In this case, radiochemical detection techniques based on the use of C<sup>14</sup>-labeled putrescine becomes the preferred approach [44]. However, while a high sensitivity may be attributed to the latter, serious concerns related to the hazardous potential in the handling of radioactive material and the high cost and unsuitability of its storage need to be considered. The proposed method shows the advantages of sensitivity, reproducibility, and automatization of an UHPLC approach while avoiding user-related hazardous potential and becomes a suitable approach to analyze DAO activity in complex non-purified matrices.

**Suitability of the method for the determination of DAO activity in porcine kidney protein extracts, lyophilized pea sprouts, and DAO supplements**

The applicability of the developed method was tested by analyzing several production batches of porcine kidney protein extract and lyophilized pea sprouts. Additionally, the enzymatic capacity of porcine kidney extract in DAO supplements available in the market was studied. All analyzed products showed in vitro histamine-degrading capacity (Fig. 3). Lyophilized pea sprouts were the most effective, with a mean enzymatic activity of 0.40 (± 0.01) mU/mg, compared with 0.23 (± 0.01) mU/mg for porcine kidney protein extracts. It is worth highlighting that the DAO activity of both products showed minimal variation among different production batches. These results are in good agreement with previously published data indicating a higher catalytic turnover rate for plant- than animal-derived DAO [5, 23, 37]. The amine-degrading capacity described in the literature for these food matrices is highly variable, with values ranging from 0.1 to 500 mU/mg. Different behavior toward the same amino



**Fig. 3** In vitro DAO activity of several production batches of porcine kidney protein extract, lyophilized pea sprouts, and different commercial DAO supplements

substrates has been reported for DAO enzymes depending on whether they are of animal or plant origin [37]. This heterogeneity could also be explained by differences in methodology between studies, as a range of detection techniques and substrates have been used. Thus, Kivirand et al. [7] suggested that the substrate specificity data available for DAO varied according to the experimental method and recognized an important difficulty to find comparable data due to the evidenced dispersion of methodological procedures. Concretely, the wide range of used substrates (i.e., putrescine, cadaverine, agmatine, histamine, spermidine, and spermine) may easily lead to differences in the reported enzymatic activities, as the affinity of DAO for each substrate varies [36, 37]. Due to the evidenced differences in kinetic parameters depending on the amino substrates, histamine is the optimal substrate in order to have an available methodology to determine the enzymatic activity of potential new sources of DAO, considering the degradation of this target substrate and no other amines.

Porcine kidneys and pea seedlings are the main sources of DAO according to the literature [21, 23], but it can also be found in other food products, such as certain legumes (*Cicer arietinum*, *Lathyrus sativus*, *Lens esculenta*), barley (*Hordeum vulgare*), maize (*Zea mays*), and tea (*Thea sinensis*) [21, 23, 36]. The method proposed here could be applied to validate the in vitro enzymatic capacity of these food matrices and to screen for new potential sources of DAO.

The DAO activity of the six commercial DAO supplements ranged widely from 0.04 to 0.20 mU/mg, despite all being

formulated with the same amount of porcine kidney extract (4.2 mg) (Fig. 3). In comparison with the raw porcine kidney extract ( $0.23 \pm 0.01$  mU/mg), a markedly lower DAO activity was generally observed in these supplements. The application of different galenic formulation processes may influence the enzymatic capacity of the kidney extract, which would explain both the variability and loss of activity of the DAO supplements. Further studies are required to understand how different technological parameters linked to the manufacturing process of these supplements influence the enzymatic activity. The variable activity of commercial DAO supplements could help explain the different efficacy rates reported by clinical studies evaluating the use of exogenous DAO to treat symptoms associated with histamine intolerance [22, 45–47].

Few studies have estimated the intestinal DAO activity in a healthy population. An enzymatic activity of 0.001–0.03 mU/mg has been reported in the intestinal mucosa, with higher values given for intestinal protein (0.2–0.33 mU/mg) [31, 48–50]. As indicated by the manufacturers, the usual posology of DAO supplements is 1 capsule before each meal, which provides an enzymatic activity in the range of 0.17 to 0.84 mU, depending on the product. In view of these results, more accurate studies are needed in order to establish the effective dosage of DAO that can provide a complementary intestinal protective barrier for histamine-intolerant individuals.

## Conclusion

The proposed method, consisting of an enzymatic assay coupled to a UHPLC-FL technique, allowed the in vitro determination of DAO activity in food matrices using histamine as the reaction substrate. This method provided satisfactory experimental performance in terms of linearity, sensitivity, precision, and recovery, and its suitability was tested on different food matrices reported as sources of DAO. The DAO activity of lyophilized pea seedlings was nearly two-fold higher than that of porcine kidney protein extracts. The histamine-degrading capacity of the six DAO supplements available in the market was variable and lower compared with the other analyzed matrices. Due to the growing awareness of histamine intolerance, it is important to have effective methods for validating the DAO activity of supplements and foods of potential interest for the treatment of this disorder.

**Acknowledgments** Sònia Sánchez-Pérez is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF2018).

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Best CH. The disappearance of histamine from autolysing lung tissue. *J Physiol.* 1929;67:256–63.
- Mondovi B, Rotilio G, Finazzi A, Scioscia-Santoro A. Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochem J.* 1964. <https://doi.org/10.1042/bj0910408>.
- Wolvekamp MC, de Bruin RW. Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig Dis.* 1994. <https://doi.org/10.1159/000171432>.
- Elmore BO, Bollinger JA, Dooley DM. Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *J Biol Inorg Chem.* 2002. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0331-1>.
- Masini E, Bani D, Marzocca C, Mateescu MA, Mannaioni PF, Federico R, et al. Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Sci World J.* 2007; <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.139>.
- Finney J, Moon HJ, Ronnebaum T, Lantz M, Mure M. Human copper-dependent amine oxidases. *Arch Biochem Biophys.* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.022>.
- Kivirand K, Sömerik H, Oldekop ML, Rebana R, Rinken T. Effect of spermidine and its metabolites on the activity of pea seedlings diamine oxidase and the problems of biosensing of biogenic amines with this enzyme. *Enzym Microb Technol.* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.09.007>.
- Razali NN, Hashim NH, ATC L, Salleh AB. Conformational design and characterisation of a truncated diamine oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *High Throughput.* 2018. <https://doi.org/10.3390/ht7030021>.
- Schwelberger HG, Bodner E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1340:152–64.
- Naila A, Flint S, Fletcher GC, Bremer PJ, Meerdink G, Morton RH. Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chem.* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.022>.
- Schwelberger HG, Feurle J, Houen G. New tools for studying old questions: antibodies for human diamine oxidase. *J Neural Transm.* 2013. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0936-2>.
- Aschenbach JR, Schwelberger HG, Ahrens F, Fülll B, Gäbel G. Histamine inactivation in the colon of pigs in relationship to abundance of catabolic enzymes. *Scand J Gastroenterol.* 2006. <https://doi.org/10.1080/00365520500419540>.
- Calinescu C, Federico R, Mondovi B, Mateescu MA. Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis. *Anal Bioanal Chem.* 2010; <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3306-7>.
- Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol.* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>.
- Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr.* 2007. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>.
- Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Bernacchia R, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *J Pharm Biomed Anal.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.029>.
- Jarisch R, Wantke F, Raitzel M, Hemmer W. Histamine and biogenic amines. In: Jarisch R, editor. *Histamine intolerance. Histamine and Seasickness.* Heidelberg: Springer Verlag GmbH; 2015. p. 3–44.
- Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Rabell-González J, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla ML, Vidal-Carou MC. Biogenic amines in plant-origin foods: are they frequently underestimated in low-histamine diets? *Foods.* 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7120205>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* 2011;9:2393.
- Latorre-Moratalla ML, Comas-Baste O, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food Chem Toxicol.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.011>.
- Jumarie C, Séide M, Marrocchi L, Pietrangeli P, Mateescu MA. Diamine oxidase from white pea (*Lathyrus sativus*) combined with catalase protects the human intestinal Caco-2 cell line from histamine damage. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2390-3>.
- Izquierdo-Casas J, Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Lorente-Gascón M, Duelo A, Soler-Singla L, et al. Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clin Nutr.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.013>.
- Blemur L, Le TC, Marrocchi L, Pietrangeli P, Mateescu MA. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016. <https://doi.org/10.1002/bab.1369>.
- Ebrahimnejad H, Gheisari H, Khan Nazer AH. Pea seedling amine oxidase application: an emerging antihistamine strategy in tuna fish. *J Food Process Technol.* 2013. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000242>.
- Leonida M, Belbekhouche S, Adams F, Bijja UK, Choudhary DA, Kumar I. Enzyme nanovehicles: histaminase and catalase delivered in nanoparticulate chitosan. *Int J Pharm.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.050>.
- Snyder SH, Hendley ED. A simple and sensitive fluorescence assay for mono-amine oxidase and diamine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968;163:386–92.
- Rinaldi A, Floris G, Finazzi-Agro A. Purification and properties of diamine oxidase from *Euphorbia latex*. *Eur J Biochem.* 1982. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06888.x>.
- Federico R, Befani O, Mondovi B, Mulhbachler J, Mateescu MA. Immobilization of plant histaminase for medical applications. *Inflamm Res.* 2000. <https://doi.org/10.1007/PL00000184>.
- Kivirand K, Rinken T. Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proc Estonian Acad Sci Chem.* 2007;56:164–71.
- Torre R, Costa-Rama E, Lopes P, Nouwsa HPA, Delerue-Matos C. Amperometric enzyme sensor for the rapid determination of histamine. *Anal Methods.* 2019. <https://doi.org/10.1039/c8ay02610f>.
- Lessof MH, Gant V, Hinuma K, Murphy GM, Dowling RH. Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity. *Clin Exp Allergy.* 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1990.tb02796.x>.
- Leuschner RG, Heidel M, Hammes WP. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00109-8).
- Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish starter microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5).
- Calinescu C, Mondovi B, Federico R, Ispas-Szabo P, Mateescu MA. Carboxymethyl starch: chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *Int J Pharm.* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.032>.
- Ahmadifar SM, Le TC, Marrocchi L, Pietrangeli P, Mateescu MA. Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Anal Chim Acta.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.006>.

36. Medda R, Padiglia A, Floris G. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*. 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00756-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00756-J).
37. Pietrangeli P, Federico R, Mondovi B, Mompurgo L. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J Inorg Biochem*. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014>.
38. 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. *J Chromatogr A*. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.072>.
39. Bouvrette P, Male KB, Luong JHT, Gibbs BF. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzym Microb Technol*. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00064-6).
40. Missbichler A, Mayer I, Pongracz C, Gabor F, Komericki P. Supplementation of enteric coated diamine oxidase improves intestinal degradation of food-borne biogenic amines in case of histamine intolerance. *Clin Nutr Suppl*. 2010. [https://doi.org/10.1016/S1744-1161\(10\)70019-3](https://doi.org/10.1016/S1744-1161(10)70019-3).
41. Thompson M, Ellison R, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2002. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.
42. Horwitz W, Albert R. The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int*. 2006;89:1095–109.
43. Childs RE, Bardsley WG. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J*. 1975. <https://doi.org/10.1042/bj1450093>.
44. Neufeld E, Chayen R. An evaluation of three methods for the measurement of diamine oxidase (DAO) activity in amniotic fluid. *Anal Biochem*. 1979. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90601-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90601-8).
45. Komericki P, Klein G, Reider N, Hawranek T, Strimitzer T, Lang R, et al. Histamine intolerance: lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien Klin Wochenschr*. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00508-010-1506-y>.
46. Manzotti G, Breda D, Gioacchino M, Burastero SE. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016. <https://doi.org/10.1177/0394632015617170>.
47. Yacoub MR, Ramirez GA, Berti A, Mercurio G, Breda D, Saporiti N, et al. Diamine oxidase supplementation in chronic spontaneous urticaria: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018. <https://doi.org/10.1159/000488142>.
48. Biegański T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD, Feussner KD. Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1983. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90092-2).
49. Küfner MA, Ulrich P, Raithe M, Schwelberger HG. Determination of histamine degradation capacity in extremely small human colon samples. *Inflamm Res*. 2001. <https://doi.org/10.1007/PL00022422>.
50. Petersen J, Raithe M, Schwelberger HG. Characterisation of functional polymorphisms of the human diamine oxidase gene. *Inflamm Res*. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-0426-6>.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P202030450	
Fecha de recepción:	15 mayo 2020, 14:48 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P32924ES00	
Solicitante:	Universitat de Barcelona	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DIAMINO OXIDASA (DAO)	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (13 p.) Reivindicaciones.pdf (3 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (3 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	EMAIL=patents@ponti.pro,CN=Joan Salva Ferrer,OU=www.verisign.com/repository/CPS Incorp. by Ref.\,LIAB.LTD(c)99,OU=WIPO Customer CA V2,O=World Intellectual Property Organization	
Fecha y hora de recepción:	15 mayo 2020, 14:48 (CEST)	
Codificación del envío:	FB:1B:E5:4B:B4:36:5E:1A:BA:AA:95:34:E1:D0:FE:36:DF:BE:50:A0	



<p>(6-2) INVENTOR 2:</p>	<p>FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: [ ]</p> <p>APELLIDOS: LATORRE MORATALLA NOMBRE: Maria Luz NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES</p> <p>DOMICILIO: LOCALIDAD:</p> <p>CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: [ ]</p>
<p>(6-3) INVENTOR 3:</p>	<p>APELLIDOS: VECIANA NOGUÉS NOMBRE: Maria Teresa NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES</p> <p>DOMICILIO: LOCALIDAD:</p> <p>CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: [ ]</p>
<p>(6-4) INVENTOR 4:</p>	<p>APELLIDOS: VIDAL CAROU NOMBRE: Maria del Carmen NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES</p> <p>DOMICILIO: LOCALIDAD:</p> <p>CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: [ ]</p>
<p>(7) TÍTULO DE LA INVENCION:</p>	<p>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DIAMINO OXIDASA (DAO)</p>
<p>(8) NÚMERO DE INFORME TECNOLÓGICO DE PATENTES (ITP):</p>	
<p>(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN</p>	<p>SI [ ] NO [✓]</p>
<p>(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:</p>	<p>SI [ ] NO [✓]</p>



## PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DIAMINO OXIDASA (DAO)

### Campo de la invención

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO).

### Antecedentes

10

La histamina [2-(4-imidazolil)-etilamina] es un importante mediador de muchos procesos biológicos, incluyendo la inflamación, la secreción de ácido gástrico, la neurotransmisión y la regulación de la función inmune. Los efectos fisiológicos de la histamina se producen a través de la interacción con cuatro receptores transmembrana (H1, H2, H3 y H4) distribuidos en diversos tejidos del organismo que activan las vías de transducción de señales al percibir la presencia de histamina [1]. Concentraciones altas de histamina desencadenan efectos no deseados, tales como cefalea, rinorrea, obstrucción de las vías respiratorias, taquicardia, dolencias gástricas e intestinales, erupción o eritema cutáneos, hipotensión, broncoespasmo, etc. [2].

20

La histamina se forma por descarboxilación del aminoácido L-histidina en una reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa. En el organismo se sintetiza y almacena en forma de gránulos, principalmente en basófilos y mastocitos, así como en células enterocromafines gástricas, nódulos linfáticos y el timo. Aunque la histamina se encuentra ampliamente distribuida, se han descrito concentraciones elevadas en los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal [1, 3].

25

La histamina también puede encontrarse en los alimentos donde se forma por la descarboxilación del aminoácido histidina por parte de microorganismos responsables de la alteración o fermentación de los alimentos [4]. Así, los alimentos susceptibles de contener niveles elevados de histamina serían los fermentados (vino, queso, embutidos, derivados fermentados de algunos vegetales) y los microbiológicamente alterados, como podría ser el caso de productos frescos (carne y pescado) o sus derivados que hayan podido elaborarse o conservarse en condiciones higiénicas inapropiadas. Ciertos alimentos pueden contener también histamina de origen endógeno, como por ejemplo los que contienen vísceras o sangre.

35

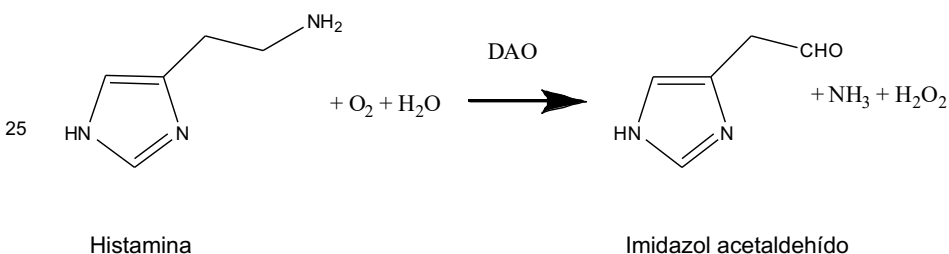
En humanos, las principales vías de inactivación de la histamina son por un lado la metilación del grupo amino secundario del heterociclo imidazol, catalizada por la histamina-N-metiltransferasa (HNMT, EC 2.1.1.8) para dar N-metilhistamina, y por otro, la desaminación oxidativa del grupo amino primario, catalizado por la diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22) para dar imidazol acetaldehído [5].

La HNMT se expresa en un amplio abanico de tejidos, entre los cuales destaca su presencia en riñones y hígado [2, 5]. En cambio, la enzima DAO se localiza principalmente en intestino delgado, colon ascendente, placenta y riñones. La elevada expresión de la DAO en el tracto gastrointestinal hace que esta enzima juegue un papel fundamental en la protección del organismo frente la histamina procedente de los alimentos [2, 5].

La DAO pertenece a la clase de las amino oxidasas dependientes de cobre y es un homodímero integrado por dos isoformas con un peso molecular de aproximadamente 182 kDa [6]. Además de la histamina, la DAO puede degradar otras aminas biógenas, especialmente las diaminas putrescina y cadaverina. Concretamente, la DAO cataliza la desaminación oxidativa de la histamina a su correspondiente aldehído, generando también cantidades estequiométricas de amoníaco y peróxido de hidrógeno.

20

Esquema 1



30

Un déficit de enzima DAO provoca un desorden en la homeostasis de la histamina que causa su acumulación en sangre y consecuentemente la aparición de efectos adversos [7]. Este trastorno se conoce como intolerancia a la histamina, síndrome de histaminosis enteral o sensibilidad a la histamina alimentaria y se caracteriza por la aparición de dos o más síntomas inespecíficos gastrointestinales (vómitos, náuseas, distensión abdominal), dermatológicos (prurito, eczema, urticaria), respiratorios (rinitis, rinoreas, disnea) y/o neurológicos (cefaleas, mareo) [2, 5, 7].

35

El dèficit de DAO puede tener una etiología genética. Ciertos polimorfismos de un nucleótido simple (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) en el gen que codifica la DAO (AOC1) están relacionados con una menor actividad enzimática [8, 9]. También se han identificado como posibles causas del dèficit de DAO algunas enfermedades  
5 inflamatorias intestinales, que limitan la secreción de la enzima, o la acción de algunos fármacos inhibidores de la DAO [2].

El tratamiento de la intolerancia a la histamina se basa en el seguimiento de una dieta baja en histamina y/o la suplementación exógena con enzima DAO que ayuda a  
10 degradar la histamina dietética a nivel intestinal [10]. Estos complementos contienen enzima DAO obtenida de extracto proteico de riñón de cerdo.

En este contexto, es importante disponer de un procedimiento para determinar la actividad DAO tanto en fuentes de enzima DAO para su uso en el tratamiento de la  
15 intolerancia a la histamina como en muestras biológicas por su interés diagnóstico.

Los procedimientos descritos en la literatura que determinan la actividad *DAO in vitro* consisten en la medida de la tasa de degradación o generación de las sustancias o productos de la reacción enzimática del esquema 1. En particular, la mayoría de  
20 procedimientos descritos se basan en la determinación espectrofotométrica de peróxido de hidrógeno, aldehído u oxígeno molecular [11–13] o en técnicas de radioinmunoensayo que consisten en el recuento por centelleo del consumo de un sustrato marcado radioactivamente [14]. Aunque menos usados, también existen procedimientos basados en la utilización de técnicas fluorométricas, polarográficas,  
25 amperométricas, citoquímicas, zimográficas, o incluso mediante inmunoensayos enzimáticos [15–20]. Los sustratos más frecuentemente usados en estos procedimientos son las diaminas putrescina y cadaverina.

Cabe indicar que todos estos métodos generalmente presentan una sensibilidad  
30 limitada y utilizan principalmente como sustrato de reacción otras diaminas, con una afinidad o parámetros cinéticos diferentes a los de la histamina [21, 22]. También es importante tener en cuenta que en aquellos métodos en los que la actividad DAO se estima a partir de la formación de peróxido de hidrógeno o de la degradación de oxígeno, la acción de otras enzimas frecuentemente presentes en muestras biológicas, tales  
35 como la catalasa, pueden interferir al consumir peróxido de hidrógeno o generar oxígeno [18, 23]. Además, los ensayos radiométricos requieren la manipulación de reactivos de tipo radiológico y una laboriosa configuración experimental, lo que se convierte en una

desventaja para su aplicación de rutina, y conlleva un alto costo de almacenamiento y de correcta gestión de los desechos radiactivos [13]. Por último, aquellos métodos descritos en la literatura hasta el momento que se basan en la medida de la desaparición del sustrato amino requieren siempre de una etapa previa de derivatización química del compuesto para su detección.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento con mejores prestaciones que los ya existentes. La presente invención proporciona un procedimiento basado en la detección LC-MS/MS sin derivatización del sustrato que cumple con esta necesidad, y que, en particular, mejora los siguientes aspectos:

- Especificidad: La presente invención permite analizar la actividad DAO determinando específicamente la desaparición de la histamina a lo largo de la reacción enzimática. La mayoría de los métodos disponibles se basan en la medida de otros productos de la reacción de desaminación, como es el caso de la desaparición de oxígeno o la formación de amoníaco, peróxido de hidrógeno o aldehído. Si bien el procedimiento de la presente invención utiliza preferiblemente la histamina como sustrato, podría también usarse cualquier otro compuesto amino para evaluar la capacidad de una determinada matriz para degradar este compuesto.
- Simplicidad: La determinación de histamina mediante LC-MS/MS permite evitar la necesidad de derivatizar químicamente este analito para su separación y detección cromatográfica.
- Sensibilidad: Con el procedimiento de la presente invención es posible detectar actividades DAO muy bajas y con una elevada reproducibilidad. La elevada sensibilidad asociada a la detección de la histamina mediante espectrometría de masas hace que el presente método sea aplicable para la determinación de actividad DAO en muestras complejas o poco purificadas con una baja actividad DAO (alimentos, tejidos animales/vegetales, muestras biológicas, etc.).
- Versatilidad: El diseño experimental del procedimiento de la presente invención permite adaptarlo fácilmente para estudiar la influencia de la presencia de otras sustancias sobre la actividad DAO. En la fase del ensayo enzimático puede incubarse la DAO, además de con la histamina, con otras sustancias para determinar su efecto inhibitorio o potenciador sobre la capacidad enzimática de cualquier matriz.

- Adaptable a volúmenes de muestra variables: La buena sensibilidad del procedimiento de la presente invención junto con la posibilidad de alargar el tiempo de muestreo (la reacción se puede monitorizar hasta más de 24 horas) permite analizar cantidades muy reducidas de muestra y también muestras con una actividad DAO muy baja. Esto es de interés para muestras de volumen pequeño o en casos de escasa disponibilidad.
  
- Libre de interferencias de la matriz: El procedimiento de la presente invención basado en la determinación directa de la degradación de histamina permite evitar la interferencia de otras actividades enzimáticas concomitantes a la DAO en muchas matrices biológicas. Este es el caso de la catalasa, una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en tejidos vegetales y animales, y que puede llevar a la infra-cuantificación de la actividad DAO en todos aquellos métodos basados en la medida de la degradación o formación de oxígeno o peróxido de hidrógeno, respectivamente [18, 23].
  
- Aplicable a un amplio espectro de muestras: Las características comentadas anteriormente hacen que el procedimiento de la presente invención sea de gran utilidad para medir la actividad DAO en muestras de gran complejidad en su composición y un reducido grado de purificación que, a su vez, pueden presentar una baja actividad enzimática. La elevada sensibilidad junto con la ausencia de interferencia por parte de otras enzimas presentes en ciertas matrices posibilita la medida de actividad DAO en una amplia gama de muestras en las que puede ser de interés la determinación de la actividad DAO, como extractos de tejidos animales (por ejemplo. riñón, placenta, hígado, intestino), tejidos vegetales (por ejemplo. semillas, germinados, raíces, hojas), muestras biológicas (por ejemplo. sangre, biopsia intestinal), microorganismos e incluso ingredientes y alimentos de diferente naturaleza y composición. Obviamente, el procedimiento de la presente invención es también aplicable a muestras purificadas e incluso a enzima DAO pura.

#### Características de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO), tal como se indica en las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO) y comprende las siguientes etapas:

- 5 a) homogenizar una muestra que contiene DAO;
  - b) incubar la muestra;
  - c) añadir a la muestra una solución estándar de un compuesto que es sustrato de la DAO (o simplemente indicado como “sustrato de la DAO” en el presente documento);
  - d) extraer alícuotas a diferentes tiempos;
  - 10 e) detener la reacción en las alícuotas;
  - f) centrifugar las alícuotas y filtrar el sobrenadante;
  - g) analizar las alícuotas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem en la que el sustrato de la DAO no requiere derivatización;
  - h) cuantificar la cantidad de sustrato de la DAO en la muestra;
  - 15 i) calcular la actividad DAO, expresada como nmol de sustrato de la DAO degradado por minuto, mediante la comparación de la cantidad absoluta de sustrato de la DAO degradado durante el tiempo de reacción y la concentración inicial de sustrato de la DAO adicionado en la etapa c).
- 20 En una realización preferida, las muestras en las que se puede aplicar el procedimiento son extracto de tejido animal, matriz vegetal, alimento, muestra biológica, cultivo celular y microorganismos.

25 En el caso de un extracto de tejido animal, el procedimiento de la invención se aplica preferiblemente a riñón, preferiblemente de cerdo, y también se puede aplicar a otras muestras, tales como placenta, hígado e intestino, entre otras.

30 En el caso de una matriz vegetal, el procedimiento de la invención se aplica preferiblemente a semillas o brotes de legumbre, y también se puede aplicar a cualquier especie vegetal o parte de la planta.

En el caso de una muestra biológica, el procedimiento de la invención se aplica preferiblemente a sangre, y también se puede aplicar a otras muestras o tejidos, tales como biopsia intestinal.

35

En el caso de microorganismos, éstos son preferiblemente bacterias del ácido láctico, aunque el procedimiento de la invención permite utilizar cualquier grupo bacteriano.

La etapa a) de homogenització de la mostra que conté DAO se realitza preferiblement amb una solució tampó amb un pH entre 6,5 i 7,5. En una realització més preferida, la solució tampó és una solució tampó fosfat amb molaritat de 0,05 M i un pH de 7,2.

5

La etapa b) de incubació de la mostra se realitza preferiblement a una temperatura de entre 30 i 40 °C, més preferiblement a 37 °C, i en agitació constant durant un temps de entre 30 minuts i una hora. No obstant, les condicions de incubació podran ser adaptades per un expert en la matèria segun el tipus de mostra.

10

En la etapa c) d'addició d'una solució estàndard d'un compost que és substrat de la enzima DAO, aquest compost pot ser histamina, cadaverina o putrescina, entre altres. En una realització més preferida, aquest compost és histamina. Per conèixer possibles substrats de la DAO se pot consultar la base de dades Braunschweig Enzyme Database (BRENDA, EC 1.4.3.22) que se incorpora en el present document per referència (vegeu la referència 24).

15

En dita etapa c), mitjançant l'addició d'una solució estàndard de substrat de la enzima DAO, preferiblement histamina, se arriba, preferiblement, a una concentració de entre 40 i 50 µM, preferiblement de l'ordre de 45 µM, és a dir 45 µM +/- 2,5 % d'aquest valor, més preferiblement 45 µM.

20

En dita etapa c), opcionalment també se pot afegir un potencial interferent o agent inhibidor/potenciador de l'activitat DAO. En una realització preferida, aquest potencial interferent o agent inhibidor/potenciador de l'activitat DAO pot ser una enzima diferent a la DAO, excipients, substàncies bioactives i principis actius de fàrmacs, o una combinació dels mateixos.

25

En el cas d'afegir una enzima diferent de DAO, aquesta és preferiblement catalasa.

30

En el cas d'afegir substàncies bioactives, se pot usar, a modo d'exemple, vitamina C, vitamines del grup B, cafeïna, magnesi, coure i quercetina, encara que la llista de possibilitats pot ser molt ampla.

35

En el cas d'afegir principis actius de fàrmacs, se pot usar, a modo d'exemple, acetilcisteïna, àcid clavulànic, cimetidina, furosemita i diazepam, encara que la llista de possibilitats pot ser molt ampla.

La etapa d) se basa en la extracción de alícuotas entre las 0 y las 6 horas. Preferiblemente, esta extracción se realiza al menos a  $t = 0, 1, 2, 4$  y 6 horas después del inicio de la incubación. En caso de que sea necesario, las alícuotas se pueden  
5 extraer adicionalmente hasta las 48 horas después del inicio de la incubación.

La etapa e) se refiere a la detención de la reacción en las alícuotas. Para ello se utiliza, preferiblemente, uno de los siguientes métodos, solos o combinados:

- 1) adición de un ácido hasta conseguir un pH inferior o igual a 2;
- 10 2) aplicación de tratamiento térmico a partir de 70 °C.

En el caso 1) de las opciones para la etapa e) el ácido añadido puede ser ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido perclórico, aunque cualquier ácido que pueda llevar a un pH  
15 igual o inferior a 2 se podría utilizar perfectamente.

La etapa f) hace referencia a la centrifugación de las alícuotas y al filtrado del sobrenadante. En una realización, esta centrifugación se realiza durante 5 min a 15.000 rpm y 4 °C de temperatura, o a cualquier otra condición que permita la separación de las dos fases de la muestra.  
20

En la etapa i), si en la etapa c) se ha utilizado la histamina como sustrato de la DAO, la actividad DAO obtenida se expresa como nmol de histamina degradada por minuto mediante la comparación de la cantidad absoluta de histamina degradada durante el tiempo de reacción y la concentración inicial de histamina adicionada en la etapa c).  
25

Cabe indicar que la presente invención abarca cualquier combinación de las realizaciones o casos o ejemplos anteriores que un experto en la materia entienda como viable en el contexto de la presente invención.

Los diferentes casos o ejemplos particulares citados anteriormente en las etapas de la invención (a-i), así como los siguientes ejemplos, se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención  
30

## EJEMPLOS

35

**1. Ejemplo de metodología para la determinación *in vitro* de la actividad DAO en extracto proteico de riñón de cerdo, brotes de legumbre y complementos de**



## **enzima DAO.**

El procedimiento desarrollado evalúa la capacidad de la enzima DAO para degradar la histamina a través de un ensayo enzimático acoplado a cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Concretamente, la actividad DAO se determina en una solución con una concentración inicial de histamina definida (45 µM) en condiciones controladas (37 °C, pH 7,2) y el posterior análisis de la histamina degradada durante el tiempo de reacción mediante LC-MS/MS.

10

### A) Ensayo enzimático

Se homogenizan 10 mg de muestra (extracto proteico de riñón de cerdo, brotes de legumbre liofilizados o el contenido de una cápsula de complemento de enzima DAO) en 20 ml de solución tampón fosfato (0,05 M) a pH 7,2 y se colocan en una incubadora durante al menos 30 min a 37 °C y agitación constante (200 rpm). El inicio de la reacción lo marca la adición de una solución estándar de histamina en la muestra homogeneizada para alcanzar una concentración inicial de 45 µM. Esta solución de la muestra en contacto con el sustrato se mantiene en incubación constante (37 °C, 200 rpm) y se extraen progresivamente alícuotas de 500 µl a diferentes tiempos de muestreo (t = 0, 1, 2, 4 y 6 h). Para detener la reacción enzimática, se añaden 15 µl de ácido perclórico 2N a la alícuota extraída, se mezcla vigorosamente con un vórtex y se centrifuga (15.000 rpm, 5 min, 4 °C). El sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana GHP de 0,22 µm y se almacena a 4 °C hasta su análisis (LC-MS/MS).

25

### B) Análisis LC-MS/MS

El análisis por cromatografía líquida se realizó usando una bomba binaria Agilent Infinity 1260 y un inyector automático termostatzado. La separación cromatográfica se realizó con una columna Acquity UPLC™ BEH Amide (1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm) (Waters Corp.) mantenida a 40 °C. La fase móvil consistió en formiato de amonio 50 mM en agua con ácido fórmico al 0,2% (eluyente A) y en acetonitrilo con ácido fórmico al 0,2% (eluyente B). Se utilizó un flujo constante de 0,6 ml/min y el siguiente gradiente de elución: 0 min, 20% de A; 2,50 min, 20% de A; 2,60 min, 40% de A; 3,60 min, 40% de A; 3,70 min, 20% de A; 15 min, 20% A. El inyector automático se mantuvo a 4°C y el volumen de inyección fue de 2 µl.

La detección y cuantificación de la histamina degradada por la enzima DAO presente en

la muestra se realizó mediante LC-ESI-MS/MS usando un espectrómetro de masas 4000QTRAP (ABSciex) con ionización positiva a través de la fuente de iones Turbo V™ (gas de cortina, 15 psi; voltaje de pulverización de iones, 5.500 V; temperatura, 600 °C; gas nebulizador, 40 psi; gas de secado, 30 psi; y calentador de interfaz activado). La adquisición del monitoreo de reacción múltiple (MRM) se realizó registrando las transiciones del cuantificador (112,23 > 95,1) y del calificador (112,2 > 82,9), tiempo de permanencia de 500 ms (potencial de reducción: 50 V, potencial de entrada: 10 V; potencial de salida de celda de colisión: 15 V; y energía de colisión: 21 eV). Se consideraron las transiciones MRM para la histamina a 95.1 Da para identificación y cuantificación, y a 82.9 Da para la confirmación del compuesto. El análisis de datos se realizó mediante el software Analyst™ (versión 1.6.2, Applied Biosystems).

La cuantificación de histamina se realizó mediante el método de patrón externo. La curva de calibración se realizó con soluciones patrón de entre 10 y 400 ng/ml diluidas en formiato de amonio 50 mM en agua:acetonitrilo (20:80) con ácido fórmico al 0,2%. La regresión lineal ( $r^2 = 0.9998$ ) se ajustó (1/x) obteniendo precisiones entre 96-104% para todas las concentraciones.

### Resultados

Los resultados de la actividad DAO de diferentes lotes de extracto de riñón porcino, de brotes de legumbre y de complementos de enzima DAO, obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente, se muestran en la Tabla 1. Cada una de las muestras se analizó por duplicado.

**Tabla 1.** Actividad DAO *in vitro* de dos lotes diferentes de extracto de riñón porcino, brotes de guisante y complementos de DAO.

Muestra	Actividad DAO (mU/mg)*
Extracto proteico de riñón porcino	0,23 (0,014)
Brote de guisante liofilizado	0,43 (0,015)
Complemento de enzima DAO	0,15 (0,010)
	0,13 (0,012)

\* Media (desviación estándar).

## 2. Ejemplo de metodología para la evaluación del potencial efecto interferente de la enzima catalasa en la determinación de la actividad DAO.

Para analizar el posible efecto interferente de la catalasa en la determinación de la actividad DAO, se analizó un extracto de proteína de riñón de cerdo en presencia de la enzima catalasa a dos concentraciones diferentes (100 y 500 U/mL).

La enzima catalasa de hígado bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se añadió junto a 10 mg de muestra de extracto de proteína de riñón de cerdo. La mezcla se homogenizó en una solución tampón (0,05M) a pH 7,2 y se incubó a 37 °C y agitación constante (200 rpm). A partir de esta etapa el procedimiento experimental fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1. El análisis de cada una de las muestras se realizó por duplicado.

### 15 Resultados

La actividad DAO del extracto de riñón porcino no varió entre la muestra sin adición de catalasa ( $0,22 \pm 0,002$  mU/mg) y la muestra con 100 U/ml y 500U/ml de catalasa ( $0,21 \pm 0,008$  mU/mg y  $0,21 \pm 0,010$  mU/mg, respectivamente). Por lo tanto, se puede afirmar que la presencia de catalasa no interfiere en la determinación de la actividad DAO, independientemente de la concentración ensayada.

### Lista de referencias

1. Worm J, Falkenberg K, Olesen J (2019) Histamine and migraine revisited: mechanisms and possible drug targets. *J Headache Pain* 20:30 . doi: 10.1186/s10194-019-0984-1
2. Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 85:1185–1196 . doi: 10.1093/ajcn/85.5.1185
3. Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS, Stark H, Thurmond RL, Haas HL (2015) International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacol Rev* 67:601–655 . doi: 10.1124/pr.114.010249
4. Bover-Cid S, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC (2014) Processing Contaminants: Biogenic Amines. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, pp 381–391
5. Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 43:498–506

6. Elmore BO, Bollinger JA, Dooley DM (2002) Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *J Biol Inorg Chem* 7:565–79 . doi: 10.1007/s00775-001-0331-1
7. Comas-Basté O, Luz Latorre-Moratalla M, Sánchez-Pérez S, Teresa Veciana-Nogués M, del Carmen Vidal-Carou M (2019) Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance. In: Proestos C (ed) *Biogenic Amines*. IntechOpen
8. García-Martín E, Ayuso P, Martínez C, Blanca M, Agúndez JAG (2009) Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 10:867–883 . doi: 10.2217/pgs.09.26
9. Kucher AN (2019) Association of Polymorphic Variants of Key Histamine Metabolism Genes and Histamine Receptor Genes with Multifactorial Diseases. *Russ J Genet* 55:794–814 . doi: 10.1134/S102279541907010X
10. Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Rabell-González J, Veciana-Nogués M, Latorre-Moratalla M, Vidal-Carou M (2018) Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods* 7:205 . doi: 10.3390/foods7120205
11. Jumarie C, Séide M, Marcocci L, Pietrangeli P, Mateescu MA (2017) Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Appl Biochem Biotechnol* 182:1171–1181 . doi: 10.1007/s12010-016-2390-3
12. Leonida M, Belbekhouche S, Adams F, Bijja UK, Choudhary DA, Kumar I (2019) Enzyme nanovehicles: Histaminase and catalase delivered in nanoparticulate chitosan. *Int J Pharm* 557:145–153 . doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.050
13. Neufeld E, Chayen R (1979) An evaluation of three methods for the measurement of diamine oxidase (DAO) activity in amniotic fluid. *Anal Biochem* 96:411–418 . doi: 10.1016/0003-2697(79)90601-8
14. Boehm T, Pils S, Gludovacz E, Szoelloesi H, Petroczi K, Majdic O, Quaroni A, Borth N, Valent P, Jilma B (2017) Quantification of human diamine oxidase. *Clin Biochem* 50:444–451 . doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.12.011
15. Snyder SH, Hendley ED (1968) A simple and sensitive fluorescence assay for monoamine oxidase and diamine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 163:386–92
16. Rinaldi A, Floris G, Finazzi-Agro A (1982) Purification and Properties of Diamine Oxidase from *Euphorbia Latex*. *Eur J Biochem* 127:417–422 . doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06888.x
17. Kivirand K, Rincken T (2007) Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proc Est Acad Sci Chem* 56:164–171

18. Ahmadifar S, Le TC, Marcocci L, Pietrangeli P, Mateescu MA (2017) Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Anal Chim Acta* 975:78–85 . doi: 10.1016/j.aca.2017.04.006
- 5 19. Sujkowska-Rybkowska M, Borucki W (2014) Localization of hydrogen peroxide accumulation and diamine oxidase activity in pea root nodules under aluminum stress. *Micron* 57:13–22 . doi: 10.1016/j.micron.2013.09.007
20. Schwelberger HG, Feurle J, Houen G (2013) New tools for studying old questions: Antibodies for human diamine oxidase. *J Neural Transm* 120:1019–1026 . doi: 10.1007/s00702-012-0936-2
- 10 21. Medda R, Padiglia A, Floris G (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* 39:1–9
22. Pietrangeli P, Federico R, Mondovi B, Morpurgo L (2007) Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J Inorg Biochem* 101:997–1004 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014
- 15 23. Calinescu C, Mondovi B, Federico R, Ispas-Szabo P, Mateescu MA (2012) Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *Int J Pharm* 428:48–56 . doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.02.032
- 20 24. Department of Biochemistry and Bioinformatics of the Technische Universität Braunschweig. Braunschweig Enzyme Database (BRENDA): Information on EC 1.4.3.22 - Diamine Oxidase. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.4.3.22>. Accessed 9 Feb 2020

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO) que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) homogenizar una muestra que contiene DAO;  
 b) incubar la muestra;  
 c) añadir a la muestra una solución estándar de un compuesto que es sustrato de la DAO;  
 d) extraer alícuotas a diferentes tiempos;
- 10 e) detener la reacción en las alícuotas;  
 f) centrifugar las alícuotas y filtrar el sobrenadante;  
 g) analizar las alícuotas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem en la que el sustrato de la DAO no requiere derivatización;  
 h) cuantificar la cantidad de sustrato de la DAO en la muestra;
- 15 i) calcular la actividad DAO, expresada como nmol de sustrato de la DAO degradado por minuto, mediante la comparación de la cantidad absoluta de sustrato de la DAO degradado durante el tiempo de reacción y la concentración inicial de sustrato de la DAO adicionado en la etapa c).
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la muestra consiste en un extracto de tejido animal, matriz vegetal, alimento, muestra biológica, cultivo celular y microorganismos.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el extracto de tejido animal es riñón, placenta, hígado o intestino.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que el extracto de riñón es de riñón porcino.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la matriz vegetal es semilla o brote.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el brote es un brote de legumbre.
7. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la muestra biológica es sangre o  
 35 biopsia intestinal.
8. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que los microorganismos son bacterias

del àcid làctic.

- 5 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la homogenización de la etapa a) se realiza con una solución tampón con un pH entre 6,5 y 7,5.
- 10 11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la solución tampón es una solución tampón fosfato con molaridad de 0,05 M y un pH de 7,2.
- 15 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la temperatura de incubación es de 37 °C.
- 20 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato de la DAO se selecciona entre histamina, cadaverina y putrescina.
- 25 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que el sustrato de la DAO es histamina y en la etapa i) se calcula la actividad DAO expresada como nmol de histamina degradada por minuto mediante la comparación de la cantidad absoluta de histamina degradada durante el tiempo de reacción y la concentración inicial de histamina adicionada en la etapa c).
- 30 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que con la adición del sustrato de la DAO en la etapa c) se alcanza una concentración de entre 40 y 50  $\mu\text{M}$  en la muestra homogeneizada.
- 35 16. Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que se alcanza una concentración del orden de 45  $\mu\text{M}$ .
17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa c) se añade adicionalmente un potencial interferente o agente inhibidor/potenciador de la actividad DAO.
18. Procedimiento, según la reivindicación 17, en el que potencial interferente o agente

inhibidor/potenciador es otra enzima diferente a la DAO, excipientes, sustancias bioactivas y principios activos de fármacos, o una combinación de los mismos.

5 19. Procedimiento, según la reivindicación 18, en el que la otra enzima diferente a DAO es catalasa.

20. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa d) se extraen alícuotas entre las 0 y las 6 horas.

10 21. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que las alícuotas se extraen al menos a  $t = 0, 1, 2, 4$  y 6 horas después del inicio de la incubación.

22. Procedimiento, según la reivindicación 21, en el que las alícuotas se extraen adicionalmente hasta las 48 horas después del inicio de la incubación.

15

23. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que para detener la reacción en la etapa e) se utiliza uno de los siguientes métodos, solos o combinados:

- 20 1) adición de un ácido hasta conseguir un pH inferior o igual a 2;  
2) aplicación de tratamiento térmico a partir de 70 °C.

24. Procedimiento, según la reivindicación 23, en el que el ácido añadido es ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido perclórico.

25 25. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la centrifugación de las alícuotas en la etapa f) se realiza a 15.000 rpm durante 5 min y 4 °C de temperatura, o cualquier otra condición que permita la separación de las dos fases de la muestra.





## 4.6. Contribució al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí

### PUBLICACIÓ 6

#### Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial

Joan Izquierdo-Casas, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, Luis Soler-Singla, M. Carmen Vidal-Carou  
*Clinical Nutrition*, 2019, 38, 152-158.

Índex d'impacte (JCR 2019): 6,360

Posició en l'àrea "Nutrition & Dietetics": D1 (9/89)

### COMUNICACIÓ ESCRITA 5

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Roberto Garza-Guajardo, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **In vitro DAO activity of porcine kidney extracts and DAO supplements.** *XII International Mediterranean Diet Conference*, 2018, Barcelona.

Aquest treball s'emmarca en un projecte de col·laboració Universitat-Empresa que pretén promoure la transferència de coneixement i incrementar així l'impacte de la recerca en la societat. Els resultats d'aquest apartat no són, de moment, susceptibles de publicació degut al caràcter confidencial de certes dades. Alguns processos no es descriuen de forma específica perquè són subjectes de protecció industrial. La col·laboració s'ha vehiculat a través dels projectes de recerca amb identificador 309926 i 310579 de la Fundació Bosch i Gimpera.

### PLANTEJAMENT I OBJECTIU

L'any 2017, la Comissió Europea va donar llum verda a l'ús de complements d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí a tots els estats membres de la Unió Europea en incloure'ls a la llista oficial de nous aliments. Concretament, aquesta normativa estableix la possibilitat de comercialitzar aquest producte com a complement alimentós i com a aliment per a usos mèdics especials.

La col·laboració amb investigadors del Departament de Neurologia de l'Hospital General de Catalunya i de la Universitat Internacional de Catalunya va promoure la participació en un estudi clínic aleatoritzat, doble cec i controlat amb placebo que pretenia avaluar l'eficàcia clínica d'un complement d'enzim DAO en el tractament preventiu de la migranya (identificador de l'estudi clínic ISRCTN10091019).

Breument, l'estudi clínic va involucrar a 100 pacients adults amb un diagnòstic confirmat de migranya episòdica (segons criteris establerts per la IHS) i dèficit de DAO plasmàtic que van rebre, en funció del grup d'estudi, un complement alimentós d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí o placebo. El tractament consistí en la presa de 2 càpsules de complement de DAO (4.2 mg d'extracte de ronyó porcí/càpsula) o placebo 20 minuts abans de cada àpat (i.e. esmorzar, dinar i sopar). Les variables estudiades (*outcomes*) van ser la durada (hores de dolor) i freqüència dels atacs de migranya, la percepció d'intensitat de dolor (*Numerical Pain Rating Scale, NPRS*) i la presa de triptans per part dels pacients (càpsules/mes), un analgèsic específic per al tractament dels atacs de migranya.

Un mes de tractament amb el complement de DAO va suposar una disminució estadísticament significativa en la durada dels atacs de migranya ( $p = 0,0217$ ). El grup placebo també va registrar una reducció en la durada dels atacs de migranya, encara que sense significació estadística ( $p = 0,3034$ ). No s'observaren diferències significatives al comparar la reducció en la durada dels atacs entre ambdós grups d'estudi, encara que el grup DAO (1,4 h) mostrà una davallada major en les hores de dolor en comparació amb el grup placebo (0,9 h). Si s'analitza la freqüència dels atacs de migranya, tant el grup DAO (2,67 atacs) com el grup placebo (2,16 atacs) van mostrar una reducció significativa del nombre d'atacs mensuals al cap d'un mes d'intervenció, i sense significació estadística entre ambdós grups ( $p = 0,6172$ ). En relació a la intensitat de dolor, es van obtenir puntuacions similars tant abans com després del tractament en els pacients d'ambdós grups d'estudi.

Pel que fa a la presa de triptans com a tractament analgèsic dels atacs de migranya, es va registrar una reducció en el consum de càpsules mensuals al cap d'un mes de tractament amb complement d'enzim DAO. En el grup placebo es va detectar un increment en la presa de triptans. Específicament, un 44% dels pacients que van rebre suplement de DAO van reportar una disminució de la presa de triptans, 30%

van mantenir la dosi mensual i un 26% va augmentar-la. Per contra, un 57% dels pacients que van rebre placebo van experimentar un augment en la presa d'aquests analgèsics. No obstant això, en cap cas es va obtenir una significació estadísticament significativa.

A l'hora d'analitzar els motius pels quals els resultats de l'estudi no són plenament satisfactoris, es poden plantejar dues possibles hipòtesis: que la durada del tractament (un mes) fos escassa; o bé que la dosi d'enzim DAO emprada no fos suficient. En aquest marc, i en col·laboració amb l'empresa DR Healthcare S.L., dedicada a la obtenció i comercialització de complements d'enzim DAO, va sorgir l'interès d'estudiar possibles estratègies per tal d'augmentar l'activitat enzimàtica dels complements de DAO. L'objectiu d'aquest projecte Universitat-Empresa va ser contribuir al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí que presentés una major activitat enzimàtica. En concret, es plantejà estudiar l'efecte que poden tenir certs processos tecnològics de l'obtenció del complement sobre la seva activitat DAO, així com l'evolució d'aquesta activitat enzimàtica al llarg de la vida comercial del producte.

## METODOLOGIA

Es va avaluar la influència de diversos factors sobre l'activitat enzimàtica de l'extracte de ronyó porcí. Es va estudiar la variabilitat de la matèria primera (ronyó de porc), diversos processos tecnològics relacionats amb el procés d'obtenció de l'extracte (combinacions del binomi temps-temperatura durant el procés d'extracció, tractaments biocides aplicats per garantir la seguretat biològica del producte, condicions controlades de deshidratació) i l'estabilitat de l'activitat enzimàtica de l'extracte de ronyó porcí al llarg de 24 mesos d'emmagatzematge a temperatura ambient i en refrigeració.

Les mostres sotmeses a les diferents condicions de tractament van ser proporcionades per l'empresa elaboradora de l'extracte de ronyó porcí. L'activitat DAO *in vitro* es va analitzar segons el mètode prèviament desenvolupat i que es descriu a l'apartat 4.4.1.

## RESULTATS

### Influència de la matèria primera en l'activitat DAO de l'extracte

El procés d'obtenció industrial de l'extracte proteic de ronyó porcí consisteix fonamentalment en la homogeneïtzació i trituració del teixit animal, una etapa d'extracció acetònica i el posterior assecatge i tamisatge del producte obtingut. Per tal de confirmar que l'activitat DAO no depèn de la variabilitat de la matèria primera (ronyó) emprada per a elaborar l'extracte s'analitzaren diferents lots de producció elaborats en diversos dies i a partir de ronyons de porc de partides diferents. Tal com mostra la figura 16, l'activitat DAO dels 20 lots d'extracte proteic va ser molt poc variable, amb un valor mig de  $0,24 \pm 0,02$  mU/mg.

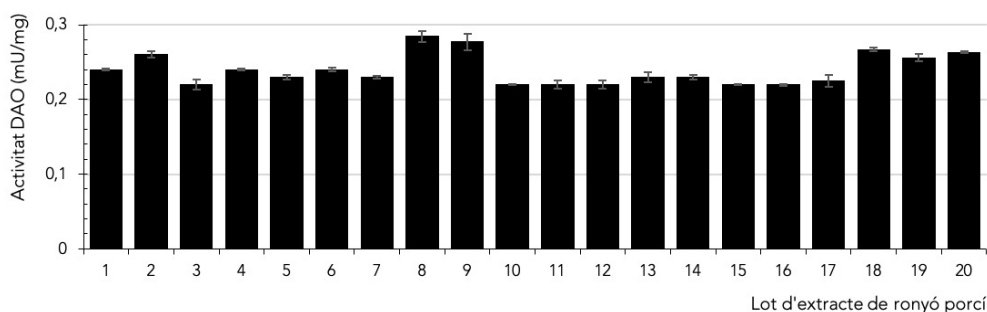


Figura 16. Activitat DAO *in vitro* de 20 lots d'extracte proteic de ronyó porcí elaborats en diversos dies i a partir de ronyons de porc de partides diferents.

### Influència de la temperatura i el temps d'extracció en l'activitat DAO de l'extracte

El control de la temperatura del procés d'extracció acetònica del ronyó porcí va ser un factor clau per garantir l'activitat DAO del producte. La figura 17 mostra l'efecte de diferents combinacions de temps i temperatura aplicats en l'etapa d'extracció on s'observa com un increment de la temperatura o un major temps d'exposició a aquesta provoca una disminució significativa de l'activitat enzimàtica del producte ( $p < 0,05$ ). Concretament, cada augment de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la temperatura del procés d'extracció suposa una pèrdua d'aproximadament un 10-20% en l'activitat enzimàtica. La durada del tractament presentà una menor influència sobre

l'activitat DAO, amb minves que no superen els 4% quan l'aplicació tèrmica es prolonga de 3 a 6 hores.

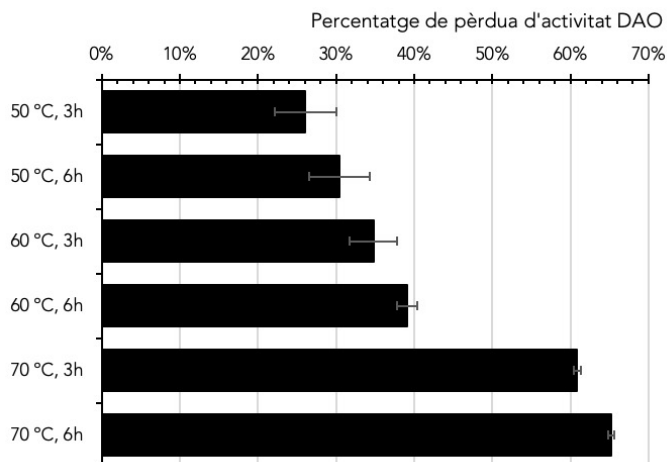


Figura 17. Percentatge de pèrdua en l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí provocat per l'aplicació de diferents combinacions de temps-temperatura durant l'etapa d'extracció.

### Influència del tractament biocida en l'activitat DAO de l'extracte

Es va estudiar l'activitat DAO d'extractes sotmesos a diferents estratègies per tal de mantenir la seguretat biològica del producte acabat. Els tractaments biocides considerats van ser l'addició del desinfectant químic hipoclorit de sodi al 0,1% o d'una solució alcohòlica de timol (2-isopropil-5-metilfenol) al 0,2%, que és un antisèptic natural extret de l'oli essencial de la farigola. També es va assajar l'efecte de l'aplicació de radiacions ionitzants a tres dosis diferents (8, 15 i 25 KGy).

L'addició d'una solució aquosa d'hipoclorit i la irradiació de l'extracte a una dosi de 8 KGy no van influir en l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí (Figura 18). Per altra banda, l'addició de timol i la irradiació a dosis superiors als 10 KGy van suposar una reducció estadísticament significativa de l'activitat enzimàtica de l'extracte ( $p < 0,05$ ).

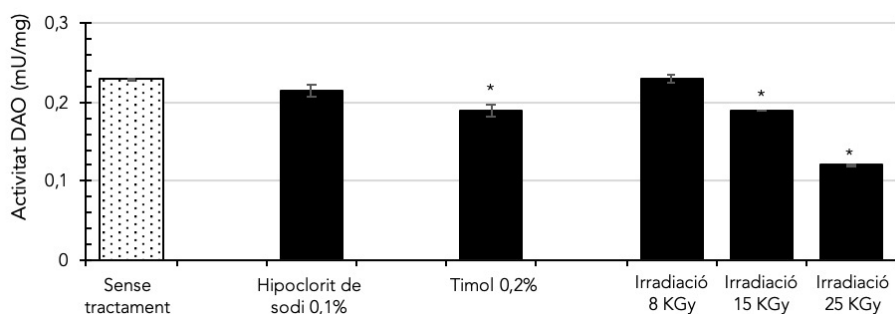


Figura 18. Influència del diferents tractaments biocides sobre l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí. L'asterisc (\*) indica diferències significatives respecte a la mostra sense tractament ( $p < 0,05$ ).

### Canvi en les condicions de deshidratació i influència sobre l'activitat DAO de l'extracte

A fi i efecte d'aconseguir un producte amb una major activitat DAO es van introduir canvis en les condicions de deshidratació. Les condicions específiques d'aquest procés no s'especifiquen per protecció industrial. La figura 19 mostra la distribució de l'activitat DAO de diferents lots d'extracte de ronyó porcí obtinguts mitjançant un procés on s'inclou una etapa de deshidratació controlada, en comparació amb els lots d'extracte produïts prèviament (sense aquesta etapa). Aquest tractament específic de deshidratació va permetre obtenir un extracte de ronyó porcí amb una activitat enzimàtica significativament superior ( $0,41 \pm 0,02$  mU/mg) a la que presentava aquest producte abans d'incorporar aquesta millora ( $0,24 \pm 0,02$  mU/mg) ( $p < 0,05$ ).

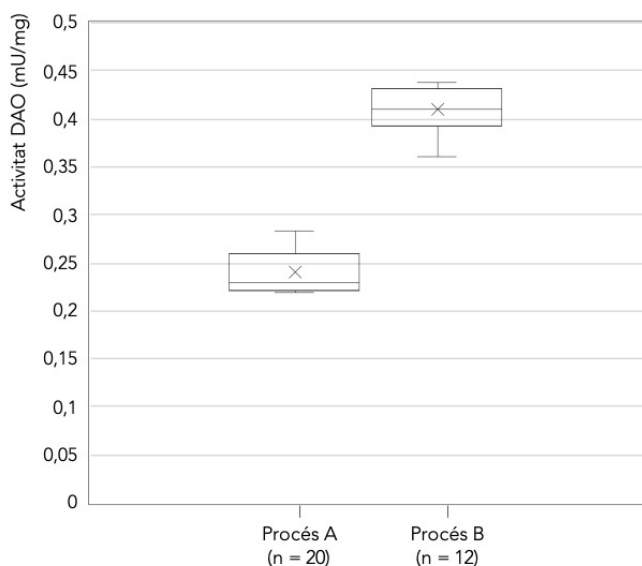


Figura 19. Distribució de l'activitat DAO *in vitro* de diferents lots d'extracte de ronyó porcí obtinguts abans (procés A, esquerra) i després (procés B, dreta) d'aplicar un procés de deshidratació controlada. Les línies situades a la part inferior i superior de la caixa indiquen el percentil-25 i el percentil-75, respectivament. La línia central representa la mediana, les creus representen el valor mig i les línies que s'estenen verticalment des de les caixes (bigotis) indiquen la variabilitat que excedeix l'IQR.

### Estabilitat de l'activitat DAO de l'extracte

La figura 20 mostra l'evolució de l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí durant 24 mesos d'emmagatzematge a temperatura ambient (25 °C / 60% HR) i en refrigeració (2-8 °C). L'emmagatzematge en refrigeració va mantenir intacta l'activitat DAO durant almenys 24 mesos. En contra, la conservació d'aquest producte a temperatura ambient va provocar una pèrdua progressiva de la seva capacitat per degradar histamina *in vitro*. Al cap de dos anys d'emmagatzematge, l'extracte a temperatura ambient havia experimentat una pèrdua de gairebé la meitat de la seva activitat DAO respecte al temps inicial.



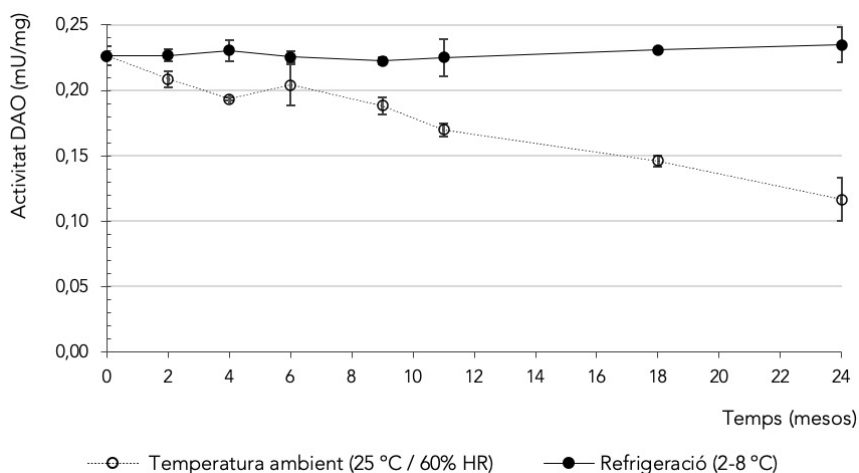


Figura 20. Evolució de l'activitat DAO *in vitro* de l'extracte proteic de ronyó porcí al llarg de 24 mesos d'emmagatzematge en diferents condicions.

### Activitat DAO del nou complement d'enzim DAO

Com a resultat de les modificacions tecnològiques aplicades es va aconseguir augmentar significativament l'activitat enzimàtica de l'extracte utilitzat per a l'elaboració del nou complement alimentós d'enzim DAO i, en conseqüència, també l'activitat DAO del complement. La figura 21 mostra l'activitat DAO *in vitro* de diferents complements d'enzim DAO disponibles al mercat (A – C) en comparació amb el nou complement (D). Diferents lots (n = 8) del nou complement alimentós van mostrar una activitat DAO mitja de  $0,17 \pm 0,02$  mU/mg, marcadament superior a la que presenten la resta de complements analitzats (que oscil·len entre 0,05 i 0,11 mU/mg).

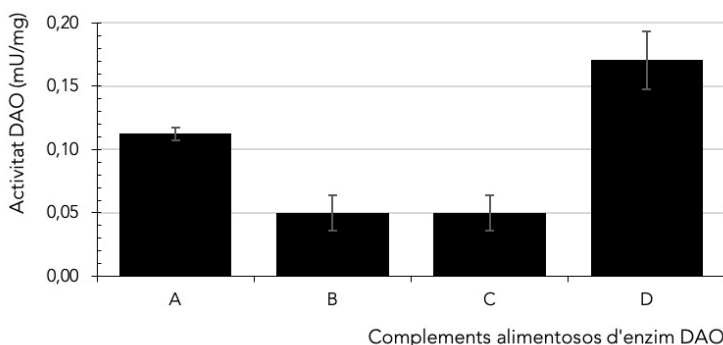


Figura 21. Activitat DAO *in vitro* de diferents complements alimentosos d'enzim DAO disponibles al mercat (A - C) en comparació al nou complement obtingut (D).

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS


De l'estudi clínic sobre l'eficàcia clínica del complement d'enzim DAO:

- Aquest estudi és el primer assaig clínic aleatoritzat i doble cec que avalua l'efecte de la suplementació amb enzim DAO exogen en el tractament de la migranya amb pacients amb dèficit de DAO.
- L'administració d'un complement alimentós d'enzim DAO procedent de ronyó porcí durant un mes va suposar una disminució significativa en la durada dels atacs de migranya.
- La intervenció amb enzim DAO exogen va provocar una disminució de la presa de triptans, amb gairebé un 75% dels pacients que van reduir o mantenir la dosi d'aquests analgèsics durant el mes de suplementació amb DAO.
- No s'ha pogut establir una relació significativa pel que fa a l'efecte d'aquest tractament sobre la freqüència dels atacs de migranya ni en la intensitat de dolor percebuda pels pacients.








De la contribució al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO:

- La temperatura aplicada durant el procés d'extracció és crítica per mantenir l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí.
- Les radiacions ionitzants a una dosi de 8 KGy i l'addició d'una solució aquosa d'hipoclorit són estratègies per mantenir la seguretat biològica del producte que no afecten la seva activitat enzimàtica.
- L'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí és estable durant almenys 24 mesos en refrigeració.
- La deshidratació en condicions controlades permet augmentar significativament l'activitat enzimàtica de l'extracte de ronyó porcí.
- La recerca realitzada ha contribuït al desenvolupament d'un complement d'enzim DAO amb una major activitat enzimàtica.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



La col·laboració entre el grup de recerca i el sector productiu ha permès formular un complement d'enzim DAO amb una major activitat enzimàtica que podria millorar l'eficàcia clínica del tractament de la intolerància a la histamina.

## Author's Personal Copy

Clinical Nutrition 38 (2019) 152–158



Contents lists available at ScienceDirect

## Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

## Randomized Control Trials

Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial<sup>☆</sup>

Joan Izquierdo-Casas<sup>a, b</sup>, Oriol Comas-Basté<sup>c</sup>, M. Luz Latorre-Moratalla<sup>c</sup>,  
Marian Lorente-Gascón<sup>b</sup>, Adriana Duelo<sup>d</sup>, Luis Soler-Singla<sup>a, b</sup>,  
M. Carmen Vidal-Carou<sup>c, \*</sup>

<sup>a</sup> *Department of Neurology, Hospital General de Catalunya, C/ Pere i Pons 1, 08915, Sant Cugat del Vallès, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, C/ Pere i Pons 1, 08915, Sant Cugat del Vallès, Spain*

<sup>c</sup> *Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, XaRTA, INSA, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain*

<sup>d</sup> *Department of Nutrition, Instituto Clínico del Déficit de DAO (ICDDAO), C/ Pere i Pons 1, 08195, Sant Cugat del Vallès, Spain*

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 March 2017

Accepted 4 January 2018

## Keywords:

Diamine oxidase (DAO)

DAO supplementation

Histamine

Histamine intolerance

Migraine

## SUMMARY

**Background & aims:** Histamine intolerance is a disorder in the homeostasis of histamine due to a reduced intestinal degradation of this amine, mainly caused by a deficiency in the enzyme diamine oxidase (DAO). Among histamine related symptoms, headache is one of the most recorded. Current clinical strategies for the treatment of the symptomatology related to this disorder are based on the exclusion of foods with histamine or other bioactive amines and/or exogenous DAO supplementation. The aim of this study was to assess the efficacy of a food supplement consisting of DAO enzyme as a preventive treatment of migraine in patients with DAO deficiency through a randomized double-blind trial.

**Methods:** 100 patients with confirmed episodic migraine according to current International Headache Society (IHS) criteria and DAO deficiency (levels below 80 HDU/ml) were randomized in two groups. One group received DAO enzyme supplementation and the other received placebo for one month. Clinical outcomes assessed were duration and number of attacks, perception of pain intensity and adverse effects during treatment. The use of triptans was also recorded.

**Results:** Great variability was found in the duration of migraine attacks reported by placebo and DAO groups. A significant reduction ( $p = 0.0217$ ) in hours of pain was achieved in patients treated with DAO supplement, with mean durations of 6.14 ( $\pm 3.06$ ) and 4.76 ( $\pm 2.68$ ) hours before and after treatment, respectively. A smaller reduction without statistical significance was also observed for this outcome in the placebo group, from 7.53 ( $\pm 4.24$ ) to 6.68 ( $\pm 4.42$ ) hours. Only in DAO group, a decrease in the percentage of patients taking triptans was observed. The number of attacks and the scores of pain intensity showed a similar reduction in both groups. No adverse effects were registered in patients treated with DAO enzyme.

**Conclusions:** Migrainous patients supplemented with DAO enzyme during one month significantly reduced the duration of their migraine attacks by 1.4 h. No statistically significant reduction was found in placebo group before and after treatment. The reduction of pain hours observed in placebo group (0.9 h) could explain the lack of significant differences between both study groups. One month of DAO supplementation has demonstrated a positive trend in the improvement of migraine but more studies with a longer treatment period are needed to better assess the efficacy of DAO supplementation.

**Clinical trial registration number:** ISRCTN10091019; [www.isrctn.org](http://www.isrctn.org).

© 2018 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

**Abbreviations:** DAO, Diamine oxidase; IHS, International Headache Society; IQR, interquartile range; HDU, Histamine Degrading Units; NPRS, Numeric Pain Rating Scale.

<sup>☆</sup> This study is listed on the ISRCTN registry with trial ID ISRCTN10091019.

\* Corresponding author.

E-mail address: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu) (M.C. Vidal-Carou).

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.013>

0261-5614/© 2018 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

## 1. Introduction

Histamine is a bioactive amine with essential physiological activities, which can also be found in some common foods in a wide range of concentrations [1,2]. Histamine from diet is principally metabolized in the digestive tract by diamine oxidase (DAO), regulating its presence in the systemic circulation [3]. DAO deficiency could be one of the main causes of histamine intolerance, an alteration in the homeostasis of histamine, which results in a reduced intestinal degradation, and its subsequent increase in plasma [3,4]. DAO deficiency may be congenital; resulting from genetic mutations in DAO gene (chromosome 7q36) that code for an altered protein with low enzymatic activity [5–7], or acquired by certain pathologies that limit DAO secretion, especially in inflammatory or degenerative intestinal disorders [8–10], or by enzymatic blockade by some commonly used drugs [4,5]. Multifaceted clinical symptoms associated with histamine intolerance include headaches, skin reactions such as urticaria and pruritus, gastrointestinal disorders as flatulence, diarrhea, nausea and abdominal pain, sneezing, rhinorrhea, arrhythmias, hypotension and muscle aches [4,11]. Headache is one of the symptoms most frequently related to histamine intolerance. Reduced DAO activity has been described by several clinical studies in patients diagnosed with some pathology such as atopic eczema, chronic urticaria, chronic abdominal pain or inflammatory bowel diseases [9,10,12–15]. A recent study also reported a high prevalence (87%) of DAO deficiency in a group of 137 patients diagnosed with migraine [16].

Migraine is a neurological and disabling pathology with a multifactorial etiology that can negatively impact both family and work activities. Its prevalence in Spanish population has been estimated to be 12% [17]. Physiopathological mechanisms supporting the onset of migraine are complex, but several pathways have been described to explain the association between histamine and headache. In the nervous system, certain neurons synthesize histamine in the posterior-basal hypothalamic nuclei, an area recently postulated as the locus of diverse primary headaches due to increased activity detected during the prodromal phases of migraine attacks [18]. Although it was first thought that histamine did not cross the blood–brain barrier, it seems that it may stimulate hypothalamic activity through the circumventricular organs, which lack this barrier [18]. For this reason, high plasmatic histamine levels could originate an increase of histamine in hypothalamus. Moreover, neurogenic inflammation involves the release of histamine, which, in turn, promotes the release of substance P and the gene-related peptide, both closely linked to the pain process in migraine patients [19]. On the other hand, histamine could also induce a vascular headache, since its plasmatic increase would provoke a release of nitric oxide upon stimulation of H1R receptors found in intracranial arteries [4].

DAO deficiency is responsible of plasmatic histamine accumulation, thus hypothetically could be one of the migraine triggers. The aim of this study is to assess the efficacy of DAO supplementation as a preventive treatment in migraine patients with DAO deficiency through a randomized double-blind trial.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

A double-blind randomized study was carried out with 100 patients with confirmed episodic migraine diagnosis according to current International Headache Society (IHS) criteria [20] and DAO deficiency.

A total of 139 participants diagnosed with migraine were recruited by the Headache Unit of the Hospital General de

Catalunya (Sant Cugat del Vallès, Barcelona). After DAO activity determination, 119 of them were eligible candidates to be included in the study (migraine diagnosis and DAO deficiency). Finally, 100 patients were selected by applying additional criteria. Inclusion criteria were the age between 18 and 65 years old and 4 to 14 migraine episodes/month for a minimum of six months prior to study start. Exclusion criteria were: the onset of migraine over 50 years old, the diagnosis of other kind of headache in the same patient, pregnancy and the following of a preventive treatment for episodic migraine during three months prior to the study.

DAO activity was determined from plasma samples with an enzymatic immunoassay method (D-HIT, Sciotec, Austria) after an 8-h fasting period. Serum DAO levels below the cut-off value of 80 HDU/ml were considered as DAO deficient.

### 2.2. Outcome measures

Clinical outcomes assessed were duration and number of migraine attacks, perception of pain intensity and adverse effects during treatment. The duration of migraine attacks was measured by the number of hours of pain. Pain intensity was assessed by the Numeric Pain Rating Scale (NPRS), a 10-point grading scale where 0 represents absence of pain and 10 is the worst possible pain.

Other complementary information has been also recorded, such as adverse effects during treatment and the use of specific analgesic drugs, specifically the intake of triptans during migraine attacks. Data about the number of triptans in each migraine attack was recorded per patient, classifying their intake as low (less than 5 capsules/month), moderate (between 6 and 10 capsules/month) and high (more than 10 capsules/month).

### 2.3. Study protocol

Figure 1 provides details of the study design. In baseline consultation (C0) patients received a first diary to record data related to the outcome measures during one month prior to the study. After one month, all patients were scheduled for the first consultation (C1) and submitted the completed first diary. Patients were then randomized in two groups (DAO and placebo) and received a second diary to record the information requested during the month of treatment, which they submitted in a second consultation (C2).

Randomization in two groups was double-blind using the RANUNI procedure (SAS, v. 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA). One group received DAO enzyme supplementation ( $n = 50$ ) and the other placebo ( $n = 50$ ). Stratification considering age and sex was applied to assure similarity in baseline characteristics of both groups. The treatment consisted in the oral administration of 2 capsules of DAO supplement or placebo 20 min before breakfast, lunch and dinner. Each capsule contained 4.2 mg of porcine kidney protein extract with 7% of DAO with an enzymatic activity of 10,000 HDU/ml. The content of the capsules was microencapsulated with a gastroresistant shellac coating. Placebo consisted of microcrystalline cellulose and gelatin capsules with the same form, size and color than DAO ones and was provided by the same manufacturer. Treatment compliance was verified by counting the remaining capsules for each patient.

Table 1 shows the characteristics (sex, age and DAO activity) of all patients included in both study groups.

The Ethics Committee of the Hospital General de Catalunya approved the study and all participants signed an informed consent form.

### 2.4. Statistical analysis

The size of the sample was calculated assuming a 5% type 1 error rate and a desired statistical power of 80%. Taking into account a

## Author's Personal Copy

154

J. Izquierdo-Casas et al. / Clinical Nutrition 38 (2019) 152–158

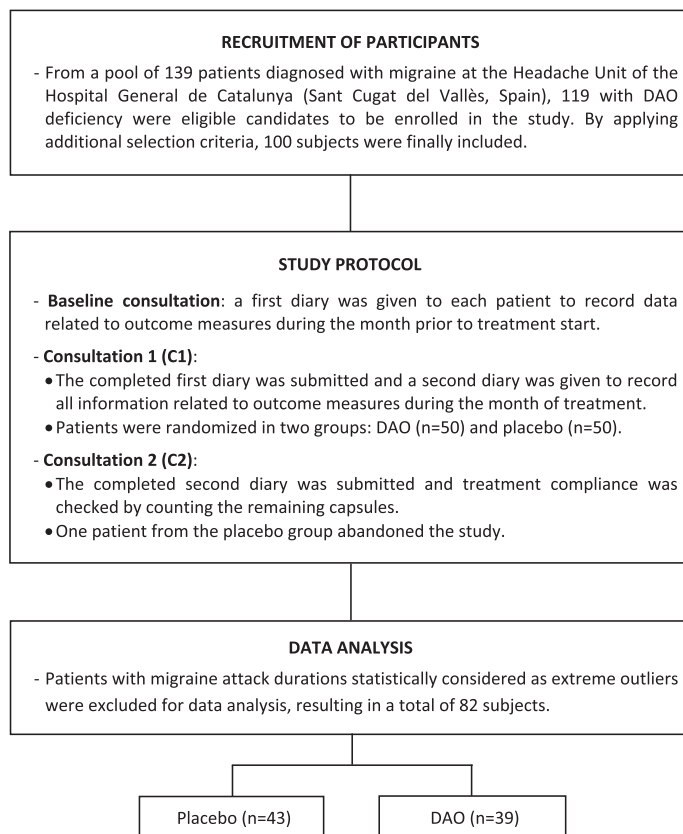


Fig. 1. Schematic representation of the study design.

Table 1

Characteristics (sex, age and DAO activity levels) of all patients included in both placebo and DAO groups.

Variable		Placebo N = 43	DAO N = 39	Total N = 82
Sex (number of patients)	Female	36	32	68
	Male	7	7	14
Age (years old)	Mean (SD)	43.6 (11.0)	40.8 (10.9)	42.3 (11.0)
	min–max	23.8–64.9	18.4–61.2	18.4–64.9
DAO activity (H DU/ml)	Mean (SD)	54.8 (11.3)	53.3 (11.2)	54.1 (12.9)
	min–max	18.6–79.6	22.6–79.0	18.6–79.6

SD: standard deviation; min: minimum; max: maximum; HDU: histamine degrading units.

minimal detectable mean difference of 1.25 attacks/month with a SD of 2, a total of 82 subjects would be needed. Based on an expected 15% dropout rate, a total of 100 patients (50 per group) were included to assure that at least 82 subjects would complete the full study.

T-test was used to evaluate differences within groups before (C1) and after (C2) treatment and between groups (placebo and DAO) in migraine attack duration (hours), number of attacks, and

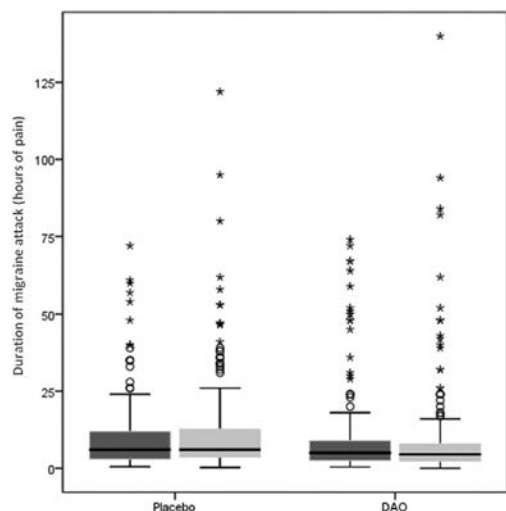
pain scales. Chi-squared test was used to determine significant differences in patients taking triptans. Probability values of  $p < 0.05$  were accepted as significant. Statistical analysis was performed using a SPSS for Windows, version 22 (Chicago, IL).

### 3. Results

No significant differences in treatment compliance were observed between both groups ( $p = 0.543$ ), with a mean (SD) of remaining capsules of 17 (20.6) and 19.9 (24.7) in placebo and DAO group, respectively.

Great variability was found in the duration of migraine attacks reported by placebo and DAO groups, with some extremely high values recorded (Fig. 2). Values exceeding that obtained by the formula  $P_{75} + 3 \cdot \text{IQR}$  (IQR: interquartile range;  $P_{75} - P_{25}$ ) were statistically considered as extreme outlier values, and the corresponding patients were excluded, resulting in a final sample of 82 subjects, 43 in the placebo and 39 in the DAO group.

Table 2 shows the duration of migraine attacks, as the mean of pain hours for each patient (total number of pain hours/number of attacks) before and after treatment. Before treatment, mean (SD)



**Fig. 2.** Box plot for the duration of migraine attacks (in hours of pain) in placebo and DAO groups one month before (C1) and after one month of treatment (C2). The bottom and top of the box (interquartile range) are the percentile 25 and the percentile 75, respectively. Central line represents the median. Lines extending vertically from the boxes (whiskers) indicate variability outside the interquartile range. Outliers are plotted as circles and extreme outliers as asterisks.

values were 7.5 h (4.2) and 6.1 h (3.1) for placebo and DAO group, respectively. A statistically significant reduction in the duration of pain was obtained in DAO group after one month of treatment ( $p = 0.0217$ ). Although to a smaller extent, a reduction in this outcome was also observed in placebo group, but without statistical significance. Regarding the difference between groups, patients treated with DAO supplement reached a higher reduction of

migraine attack duration (1.4 h) than in placebo group (0.9 h), although with a lack of statistical significance. When considering the number of attacks, significant reduction was found both in DAO group (2.67 attacks,  $p = 0.0004$ ) and in placebo group (2.16 attacks,  $p = 0.0059$ ). Similar reductions in the frequency of migraine attacks were achieved in both study groups. Regarding pain intensity, similar scores were found before and after the treatment in both groups (Table 2).

No adverse effects were registered in patients with DAO supplementation. Only one patient of the placebo group described gastrointestinal troubles and subsequently abandoned the study.

Figure 3 shows the percentage of patients who used triptans before and after the treatment with placebo or DAO. A reduction of patients taking triptans was observed in DAO group whereas in placebo group there was an increase in patients with triptans intake. Figure 4 illustrates the intake of triptans before and after one month of treatment with placebo or DAO for each of the patients that reported consumption. In fact, among individuals treated with DAO, 44% of them reduced triptans intake (5 reported a total withdrawal), 30% remained unchanged and 26% increased the intake of these drugs. On the contrary, an increase in triptans intake in the placebo group was recorded in 57% of the individuals. However, in neither case the association was statistically significant.

#### 4. Discussion

To our knowledge, this is the first double-blind randomized trial to assess the effect of DAO supplementation in migraine patients. Currently the main measure to prevent or mitigate the symptomatology related to histamine intolerance by DAO deficiency is the dietary management avoiding foods with high contents of histamine or other bioactive amines also metabolized by DAO, such as putrescine and cadaverine, as well as foods described as histamine-releasing [4,5,21]. Several intervention studies have demonstrated the effectiveness of histamine restrictive diets, some of them specifically focused on headache, with positive results in most of the patients involved in each study [12,13,22,23]. However, the wide and variable distribution of histamine in foods together with other

**Table 2**

Duration, number and pain intensity of migraine attacks in placebo and DAO groups before (C1) and after one month of treatment (C2).

			Placebo N = 43	DAO N = 39	$p^a$
Duration of attacks (hours)	Before treatment (C1)	Mean (SD) min–max	7.53 (4.24) 0 to 21	6.14 (3.06) 1.8 to 15	
	After treatment (C2)	Mean (SD) min–max	6.68 (4.42) 0 to 16.5	4.76 (2.68) 0 to 11	
	C2–C1	Mean (SD) min–max $p^b$	–0.85 (5.35) –15.2 to 10.5 0.3034	–1.38 (3.60) –15.0 to 6.6 0.0217	0.6040
Number of attacks/month	Before treatment (C1)	Mean (SD) min–max	9.26 (5.21) 0 to 20	10.18 (4.44) 1 to 20	
	After treatment (C2)	Mean (SD) min–max $p^b$	7.09 (4.97) 0 to 20 0.0059	7.51 (4.97) 0 to 19 0.0004	
	C2–C1	Mean (SD) min–max $p^b$	–2.16 (4.88) –15.0 to 8.0 0.0885	–2.67 (4.26) –15.0 to 5.0 0.5117	0.6172
Pain intensity (NPRS score)	Before treatment (C1)	Mean (SD) min–max	5.62 (1.57) 0 to 9	5.27 (1.43) 1.4 to 7.9	
	After treatment (C2)	Mean (SD) min–max $p^b$	4.88 (2.31) 0 to 8.5 0.0885	5.07 (2.02) 0 to 8.6 0.5117	
	C2–C1	Mean (SD) min–max $p^b$	–0.71 (2.67) –7.8 to 7.8	–0.21 (1.98) –7.0 to 2.0	0.3424

SD: standard deviation; min: minimum; max: maximum; NPRS: Numeric Pain Rating Scale.

<sup>a</sup>  $p$ -value for the statistical differences between placebo and DAO groups.

<sup>b</sup>  $p$ -value for the statistical differences between before (C1) and after (C2) treatment.

Author's Personal Copy

156

J. Izquierdo-Casas et al. / Clinical Nutrition 38 (2019) 152–158

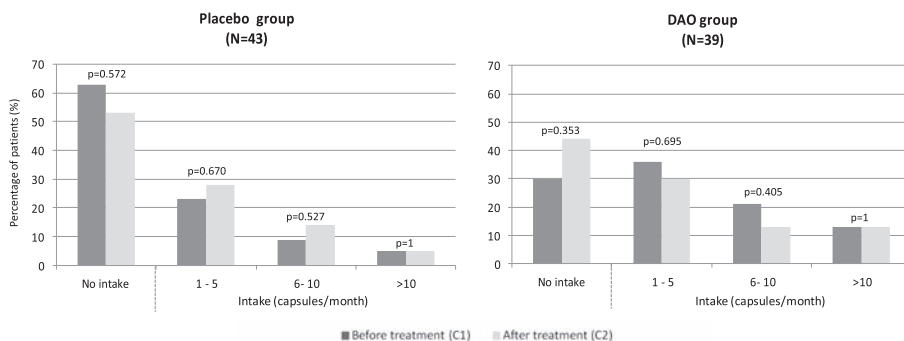


Fig. 3. Percentage of patients who used triptans before (C1) and after one month of treatment (C2) with placebo or DAO. The triptans intake classification was: no intake, low (1–5 capsules/month), moderate (between 6 and 10 capsules/month) and high (more than 10 capsules/month).

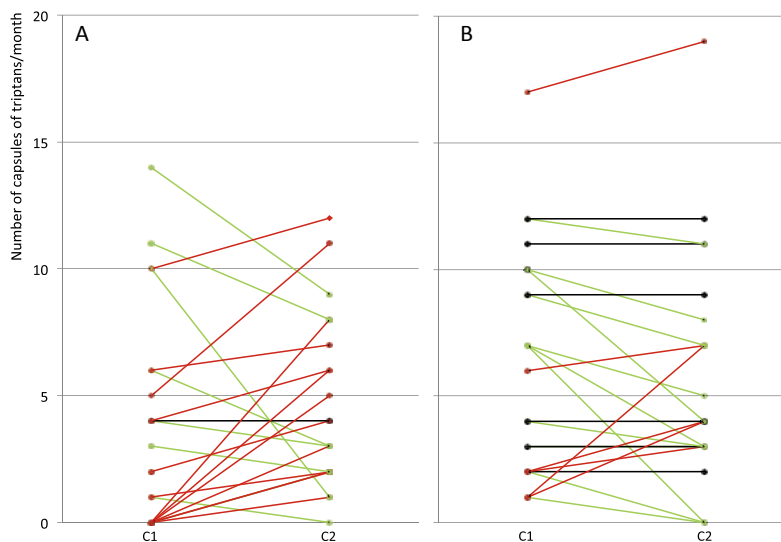


Fig. 4. Number of capsules of triptans required before (C1) and after (C2) one month of treatment with placebo (A) or DAO supplementation (B) for each of the patients that reported consumption. Red line means an increase, green line means a decrease and black line means no change in the triptan intake after one month of treatment.

additional restrictions (histamine-releasing foods and presence of other bioactives amines) makes difficult the diet adherence and increases the risk of nutritional imbalances. The use of DAO supplementation could be an alternative to a histamine-free diet or be useful to make easier its compliance.

In our double-blind randomized clinical study, DAO enzyme supplementation consisted in porcine kidney extract micro-encapsulated with a shellac gastroresistant coating that guaranteed its resistance in the pH of the stomach and subsequently its hydrolysis by pepsin. Intestinal conditions allow the release of the unaltered enzyme that will potentially resist the proteolytic attack of trypsin and chymotrypsin. In fact, Federico et al. [24] reported a

high in vitro stability of DAO of plant origin in the presence of trypsin, with 100% of the enzymatic activity during the first 45 min.

The administration of the DAO supplement was able to significantly reduce the mean duration of migraine attacks by 1.4 h (from an initial mean value of 6.1 h). The duration of migraine attacks has been used as an efficacious measure to assess the clinical and quality of life impact of the treatment [25–27]. On the other hand, the effect of this supplementation in the migraine frequency could not be established because both study groups showed a significant reduction greater than 2 monthly attacks. Moreover, the lack of significance observed between groups could be explained by the limited duration of one month of treatment. A longer intervention



## Author's Personal Copy

J. Izquierdo-Casas et al. / *Clinical Nutrition* 38 (2019) 152–158

157

period might confirm the trend observed in the current study about the effects of DAO supplementation on migraine improvement.

Regarding pain intensity, no differences were found based on the NPRS score reported by the subjects from both groups. The usefulness of this scale has been questioned in patients with long-term pain because they tend to score between 4 and 6 (golden section) [28]. Likewise, the use of triptans (allowed in this study), could cover up the real perception of pain.

Patients with DAO deficiency could be stratified as reduced DAO activity level (40–80 HDU/ml) and markedly reduced DAO activity level (<40 HDU/ml). In this study, only few individuals showed a markedly reduced DAO activity, with 7 and 4 patients in the placebo and DAO group, respectively. The reduced number of subjects with markedly reduced DAO activity, which did not allow the stratification of these patients, together with the fact that all subjects received the same dose of treatment, could diminish the strength of the current study. Markedly reduced DAO activity patients could require a higher dose to reach the improvement of symptomatology.

A trend to diminish the triptans intake was observed in DAO group, with some patients that abandoned the use of triptans. A reduction of the number of patients with low and moderate intake of these drugs was also observed. The reduction in triptans intake could indicate a decrease in the intensity of pain during migraine crisis. This trend was not observed in the placebo group where the intake of triptans increased in comparison with the baseline.

There are few studies about the efficacy of DAO supplementation in the improvement of headache and other symptoms associated with histamine intolerance [29,30], and all of them with a lower number of patients involved. A randomized double-blind crossover provocation study [29], using histamine containing and histamine-free tea in combination with DAO capsules or placebo in 39 patients with histamine intolerance revealed that two capsules of DAO supplementation reduced the appearance of headache, skin reactions, and respiratory and gastrointestinal disorders in comparison with placebo. Recently, Manzotti et al. [30] also observed that DAO supplementation for a period of at least two weeks was associated with a reduction of one or more of the reported symptoms in 13 out of 14 patients with histamine intolerance. When DAO supplementation was associated with low-histamine diet a higher reduction of symptoms was reported in comparison to the diet alone. However, in this study no placebo group was considered.

In the current trial the efficacy of DAO supplementation was assessed after only one month of treatment, so probably, a longer treatment period could lead to a great improvement. Moreover, no complementary dietary intervention was considered, and then it is possible that DAO supplementation together with histamine free-diet could enhance the results of the treatment. Likewise, in further studies it would be of interest to segregate patients in different grades of DAO deficiency. Therefore, more randomized placebo-controlled studies, preferably with a cross-over design, are needed to assess the benefits of DAO supplementation for a longer treatment period, and the combined effect of DAO supplement together with histamine free diet, which would make diets less restrictive and improve patients quality of life.

#### Sources of support

DR Healthcare (Barcelona, Spain) has provided DAO supplement and placebo capsules. Oriol Comas-Basté is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF 2015).

#### Conflict of interest

None of the authors reported a conflict of interest related to the study.

#### Acknowledgements

The authors' responsibilities were as follows — JIC, MCVC, MLM and LSS: designed the research; JIC and AD: conducted research; OCB, MLM and MCVC: analyzed data and performed statistical analysis; JIC, OCB, MLM and MCVC: wrote the paper; and all authors: critically reviewed the manuscript for important intellectual content and read and approved the final manuscript.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.013>

#### References

- [1] EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J* 2011;9:2393.
- [2] Bover-Cid S, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Biogenic amines. In: Motarjemi Y, Moy GG, Todd ECD, editors. *Encyclopedia of food safety*, vol. 2. Elsevier Inc; 2014. p. 381–91.
- [3] Schwelberger HG. Histamine intolerance: a metabolic disease? *Inflamm Res* 2010;59:85–9. <https://doi.org/10.1007/s00111-009-0134-3>.
- [4] Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1185–96.
- [5] Kovacova-Hanusova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol* 2015;43:498–506. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>.
- [6] García-Martín E, Martínez C, Serrador M, Alonso-Navarro H, Ayuso P, Navacerrada F, et al. Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine. *Headache* 2015;55:276–86. <https://doi.org/10.1111/head.12493>.
- [7] Fogel WA, Lewinski A, Jochem J. Histamine in food: is there anything to worry about? *Biochem Soc Trans* 2007;35:349–52.
- [8] Küfner MA, Ulrich P, Raitzel M, Schwelberger HG. Determination of histamine degradation capacity in extremely small human colon samples. *Inflamm Res* 2001;50(suppl. 2):S96–97.
- [9] Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:E23–5. <https://doi.org/10.1002/ibd.21588>.
- [10] Rosell-Camps A, Zibetti S, Perez-Esteban G, Vila-Vidal M, Ramis L, García T. Histamine intolerance as a cause of chronic digestive complaints in pediatric patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2013;105:201–7. <https://doi.org/10.1016/j.ree.2013.105.4.201-207>.
- [11] Latorre-Moratalla ML, Comas-Basté O, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food Chem Toxicol* 2017;99:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.011>.
- [12] Steinbrecher I, Jarisch R. Histamin und kopfschmerz [Histamine and headache]. *Allergologie* 2005;28:84–91.
- [13] Maintz L, Benfadal S, Allam JP, Hagemann T, Fimmers R, Novak N. Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1106–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.041>.
- [14] Wagner N, Dirk D, Peveling-Oberhag A, Reese I, Rady-Pizarro U, Mitzel H, et al. A Popular myth — low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria — fact or fiction? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016. <https://doi.org/10.1111/jdv.13966>.
- [15] Hoffmann M, Gruber E, Deutschmann A, Jahnel J, Hauer A. Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Arch Dis Child* 2016;98:832–3. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305024>.
- [16] Izquierdo-Casas J, Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Lorente-Gascón M, Duelo A, Vidal-Carou MC, et al. Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. *J Physiol Biochem* 2017. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0571-3>.
- [17] Rasmussen BK. Epidemiology of headache. *Cephalalgia* 2001;21:774–7.
- [18] Astadhaug MD. Histamine in migraine and brain. *Headache* 2014;54:246–59. <https://doi.org/10.1111/head.12293>.
- [19] Duarte H, Teixeira A, Rocha N, Domingues R. Increased serum levels of adiponectin in migraine. *J Neurol Sci* 2014;342:186–8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.04.035>.
- [20] International Headache Society (IHS). The international classification of headache disorders 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013;33(9):629–808. <https://doi.org/10.1177/033102413485658>.
- [21] Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Dieta baja en histamina. In: *Nutrición y dietética clínica*. 3rd ed. Barcelona: Elsevier-Masson SA; 2014. p. 431–5.
- [22] Musić E, Korošec P, Silar M, Adamić K, Košnik M, Rijavec M. Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wien Klin Wochenschr* 2013;125:239–43. <https://doi.org/10.1007/s00508-013-0354-y>.

## Author's Personal Copy

158

*J. Izquierdo-Casas et al. / Clinical Nutrition 38 (2019) 152–158*

- [23] Wantke F, Gotz M, Jarisch R. Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clin Exp Allergy* 1993;23:982–5.
- [24] Federico R, Befani O, Mondovi B, Mulhbacher J, Mateescu MA. Immobilization of plant histaminase for medical applications. *Inflamm Res* 2000;49:S60–1. <https://doi.org/10.1007/PL00000184>.
- [25] Kosinski M, Bayliss MS, Bjorner JB, Ware Jr JE, Garber WH, Batenhorst A, et al. A six-item short-form survey for measuring headache impact: the HIT-6™. *Qual Life Res* 2003;12(8):963–74. <https://doi.org/10.1023/A:1026119331193>.
- [26] Wells RE, Burch R, Paulsen RH, Wayne PM, Houle TT, Loder E. Meditation for migraines: a pilot randomized controlled trial. *Headache* 2014;54:1484–95. <https://doi.org/10.1111/head.12420>.
- [27] Smelt AF, Louter MA, Kies DA, Blom JW, Terwindt GM, Van der Heijden GJ, et al. What do patients consider to be the most important outcomes for effectiveness studies on migraine treatment? Results of a Delphi study. *PLoS One* 2014;9, e98933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098933>.
- [28] Dixon JS, Bird HA. Reproducibility along a 10 cm vertical visual analogue scale. *Ann Rheum Dis* 1981;40:87–9.
- [29] Komericki P, Klein G, Reider N, Hawranek T, Strimitzer T, Lang R, et al. Histamine intolerance: lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien Klin Wochenschr* 2011;123(1–2):15–20. <https://doi.org/10.1007/s00508-010-1506-y>.
- [30] Manzotti G, Breda D, Giocchino M, Burastero SE. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015;1:7. <https://doi.org/10.1177/0394632015617170>.



#### 4.7. Noves fonts d'enzim DAO: potencial dels llegums per al tractament de la intolerància a la histamina

##### PUBLICACIÓ 7

**Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance**

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Judit Rabell-González, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

*LWT - Food Science and Technology*, 2020, 125, 109201.

Índex d'impacte (JCR 2019): 4,006

Posició en l'àrea "Food Science and Technology": Q1 (28/139)

##### COMUNICACIÓ ORAL 1 | Premi a la millor comunicació oral

Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, Sònia Sánchez-Pérez, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Nuevas fuentes de enzima DAO: del riñón de cerdo a los brotes de legumbre. II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias**, 2019, Almeria.

##### COMUNICACIÓ ORAL 2 | Premi a la millor comunicació oral

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Roberto Garza-Guajardo, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **What about legumes as a plant source of the DAO enzyme? XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA)**, 2018, Barcelona.

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 6

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Brotes de legumbre como potencial fuente vegetal de enzima DAO. XIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)**, 2018, Salamanca.

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 7

Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, Federica Pederzani, Sònia Sánchez-Pérez, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. **Histamine-degrading capacity of lyophilised legume sprouts. XVIII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)**, 2019, Soria.

## PLANTEJAMENT I OBJECTIU

Actualment, la legislació europea de nous aliments contempla únicament l'ús d'extracte proteic de ronyó porcí per a l'elaboració dels complements d'enzim DAO. No obstant això, certs treballs han posat de manifest una major capacitat catalítica dels enzims d'origen vegetal en comparació amb els d'origen animal a l'hora de degradar certs substrats amino. Tal com s'ha descrit a l'apartat 4.4.1, l'activitat degradant d'histamina dels brots de pèsol liofilitzats va mostrar nivells d'activitat enzimàtica igual o superiors als de l'extracte de ronyó porcí.

Des d'un punt de vista comercial, disposar d'una font vegetal d'aquest enzim permetria ampliar el *target* d'aquest nou aliment per a persones intolerants vegetarianes/veganes, així com amb restriccions religioses pel que fa al consum d'aliments derivats del porc. Addicionalment, l'obtenció d'enzim DAO a partir de llegums suposaria una pràctica alineada amb els actuals objectius de desenvolupament sostenible de l'Agenda 2030 i afegiria un valor afegit a aquest aliment d'origen vegetal.

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar *in vitro* la capacitat per degradar histamina de llavors de llegums i dels seus brots per tal de valorar el seu potencial interès com a ingredient funcional de complements enzimàtics d'enzim DAO per al tractament de la intolerància a la histamina. Així mateix, també es van estudiar les condicions òptimes de germinació i emmagatzematge per assegurar la màxima activitat DAO d'aquesta matriu d'origen vegetal.

## METODOLOGIA

Per tal d'estudiar el potencial dels llegums com a font d'enzim DAO per al tractament de la intolerància a la histamina es van considerar 10 espècies diferents de lleguminoses (i.e. alfals, faves, cigrons, mongetes, guixa, pèsol, llentia, mongeta mung, soja i tramús), tant en forma de llavor seca com del seu brot (germinat). Per a l'obtenció dels brots, les llavors es van amarrar en aigua durant 8 hores per posteriorment germinar-les en un incubador en condicions controlades (27 °C, 70% HR). Les condicions de germinació estudiades van ser el temps d'incubació (3, 6 i 9 dies) i la lluminositat (presència i absència de llum). Un cop germinats, els brots es

van recol·lectar, esbandir amb aigua, congelar (-80 °C), liofilitzar i, finalment, triturar per tal d'obtenir un producte concentrat i homogeni. Es va estudiar l'estabilitat de l'activitat enzimàtica dels brots liofilitzats de llentia i cigrons conservats en congelació (-20 °C), refrigeració (4 °C) i a temperatura ambient (20 °C) als 2, 4, 6 i 12 mesos d'emmagatzematge protegits de la llum i la humitat. L'activitat DAO es va determinar mitjançant el mètode prèviament desenvolupat i validat (apartat 4.4.1).

## RESULTATS

Les llavors seques d'alfals, faves, mongetes, llenties i tramús van ser les úniques que van mostrar activitat DAO *in vitro*. Concretament, va destacar la capacitat enzimàtica de les llenties ( $1,95 \pm 0,05$  mU/g), mentre que la resta de llavors van presentar una activitat DAO que oscil·lava entre els 0,14 i els 0,55 mU/g.

En els brots de llegums es va confirmar que el procés de germinació va provocar un augment important de l'activitat enzimàtica DAO, amb valors, depenent de l'espècie de llegum, d'entre 164 i 285 vegades el de la llavor seca. De fet, tots els brots dels llegums estudiats van mostrar capacitat enzimàtica, a excepció dels brots de mongetes i de mongetes mung. En particular, la major activitat DAO es va obtenir en els brots de pèsol ( $408,3 \pm 16,4$  mU/g) i guixa ( $398,1 \pm 26,6$  mU/g) ( $p < 0,05$ ), seguits de ben a prop pels germinats de llentia, soja i cigrons (301 – 322 mU/g).

La durada i la lluminositat del període de germinació de les llavors de llentia i cigrons van influir en l'activitat DAO dels brots obtinguts. Específicament, la major capacitat enzimàtica es va obtenir en brots germinats durant 6 dies ( $p < 0,05$ ). A més, en el cas dels cigrons, es va observar una davallada significativa de l'activitat enzimàtica entre el dies 6 i 9 de germinació ( $p < 0,05$ ). En referència a la lluminositat, es va obtenir la màxima activitat DAO en els brots germinats en absència de llum, independentment dels dies de germinació i de l'espècie botànica estudiada ( $p < 0,05$ ).

La conservació en congelació va ser capaç de mantenir l'activitat DAO intacta durant almenys 12 mesos. Per contra, un any d'emmagatzematge en refrigeració va suposar una pèrdua mitja del 55% ( $\pm 0,002\%$ ) i del 62% ( $\pm 0,001\%$ ) en l'activitat DAO

dels brots liofilitzats de cigrons i llenties, respectivament. La major pèrdua d'activitat enzimàtica va tenir lloc en la conservació a temperatura ambient d'ambdós productes, especialment en els brots liofilitzats de llenties, amb una pèrdua del 83% ( $\pm 0,002\%$ ) al cap de 12 mesos.

## APORTACIONS MÉS RELLEVANTS

- Certes llavors de llegums habitualment consumits al nostre entorn, així com els seus brots (germinats), tenen capacitat per degradar histamina *in vitro*.
- Els brots liofilitzats de determinats llegums (e.g. pèsol, guixa, llentia, soja i cigrons) mostren una elevada activitat DAO *in vitro*, igual o superior a la obtinguda en l'extracte de ronyó porcí emprat actualment per a la formulació de complements d'enzim DAO exogen.
- La germinació dels llegums durant 6 dies en absència de llum van ser les condicions òptimes per a obtenir un brot amb la màxima activitat DAO.
- La liofilització dels brots de llegums és un tractament idoni per obtenir un producte concentrat i homogeni, essent respectuós amb la seva activitat enzimàtica.
- L'estabilitat de l'activitat enzimàtica dels brots de llegum liofilitzats queda restringida a la seva conservació en congelació, mentre que la refrigeració únicament garanteix l'activitat DAO del producte durant els primers 6 mesos.

## L'ARTICLE EN UN TUIT



Els brots liofilitzats de diversos llegums mostren una elevada capacitat per degradar histamina *in vitro* que els posiciona com a potencial ingredient funcional de complements d'enzim DAO d'origen vegetal per al tractament de la intolerància a la histamina.





Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance

Oriol Comas-Basté<sup>a,b,c</sup>, M. Luz Latorre-Moratalla<sup>a,b,c</sup>, Judit Rabell-González<sup>a,b,c</sup>,  
M. Teresa Veciana-Nogués<sup>a,b,c</sup>, M. Carmen Vidal-Carou<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>b</sup> Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>c</sup> Xarxa de Referència en Tecnologia Dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA), C/ Baldri Reixac 4, 08028, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Histamine  
Histamine intolerance  
Diamine oxidase (DAO) enzyme  
Legumes  
Food supplement

### ABSTRACT

Diamine oxidase (DAO) is one of the key enzymes involved in the degradation of dietary histamine. An imbalance of histamine scavenging systems leads to histamine intolerance, a diet-related disorder that may be tackled by following a low-histamine diet. Recently, the supplementation with exogenous DAO enzyme of animal origin has received the green light as a novel food to enhance intestinal degradation of histamine. This work performed a screening for histamine-degrading capacity of *Leguminosae* species in order to explore its potential suitability as plant-derived active ingredient of enzymatic supplements. *In vitro* DAO activity was determined both in raw pulses and lyophilised sprouts by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FLD and several germination and storage conditions were assessed. The sprouts of edible legumes showed an *in vitro* histamine-degrading capacity ranging from 36.0 to 408.3 mU g<sup>-1</sup>, much higher than that found for the non-germinated seeds (0.14–1.95 mU g<sup>-1</sup>). The germination of legume seeds for 6 days in darkness provided the maximum DAO activity. Only the freezing storage of the lyophilised sprouts kept the enzymatic activity intact for at least 12 months. These results demonstrate that certain edible legumes could be suitable for the formulation of DAO supplements for the treatment of histamine intolerance.

### 1. Introduction

Histamine intolerance is a diet-related disorder that has been drawing the attention of the scientific community for the past two decades, although its awareness by both researchers and consumers has experienced a sharp increase during the last five years. Unlike in the well-known histamine intoxications, where the causative agent is clearly identified as unusually high amounts of histamine ingested through food, in histamine intolerance the interindividual functionality of the intestinal histamine degradation system plays a key role (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011; Sánchez-Pérez et al., 2018). Specifically, histamine intolerance, also referred to as food histaminosis or food histamine sensitivity, is a disorder in the homeostasis of histamine caused by an imbalance in the degradation of dietary histamine that entails the onset of allergy-like symptoms, occurring even after the ingestion of small amounts of this amine (Maintz & Novak, 2007; Comas-Basté, Latorre-Moratalla, Bernacchia, Veciana-

Nogués, & Vidal-Carou, 2017; Tuck, Biesiekierski, Schmid-Grendelmeier, & Pohl, 2019).

Diamine oxidase (DAO) and histamine-*N*-methyltransferase (HNMT) are the two enzymes in charge of the histamine scavenging system in humans (Kaur et al., 2019). Due to its intestinal location, DAO is the key enzyme in the degradation of ingested histamine and its deficit has been suggested to be the main cause of histamine intolerance (Kovacova-Hanuszkova, Buday, Gavliakova, & Plevkova, 2015; Tuck et al., 2019; Kaur et al., 2019). Impaired DAO activity may be of genetic or acquired origin, with several causes capable to permanently or punctually compromise either the expression or the activity of DAO (Table 1) (Maintz et al., 2011; García-Martín et al., 2015; Kaur et al., 2019; Wagner, Buczyłko, Zielińska-Bliźniewska, & Wagner, 2019).

Histamine intolerance is characterized by a wide variety of non-specific gastrointestinal and extraintestinal symptoms owing to the distribution of the four histamine receptors along the different tissues and systems of the organism (Table 1) (Kovacova-Hanuszkova et al.,

\* Corresponding author. Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain.  
E-mail address: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu) (M.C. Vidal-Carou).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109201>

Received 10 January 2020; Received in revised form 21 February 2020; Accepted 22 February 2020

Available online 26 February 2020

0023-6438/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



**Table 1**  
Etiology and main symptoms of histamine intolerance.

Etiology	
Congenital	Genetic mutations in DAO gene (chromosome 7q34-q36) resulting in an altered expression or activity of the enzyme
Pathological	Inflammatory or degenerative intestinal disorders that compromise the secretion of DAO
Drug-induced	Enzymatic blockade by certain drugs (e.g. acetylcysteine, cimetidine, clavulanic acid and verapamil)
Symptoms	
Gastrointestinal tract	Bloating, flatulence, postprandial fullness, diarrhea, abdominal pain, constipation, nausea, emesis
Skin	Pruritus, flush, urticaria, eczema, swelling
Circulatory system	Tachycardia, hypotonia, collapse
Nervous system	Headache, dizziness
Respiratory apparatus	Rhinorrhea, rhinitis, nasal congestion, sneezing, dyspnea

2015; Tuck et al., 2019; Schnedl et al., 2019a). Gastrointestinal complaints have been found to be the most prevalent symptoms and according to a retrospective analysis performed by Schnedl et al. (2019a) the appearance of complex symptom combinations with more than three manifestations was recorded in 97% of the histamine intolerant individuals. Undoubtedly, the low specificity of histamine intolerance symptoms may account for the current challenges of its diagnosis (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015). Nowadays, the diagnosis is made after excluding IgE-mediated food allergies or underlying systemic mastocytosis, and by the presentation of two or more typical symptoms and their improvement after following a low-histamine diet (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015; Schnedl et al., 2019a; Schnedl et al., 2019b). Nevertheless, the determination of serum DAO activity levels and the identification of SNPs or non-invasive biomarkers are currently being assayed in the search of evidence-based support to establish a clear diagnostic criterion (Comas-Basté et al., 2017; Izquierdo-Casas et al., 2018; Tuck et al., 2019).

The most advised strategy to prevent the onset of symptoms is following a low-histamine diet (Maintz & Novak, 2007; San Mauro Martin, Brachero, & Garicano Vilar, 2016; Sánchez-Pérez et al., 2018; Tuck et al., 2019). Several clinical studies are gathering increasing evidence on the efficacy of histamine exclusion on the improvement or remissions of symptoms (Guida et al., 2000; Hoffmann, Gruber, Deutschmann, Jahnel, & Hauer, 2013; Siebenhaar et al., 2016; Wagner et al., 2017; Son, Chung, Kim, & Park, 2018). In general, low-histamine diets exclude those foods susceptible to contain histamine due to bacterial spoilage (i.e. fish and preserved fishery products) or by fermentative processes (i.e. cheeses, sausages, wine, beer, sauerkraut and fermented soy derivatives) (Comas-Basté, Latorre-Moratalla, Sánchez-Pérez, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2019a; Sánchez-Pérez et al., 2018). However, the wide and variable occurrence of this amine in foods leads to highly restrictive diets and makes it difficult to generate well-founded dietary recommendations (Sánchez-Pérez et al., 2018; Schnedl et al., 2019b; San Mauro Martin et al., 2016). Orally supplemented DAO enzyme has been proposed as a complementary treatment strategy that aims to improve histamine intolerants quality of life by enhancing their intestinal degradation of histamine (Comas-Basté, Latorre-Moratalla, Sánchez-Pérez, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2019b). Recently, the European Commission has granted the authorization as a novel food to porcine kidney protein extract as a food supplement in the form of enteric coated capsules (EU 2018/1023). The few available clinical studies are reporting variable yet promising efficacy rates for DAO oral supplementation in the remission of gastrointestinal, dermatological or neurological complaints associated to histamine intolerance (Komerickí et al., 2011; Manzotti, Breda, Bioacchino, & Burastero, 2016; Yacoub et al., 2018; Izquierdo-Casas et al., 2019; Schnedl et al., 2019b). However, until now little importance has been given to investigate for an alternative plant-derived source to formulate this enzymatic supplement. Some plant-derived amine oxidase enzymes have been used to design biosensors for the bio-recognition of biogenic amines as indicators of freshness in foods

(Kivirand & Rincken, 2011). Recently, a published work from our research group has demonstrated a high *in vitro* histamine-degrading activity in lyophilised pea sprouts, thus indicating the potential nutraceutical role of legumes for the supplementation of DAO activity (Comas-Basté et al., 2019b). In this sense, a vegetal source of DAO enzyme could widen the target population of this enzymatic supplements while promoting more sustainable production practices.

Therefore, the aim of this work was to perform a screening for *in vitro* histamine-degrading capacity of frequently consumed Leguminosae species in the form of raw pulses and sprouts in order to evaluate its potential suitability as functional ingredient of enzymatic supplements for histamine intolerance. In addition, different sprouting and storage conditions were assayed in order to establish optimal settings to ensure maximum enzymatic activity of this plant-origin food matrix.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

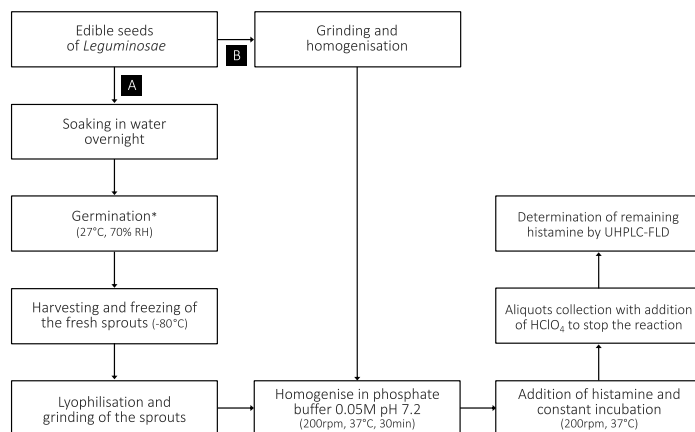
Histamine dihydrochloride and purified DAO from porcine kidney were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). UHPLC-grade methanol and acetonitrile, hydrochloric acid 0.1M, perchloric acid 70%, sodium di-hydrogen phosphate anhydrous and di-sodium hydrogen phosphate anhydrous were obtained from PanReac Química (Castellar del Vallès, Spain). Acetic acid, boric acid, 1-octanesulfonic acid sodium salt, phthalaldehyde (OPA) and brij® L23 solution were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); sodium acetate anhydrous, potassium hydroxide and 2-mercaptoethanol from Merck (Darmstadt, Germany). A LaboStar System from Evoqua Water Technologies (Warrendale, PA, USA) was used to produce ultrapure water (18.2 MΩcm).

### 2.2. Legume species

The following ten different species of the Leguminosae or Fabaceae plant family were considered in this study: alfalfa (*Medicago sativa* L.), broad bean (*Vicia faba* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), grass pea (*Lathyrus sativus* L.), lentil (*Lens culinaris* Medik.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), green pea (*Pisum sativum* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and white lupin (*Lupinus albus* L.). The edible seeds of these frequently consumed legumes were acquired from local supermarkets and analysed for its DAO enzymatic activity both as raw pulses and as lyophilised sprouts.

### 2.3. Obtention of lyophilised legume sprouts

For the obtention of the lyophilised legume sprouts, also known as legume epicotyls or seedlings, the seeds were soaked in distilled water overnight, strained and placed in an incubator (Memmert®, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) over inert-surface trays for its



**Fig. 1.** Overall experimental procedure for the *in vitro* determination of DAO activity of lyophilised legume sprouts (a) and raw pulses (b). \*Germination conditions of 3/6/9 days and presence/absence of light were tested.

germination (27 °C, 70% RH) (Fig. 1A). Different germination period length (3, 6 and 9 days) and luminosity (absence and presence of light) provided by cool white fluorescent lamps) combinations were performed in order to establish the optimal growing conditions that provided maximum DAO capacity of the sprouts. Water was sprayed every 12 h for seed germination. After germination, fresh legume sprouts were harvested, rinsed with distilled water and stored frozen in an ultra-low temperature freezer (−80 °C). Prior to analysis, samples were freeze-dried (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Spain) and grinded in a mortar to provide a concentrated and homogenized lyophilised product.

#### 2.4. Determination of DAO activity

DAO activity was determined both in lyophilised legume sprouts and in grinded raw pulses (Fig. 1B). The determination of the *in vitro* histamine-degrading activity of the samples was performed following a procedure previously described by the authors (Comas-Basté et al., 2019b). The detailed analytical protocol, the validation outcomes (i.e. linearity, sensitivity, precision and recovery) and the method attributes in terms of specificity for the substrate and the lack of matrix interferences are duly described in Comas-Basté et al. (2019b). Overall, this method is based on the monitoring of histamine degradation over the oxidative deamination reaction by DAO enzyme through an enzymatic assay coupled to ion-pair reverse-phase UHPLC and fluorescence detection. A shaker incubator (Ivymen® 100-D, JP SELECTA S.A., Abrera, Spain) was used for the enzymatic reaction and the chromatographic separation was achieved by an Acquity™ UHPLC apparatus (Waters Corp., Milford, MA, USA). In brief, the enzymatic reaction is promoted throughout the addition of 45 μmol/L histamine dihydrochloride to the leguminous sample homogenized in a 0.05 mol/L phosphate buffer solution (pH 7.2). The subsequent chromatographic analysis of aliquots along the enzymatic reaction allows to monitor histamine reduction and to estimate DAO activity, expressed as nmol of degraded histamine per minute/g of plant-tissue (mU g<sup>−1</sup>). Fig. 2 contains four overlapping chromatograms where the degradation of histamine over the reaction time by a sample of lyophilised lentil sprouts may be seen. Purified DAO enzyme from porcine kidney was used as positive control.

#### 2.5. Assessment of the stability of the enzymatic capacity of lyophilised legume sprouts during storage

The stability of the DAO activity of the lyophilised product was assessed over 12-month storage under three different temperatures: freezing (−20 °C), refrigeration (4 °C) and room temperature (20 °C). Lentil and chickpea lyophilised sprouts were preserved in sealed tubes protected from light and humidity at selected storage conditions and the enzymatic activity was re-evaluated after 2, 4, 6 and 12 months as previously described in section 2.3.

#### 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using IBM SPSS Statistics 23.0 statistical software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). All results are presented as mean values ± their standard deviation (mean ± SD) of at least three independent experiments performed in duplicate. The Student's *t*-test was applied to investigate the statistical significance of changes in the enzymatic activity among the different studied conditions. Differences with *p* < 0.05 were considered statistically significant.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. DAO activity of pulses and lyophilised legume sprouts

Table 2 shows the *in vitro* histamine-degrading capacity of the raw pulses and the lyophilised sprouts of ten different species of Leguminosae. The raw pulses that showed histamine-degrading activity were alfalfa, broad bean, common bean, lentil and white lupin. Among them, the highest enzymatic activity was detected in the dry seeds of lentils (1.95 ± 0.05 mU g<sup>−1</sup>) (*p* < 0.05). The other DAO-positive raw pulses showed much lower activity values, ranging from 0.14 to 0.55 mU g<sup>−1</sup>. These results demonstrate the histamine-degrading ability of certain ungerminated legume seeds, in contrast with previously published works that dismissed the enzymatic activity of raw pulses to degrade amine substrates (Torrighiani, Serafini-Fracassini, & Fara, 1989; Joseph & Srivastava, 1995). The good detection ability of the currently used method (i.e. detection limit of 0.025 mU) provided enough sensitivity to measure the DAO activity found in certain ungerminated legumes (Comas-Basté et al., 2019b).

Regarding the lyophilised legume sprouts, practically all analysed

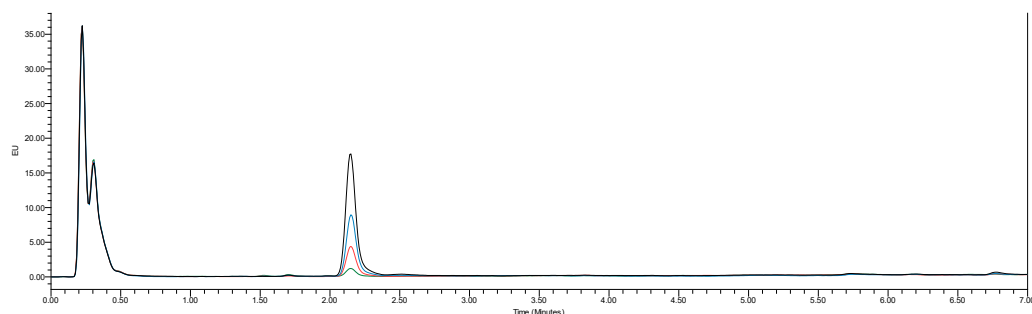


Fig. 2. Overlapping chromatograms of histamine at the starting point (black) and after 1 h (blue), 2 h (red) and 4 h (green) of reaction for a sample of lyophilised lentil sprouts. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2

DAO activity (mean  $\pm$  SD) of raw pulses and lyophilised sprouts of different species of *Leguminosae* germinated during 6 days in darkness<sup>a</sup>.

Legume		DAO activity (mU g <sup>-1</sup> )	
Scientific name	Common name	Raw pulse	Lyophilised sprout
<i>Medicago sativa</i> L.	Alfalfa	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	142.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
<i>Vicia faba</i> L.	Broad bean	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	90.1 $\pm$ 6.9 <sup>a,b</sup>
<i>Cicer arietinum</i> L.	Chickpea	–	301.0 $\pm$ 9.3 <sup>c</sup>
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Common bean	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	–
<i>Lathyrus sativus</i> L.	Grass pea	–	398.1 $\pm$ 26.6 <sup>d</sup>
<i>Pisum sativum</i> L.	Green pea	–	408.3 $\pm$ 16.4 <sup>d</sup>
<i>Lens culinaris</i> Medik.	Lentil	1.95 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	322.0 $\pm$ 18.1 <sup>c</sup>
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	Mung bean	–	–
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Soybean	–	305.9 $\pm$ 8.8 <sup>c</sup>
<i>Lupinus albus</i> L.	White lupin	0.14 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	36.0 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mean values in the same column followed by different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

samples showed *in vitro* histamine-degrading capacity, although with a great variability among different *Leguminosae* species. The sprouts of beans and mung beans did not show this enzymatic activity. In detail, lyophilised green pea (408.3  $\pm$  16.4 mU g<sup>-1</sup>) and grass pea sprouts (398.1  $\pm$  26.6 mU g<sup>-1</sup>) showed the greatest DAO activity, closely followed by the seedlings of lentils, soybeans and chickpeas (301.0–322.0 mU g<sup>-1</sup>). On the other hand, lyophilised alfalfa, broad bean and white lupin sprouts showed the lowest enzymatic capacities, with mean activity values from 36.0 to 142.9 mU g<sup>-1</sup>. Table 2 shows the statistical significance of differences in the DAO activity among species.

In view of these results, it has been demonstrated that the germination of the legume seeds enhances its ability to degrade histamine. Specifically, the DAO activity of the germinated seeds of alfalfa, broad bean, lentil and white lupin showed a marked increase ( $p < 0.05$ ), with enzymatic activities from 164 to 285-fold of that in non-germinated seeds. In this sense, Yang, Chen, and Gu (2011) also reported an important rise in the ability of broad beans to degrade putrescine, reporting an enzymatic activity increase of about 123-fold after the germination of this seed. The germination of dry seeds is a physiological process that starts with the imbibition of the pulses, activating enzymatic reactions and promoting variations in the chemical composition of the seed (Verni, Coda, & Rizzello, 2019). Therefore, it may be stated that among other multiple metabolic pathways, the sprouting of the legume seeds activates its DAO enzymatic activity. The higher occurrence of amine oxidase enzymes seems to be linked to developmental events and may be explained by the crucial role of the hydrogen

peroxide produced during deamination reactions, which is used by peroxidases in cell wall architecture, lignification, seed reserves mobilization and in response to pathogen attack (Torrighiani, Serafini-Fracassini, & Fara, 1989; Joseph & Srivastava, 1995; Laurenzi et al., 2001; Tavladoraki, Cona, & Angelini, 2016).

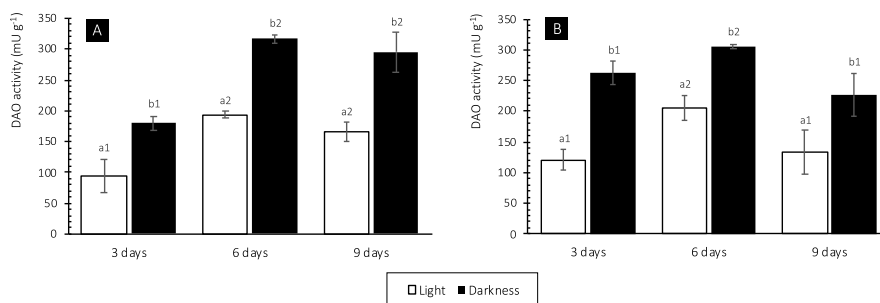
Overall, legume sprouts may be considered an interesting source of DAO that could be used as active ingredient in DAO supplements, since its enzymatic activity is comparable or higher than that reported for porcine kidney protein extract (230.8  $\pm$  11.9 mU g<sup>-1</sup>), depending on the legume specie (Comas-Basté et al., 2019b). In fact, higher catalytic turnover rate for plant-origin amine oxidases was also reported in some works when compared with animal-derived enzymes (Comas-Basté et al., 2019b; Masini et al., 2007). On the other hand, in the case of raw pulses, despite the great easiness in its obtention, they showed very low enzymatic activity for a supplementation purpose.

### 3.2. Influence of germination conditions on DAO activity

The effect of luminosity as presence or absence of light during germination and three different sprouting period lengths (3, 6 and 9 days) were studied in order to establish optimal growing and harvesting conditions to ensure maximum DAO capacity of this plant-origin matrix. Lentils and chickpeas were selected to test the influence of these two key factors related to the germination process for their great *in vitro* DAO capacity combined with the high germination rate of their seeds. In general, it may be stated that a very similar evolution profile of the DAO activity was observed for both species along the germination period (Fig. 3).

As it may be seen in Fig. 3, the highest enzymatic capacity was observed after 6 days of sprouting for both legumes ( $p < 0.05$ ). Moreover, a significant drop of the histamine-degrading activity was observed in chickpea sprouts from day 6 to day 9 of germination ( $p < 0.05$ ). Kivirand and Rinken (2007) studied the evolution of the specific activity of amine oxidase enzyme purified from *Pisum sativum* L. seedlings towards cadaverine during a 17-days germination process and reported a steadily increase of the enzymatic activity along the first eight days and a drop after this period. Likewise, Yang et al. (2011) reported a significant increase of the capacity to degrade putrescine by *Vicia faba* L. seeds along germination, reaching its maximum level at day seven.

Regarding the effect of luminosity, the highest DAO activity was reached in etiolated legume sprouts (i.e. grown in darkness) rather than in sprouts grown in the presence of light, regardless of the time of germination and the legume specie ( $p < 0.05$ ). Previously published works also confirm that etiolated seedlings possess significantly higher amine-degrading activity than those growing under the light (Federico, Angelini, Cesta, & Pini, 1985; Choudhary & Singh, 2000; Joseph &



**Fig. 3.** DAO activity of 3, 6 and 9 days-old lentil (A) and chickpea (B) sprouts grown in darkness (black) or light-exposed (white). Different letters and numbers denote statically significant differences ( $p < 0.05$ ) between luminosity and growing days, respectively.

Srivastava, 1995; Laurenzi et al., 2001; Maccarrone, Rossi, Avigliano, & Finazzi Agro, 1991; Yang et al., 2011). The absence of light may act as an adverse environmental condition, stimulating the expression of DAO activity, among other metabolic pathways (Yang et al., 2011). It has been suggested that the different behavior of DAO depending on the luminosity may be a response mediated by phytochrome, a vegetal protein that acts as a photoreceptor in charge of promoting several reactions of the plant in front of environmental stimulus (Joseph & Srivastava, 1995; Yang et al., 2011). Similarly, other authors have reported a major expression of putrescine catabolic enzymes and a rise of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production, metabolite derived from putrescine, in seeds of legumes exposed to other types of stress, such as salt concentration, hypoxia or heat (Fait, Fromm, Walter, Galili, & Fernie, 2008; Xing, Jun, Hau, & Liang, 2007).

Overall, obtained results indicate that the most suitable combination for both species was found to be 6 days of germination of the seeds in darkness. Nevertheless, other environmental stress factors could also have an impact on the specific-histamine degrading capacity of this food matrices.

### 3.3. Storage stability of the enzymatic capacity of lyophilised legume sprouts

Lyophilization or freeze-drying is a low temperature dehydration process widely used to preserve pharmaceutical proteins (Czyż, Dembczyński, Marecik, & Pniewski, 2016). However, long-stability of the dried products is not easily ensured, as it may be affected by a variety of critical destabilization factors, such as oxidative processes and water activity (Czyż et al., 2016). In this work, an assessment of 12-month storage stability of the DAO activity of lyophilised lentils and chickpea sprouts was performed at three different conditions: freezing, refrigeration and room temperature. As it may be seen in Fig. 4, both lyophilised legume sprouts showed a similar trend on the stability of its enzymatic activity for all studied storage conditions. Only the freezing storage of the lyophilised sprouts kept the enzymatic activity intact for at least 12 months. On the contrary, the storage in refrigerator or at room temperature supposed a marked decrease in the enzymatic capacity early from the first months. Concretely, one year of refrigerated storage entailed a mean loss of 55% ( $\pm 0.002\%$ ) and 62% ( $\pm 0.001\%$ ) in chickpea and lentils sprouts, respectively. The highest loss of enzymatic activity was observed in all cases at room temperature, especially in lyophilised lentils sprouts, where 83% ( $\pm 0.002\%$ ) of reduction was achieved after 12 months.

In view of these results, product stability seems to be limited to freeze storage of the lyophilised legume sprouts. As storage was carried out protected from light, humidity and oxygen, a possible explanation for the loss of enzymatic activity could be the interaction among matrix components. Keeping in mind the main goal of obtaining a ready-to-formulate source of DAO enzyme for the formulation of a potential new

enzymatic supplement, shelf life stability should be ensured at least for refrigerated storage. Doubtlessly, future efforts should be made to select optimal formulation excipients to facilitate successful long-term stability while maintaining the high enzymatic activity of this matrix. Nevertheless, taking into account the specific stability of the enzymatic activity observed in the early 2–4 months of storage under refrigeration or at room temperature, other potential applications could be hypothesized for this plant-derived product. In fact, the use of lyophilised legume sprouts as ingredient to formulate functional foods of refrigerated shelf-life could be possible, as well as its addition in certain food formulations as a strategy to minimize the accumulation of histamine and other biogenic amines throughout the agri-food chain.

## 4. Conclusions

Certain edible legumes have demonstrated to be a plant-origin source of DAO enzyme, thus confirming the potential suitability of this food for the formulation of DAO supplements for the treatment of histamine intolerance. Specifically, the germination of legume seeds for 6 days in darkness has proven to provide the vegetal matrix with maximum histamine-degrading capacity. Although the lyophilization of the legume seedlings may be considered a suitable process to obtain a ready-to-formulate plant tissue, the storage stability of its enzymatic activity remains limited to the freezing storage of the product. Accordingly, further studies are needed to select optimal formulation of the final product to guarantee the shelf-life stability of its DAO activity. Finally, it is of high importance to motivate the development of more clinical studies involving DAO enzymatic supplement to generate data on its potential clinical efficacy.

### CRedit authorship contribution statement

**Oriol Comas-Basté:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **M. Luz Latorre-Moratalla:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Judit Rabell-González:** Investigation, Writing - original draft. **M. Teresa Veciana-Nogués:** Supervision, Formal analysis, Writing - review & editing. **M. Carmen Vidal-Carou:** Supervision, Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

### Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

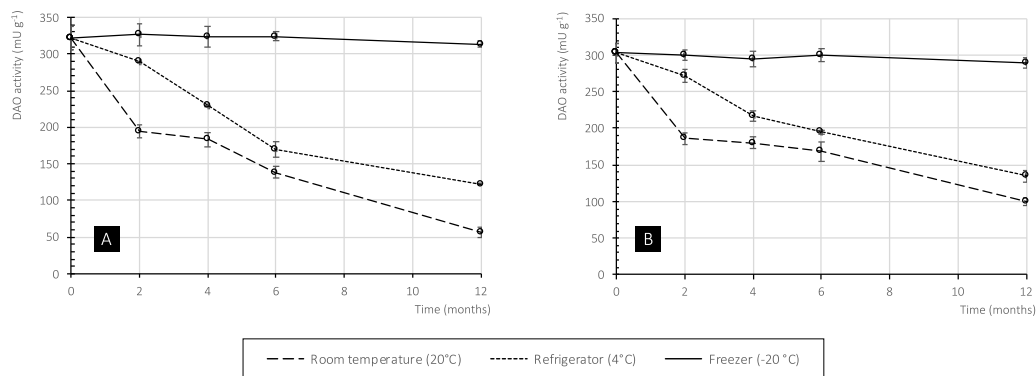


Fig. 4. Evolution of the *in vitro* DAO activity of lyophilised lentil (A) and chickpea (B) sprouts over 12 months of storage.

## Acknowledgments

This work was supported by Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya (SGR-2017-1476). Oriol Comas-Basté is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF2015).

## References

- Choudhary, A., & Singh, R. P. (2000). Cadmium-induced changes in diamine oxidase activity and polyamine levels in vigna radiata wilczek seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *156*, 704–710. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80235-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80235-7).
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Bernacchia, R., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2017). New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *145*, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.029>.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2019a). Histamine and other biogenic amines in food. From scorboid poisoning to histamine intolerance. In C. Proestos (Ed.), *Biogenic amines*. London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84333>.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2019b). *In vitro* determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*, 7595–7602. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02178-2>.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1023 of 23 July 2018. (2018). Correcting implementing regulation (EU) 2017/2470 establishing the union list of novel foods. *Official Journal of the European Union*, *L 187*, 1–133.
- Czyż, M., Dembzyński, R., Marecik, R., & Pniński, T. (2016). Stability of S-HBsAg in long-term stored lyophilised plant tissue. *Biologicals*, *44*, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2015.12.001>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, *9*, 2393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., & Fernie, A. R. (2008). Highway or byway: The metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science*, *13*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.005>.
- Federico, R., Angelini, R., Cesta, A., & Pini, C. (1985). Determination of diamine oxidase in lentil seedlings by enzymic activity and immunoreactivity. *Plant Physiology*, *79*, 62–64. <https://doi.org/10.1104/pp.79.1.62>.
- García-Martín, E., Martínez, C., Serrador, M., Alonso-Navarro, H., Ayuso, P., Navacerrada, F., et al. (2015). Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine. *Headache*, *55*, 276–286. <https://doi.org/10.1111/head.12493>.
- Guida, B., De Martino, C., De Martino, S., Tritto, G., Patella, V., Trio, R., et al. (2000). Histamine plasma levels and elimination diet in chronic idiopathic urticaria. *European Journal of Clinical Nutrition*, *54*, 155–158. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600911>.
- Hoffmann, M., Gruber, E., Deutschmann, A., Jahnel, J., & Hauer, A. (2013). Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Archives of Disease in Childhood*, *98*, 832–833. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305024>.
- Izquierdo-Casas, J., Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Lorente-Gascón, M., Duelo, A., Soler-Singla, L., et al. (2019). Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clinical Nutrition*, *38*, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.013>.
- Izquierdo-Casas, J., Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Lorente-Gascón, M., Duelo, A., Vidal-Carou, M. C., et al. (2018). Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. *Journal of Physiology & Biochemistry*, *74*, 93–99. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0571-3>.
- Joseph, P., & Srivastava, S. K. (1995). Photoregulation of diamine oxidase from pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *146*, 108–114. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81975-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81975-9).
- Kaur, S., Ali, A., Stahbalaie, Y., Ahmad, U., Nargis, F., Pandey, A. K., & Singh, B. (2019). Association of Diamine oxidase (DAO) variants with the risk for migraine from North Indian population. *Meta Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100619> (in press).
- Kivirand, K., & Rincken, T. (2007). Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Chemistry*, *56*, 164–171.
- Kivirand, K., & Rincken, T. (2011). Biosensors for biogenic amines: The present state of art mini-review. *Analytical Letters*, *44*, 2821–2833. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.565445>.
- Komericki, P., Klein, G., Reider, N., Hawranek, T., Strimitzer, T., Lang, R., et al. (2011). Histamine intolerance: Lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: A randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *123*, 15–20. <https://doi.org/10.1007/s00508-010-1506-y>.
- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., & Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, *43*, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>.
- Laurenzi, M., Tipping, A. J., Marcus, S. E., Knox, J. P., Federico, R., Angelini, R., et al. (2001). Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta*, *214*, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s004250100600>.
- Maccarrone, M., Rossi, A., Avigliano, L., & Finazzi Agro, A. (1991). Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedling under different growth conditions. *Plant Science*, *79*, 51–55. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90068-J](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90068-J).
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, *85*, 1185–1196. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>.
- Maintz, L., Yu, C. F., Rodríguez, E., Baurecht, H., Bieber, T., Illig, T., et al. (2011). Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy*, *66*, 893–902. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02548.x>.
- Manzotti, G., Breda, D., Di Gioacchino, M., & Burastero, S. E. (2016). Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International Journal of Immunopathology & Pharmacology*, *29*, 105–111. <https://doi.org/10.1177/0394632015617170>.
- Masini, E., Bani, D., Marzocca, C., Mateescu, M. A., Mannaioni, P. F., Federico, R., et al. (2007). Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Science World Journal*, *7*, 888–902. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.139>.
- San Mauro Martín, I., Brachero, S., & Garicano Vilar, E. (2016). Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergologia et Immunopathologia*, *44*, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.04.015>.
- Sánchez-Pérez, J., Comas-Basté, O., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Vidal-Carou, M. C. (2018). Biogenic amines in plant-origin foods: Are they frequently underestimated in low-histamine diets? *Foods*, *7*, 205. <https://doi.org/10.3390/foods7120205>.
- Schnedl, W. J., Lackner, S., Enko, D., Schenk, M., Holasek, S. J., & Mangge, H. (2019a). Evaluation of symptoms and symptom combinations in histamine intolerance. *Intestinal Research*, *17*, 427–433. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.00152>.
- Schnedl, W. J., Schenk, M., Lackner, S., Enko, D., Mangge, H., & Forster, F. (2019b). Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Science and Biotechnology*, *28*, 1779–1784. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00627-3>.
- Siebenhaar, F., Melde, A., Magerl, T., Zuberier, T. M., Church, K., & Maurer, M. (2016).

- Histamine intolerance in patients with chronic spontaneous urticaria. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 30, 1774–1777. <https://doi.org/10.1111/jdv.13778>.
- Son, J. H., Chung, B. Y., Kim, H. O., & Park, C. W. (2018). A histamine-free diet is helpful for treatment of adult patients with chronic spontaneous urticaria. *Annals Of Dermatology*, 30, 164–172. <https://doi.org/10.5021/ad.2018.30.2.164>.
- Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016). Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Frontiers of Plant Science*, 7, 824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00824>.
- Torrigiani, P., Serafini-Fracassini, D., & Fara, A. (1989). Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiology*, 89, 69–73. <https://doi.org/10.1104/pp.89.1.69>.
- Tuck, C. J., Biesiekierski, J. R., Schmid-Grendelmeier, P., & Pohl, D. (2019). Food intolerances. *Nutrients*, 11, 1684. <https://doi.org/10.3390/nu11071684>.
- Verni, M., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2019). The use of faba bean flour to improve the nutritional and functional features of cereal-based foods: Perspectives and future strategies. In V. R. Preedy, & R. R. Watson (Eds.), *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (pp. 465–475). (2nd ed.). Cambridge: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00037-X>.
- Wagner, A., Buczyłko, K., Zielińska-Bliźniewska, H., & Wagner, W. (2019). Impaired resolution of wheals in the skin prick test and low diamine oxidase blood level in allergic patients. *Advances in Dermatology and Allergology*, 36, 538–543. <https://doi.org/10.5114/ada.2019.89504>.
- Wagner, N., Dirk, D., Peveling-Oberhag, A., Reese, I., Rady-Pizarro, U., Mitzel, H., et al. (2017). Popular myth—low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria—fact or fiction? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 31, 650–655. <https://doi.org/10.1111/jdv.13966>.
- Xing, S. G., Jun, Y. B., Hau, Z. W., & Liang, L. Y. (2007). Higher accumulation of gamma-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.05.007>.
- Yacoub, M. R., Ramirez, G. A., Berti, A., Mercurio, G., Breda, D., Saporiti, N., et al. (2018). Diamine oxidase supplementation in chronic spontaneous urticaria: A randomized, double-blind placebo-controlled study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 176, 268–271. <https://doi.org/10.1159/000488142>.
- Yang, R., Chen, H., & Gu, Z. (2011). Factors influencing diamine oxidase activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid content of faba bean (*Vicia faba* L.) during germination. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 59, 11616–11620. <https://doi.org/10.1021/jf202645p>.



# 5 DISCUSSIÓ





## 5. DISCUSSIÓ

### Risc associat al consum d'histamina

L'anàlisi del risc és l'eina principal de la qual es disposa avui en dia per al desenvolupament de polítiques en l'àmbit de la seguretat alimentària. Aquest procés estructurat consta de tres elements interrelacionats que comprenen l'avaluació del risc, la seva gestió i la pertinent comunicació entre totes les parts involucrades [83,84]. L'objectiu d'aquest apartat va ser avaluar l'exposició dels consumidors espanyols a histamina derivada del consum de derivats carnis fermentats crus curats a través d'una estimació probabilística i determinar el risc de patir efectes adversos que es deriva d'aquesta exposició tant en persones sanes com per a la població sensible. Un plantejament probabilístic del càlcul de l'exposició genera dades més representatives de la situació real que no pas un determinista. A més, també resulta fonamental disposar de dades fidedignes tant del contingut del perill com del consum de l'aliment en qüestió per a la població específica d'estudi.

Pel que fa al contingut d'histamina, en gairebé el 70% de les 474 mostres de derivats carnis fermentats crus curats del mercat espanyol es va trobar histamina. Encara que la concentració mitja d'histamina va ser de 26.5 mg/kg, una desviació estàndard relativa del 215% mostra l'elevada variabilitat entre els diferents productes. De fet, un 50% de les mostres (percentil-50) presentava valors inferiors a 1,36 mg/kg i només un 5% (percentil-95) superava els 143 mg/kg. Aquests continguts d'histamina referents a productes del mercat espanyol van ser molt similars als que va reportar l'EFSA a nivell europeu pel mateix tipus de productes, amb un percentil-50 que oscil·lava entre 0,6 i 1,4 mg/kg, en funció de l'estat membre, i un percentil-95 de 149 mg/kg [1].

Els derivats carnis fermentats són aliments susceptibles de contenir histamina, encara que normalment a concentracions inferiors respecte a altres amines biògenes, com la tiramina, la putrescina i la cadaverina [1,162,163]. La presència d'histamina en embotits és deguda principalment a l'acció de certes soques

d'enterobacteriàcies i/o bacteris de l'àcid làctic i, generalment, com a conseqüència d'un procés de contaminació [164,165]. La variabilitat en els nivells d'histamina en derivats carnis s'explica pels múltiples factors que influeixen en el procés aminogènic, com ara la qualitat higiènica de les matèries primeres i dels processos d'elaboració [1,163]. Així mateix, el diàmetre de l'embotit, la capacitat específica de la soca bacteriana emprada en la fermentació i les condicions específiques d'aquest procés fermentatiu (i.e. temperatura i humitat) s'han identificat també com a factors que influeixen activament en la generació d'amines en aquests productes [162,166,167].

En referència al consum de derivats carnis fermentats crus curats extret de l'enquesta ENIDE elaborada per l'AECOSAN, la ingesta mitja per part de la població espanyola va ser de 45 g/àpat [168]. L'enquesta revela que el 19% dels àpats contenien algun tipus d'embotit, ja sigui com a aperitiu o com a ingredient d'un entrant o plat principal. Concretament, el xoriço fou l'embotit més freqüentment consumit (un cop per setmana, aproximadament), amb una ració mitja de 42 g/àpat. El consum de llonganissa, sobrassada i salami, encara que menys freqüent, presentava nivells d'ingesta lleugerament superiors al xoriço.

Malgrat la informació de consum data de l'any 2011, les dades comparables i més recents de les quals es disposa actualment (enquesta nacional d'alimentació en població adulta, majors i embarassades - ENALIA 2, 2015) mostren un valor mig de consum d'embotits pràcticament idèntic per a la població espanyola (43 g/dia) [169]. Per tant, es podria considerar que les dades de l'exposició a histamina que se'n deriven segueixen essent vigents a l'espera d'informació actualitzada sobre el consum d'aliments per a la població espanyola.

L'avaluació probabilística de l'exposició de la població espanyola a histamina procedent del consum de derivats carnis fermentats crus curats va mostrar que en el 95% dels àpats els nivells d'ingesta no superen els 6,8 mg d'aquesta amina (percentil-95), encara que existia la probabilitat d'assolir nivells de fins a 45.8 mg/àpat. Malgrat l'opinió científica publicada per l'EFSA l'any 2011 no conté dades específiques sobre l'exposició a histamina a nivell espanyol, aquest informe reportà un percentil-95 d'ingesta a nivell europeu que oscil·lava entre 6,4 i 37,1 mg/dia, en funció del país [1]. Així, el valor d'ingesta obtingut per a la població

espanyola (percentil-95) es situa clarament en l'extrem inferior del rang europeu determinat per l'EFSA. El menor consum d'embotits per part de la població espanyola en comparació amb altres països de la Unió Europea pot explicar aquesta menor exposició a histamina, ja que la presència d'aquesta amina en embotits va ser molt similar a nivell europeu.

L'EFSA, en el seu informe, va establir un límit segur d'histamina de 25 mg/àpat com a aproximació de NOAEL (*no observed adverse effect level*), és a dir, la dosi d'aquest compost que no produiria efectes adversos a la població. Tenint en compte aquest valor, es pot afirmar que el risc de patir efectes adversos aguts (intoxicació) vinculats a la ingesta d'histamina procedent dels embotits és negligible per a persones sanes. Per exemple, considerant un escenari d'ingesta d'histamina elevat (valor d'exposició del percentil-95), s'assoliria només un 27% d'aquest NOAEL, i solament en el cas d'una exposició màxima (45,8 mg/àpat) s'excel·liria aquest límit en un 183%. Això ajuda a explicar el motiu pel qual rarament s'associen brots d'intoxicació per histamina al consum d'embotits. De fet, el peix és encara actualment el causant de més del 90% dels brots, en part per la major ració de consum d'aquest aliment però també perquè el peix i els productes de la pesca són susceptibles d'assolir nivells d'histamina més de 20 vegades superiors que els embotits [1,61,66,72].

Contràriament, l'exposició alimentària a histamina derivada del consum d'embotits no resulta menyspreable per a la població intolerant a la histamina, un subgrup poblacional en el qual els efectes adversos poden aparèixer al consumir productes amb continguts baixos o molt baixos d'aquesta amina [1,69]. En aquest escenari, si es considera que a l'Estat espanyol hi ha 46 milions de persones que són potencialment consumidors d'embotits, que la prevalença de la intolerància a la histamina s'estima en més de l'1% de la població i que el 66% dels embotits del mercat presenten histamina; es pot inferir que almenys un 0,7% de la població espanyola pot desenvolupar símptomes de la intolerància com a conseqüència del consum d'embotits [22,33,92]. Aquest percentatge, que ascendeix a més de 300.000 individus, augmentaria si es considerés també la contribució a la ingesta d'histamina per part d'altres aliments, com són els formatges, el peix i productes derivats, les begudes fermentades i, inclús, alguns vegetals [69]. Així mateix, la presència d'altres amines biògenes (i.e. putrescina i cadaverina), ja sigui procedent

dels propis embotits o de qualsevol altre aliment que s'ingereixi, provocaria un efecte potenciador dels efectes adversos de la histamina al competir totes elles per l'enzim DAO a nivell intestinal [15,18,54,68]. L'alcohol també se sumaria a la llista de possibles substàncies potenciadores dels efectes de la histamina en l'organisme, ja que comparteix amb la histamina algunes rutes de degradació [13]. Per últim, la presa de certs fàrmacs capaços d'inhibir l'enzim DAO intestinal (e.g. àcid clavulànic, verapamil, acetilcisteïna i metoclopramida) també provocaria un augment important de la població susceptible a desenvolupar simptomatologia associada a la intolerància a la histamina a causa del consum d'embotits [59].

Per tal de reduir el risc estimat de patir efectes adversos per a la població amb intolerància a la histamina, fora desitjable que l'administració i la indústria alimentària actuïn de forma coordinada per promoure les mesures de gestió pertinents. En primer lloc, la indústria alimentària ha d'entomar el repte de seguir treballant per desenvolupar estratègies de control per prevenir o, si més no, minimitzar l'acumulació d'histamina i altres amines biògenes al llarg de la producció i comercialització dels aliments. En aquest sentit, la implementació de sistemes integrals de qualitat a la indústria alimentària, com ara l'APPCC i les bones pràctiques de fabricació i higiene, són estratègies efectives i essencials per assegurar la qualitat higiènica del procés productiu i evitar la contaminació per part de microorganismes amb capacitat aminogènica [15,16,37]. En el cas específic dels aliments fermentats, a més d'assegurar la qualitat higiènica, cal ajustar acuradament la formulació i paràmetres tecnològics del procés fermentatiu (i.e. temperatura i humitat) i seleccionar microorganismes fermentatius sense capacitat aminogènica o, inclús, amb activitat DAO [5,19,25,27]. Des d'un punt de vista legislatiu, podria promoure's l'extensió dels límits actuals que regulen els nivells d'histamina en peix i productes derivats (i.e. Regulació 2073/2005) a d'altres categories d'aliments susceptibles d'acumular nivells destacables d'aquest compost [79]. Per últim, la possible menció de la presència d'histamina en l'etiquetatge dels aliments podria ser una mesura interessant per facilitar una elecció segura dels aliments a la població intolerant a la histamina.

A la vista dels resultats d'aquesta avaluació del risc, es pot concloure que el risc de patir efectes adversos derivats de la ingesta d'histamina és molt baix en referència a la intoxicació però elevat per a la població susceptible que presenta intolerància

a la histamina. En aquest context, resulta justificat realitzar estudis que permetin millorar el coneixement d'aquest desordre, així com desenvolupar noves eines per al seu diagnòstic i tractament.

## Relació entre la intolerància a la histamina i el dèficit de DAO

La intolerància a la histamina es manifesta a través d'un ampli ventall de símptomes, d'entre els quals, la cefalea n'és un dels més freqüents i que, alhora, suposa un important detriment en la qualitat de vida de les persones afectades [125]. La migranya, en concret, és un desordre crònic d'etiologia multifactorial pel qual s'han descrit una ampla varietat de factors desencadenants d'origen fisiològic, hormonal, conductual, ambiental i alimentari [170]. De fet, fa més de 60 anys, un grup d'investigadors australians va estudiar els factors etiològics de 500 pacients migranyosos i va posar de manifest que una quarta part reportava el consum de certs aliments com a factor desencadenant de la seva cefalea [171]. D'ençà, múltiples treballs han estudiat aquesta relació dieta-cefalea, dels quals es desprèn que entre un 10 - 64% dels casos els atacs de dolor són desencadenats per factors dietètics [172-177]. Els aliments més citats com a desencadenants de les cefalees són xocolata, formatges, cítrics, begudes alcohòliques (especialment, vi i cervesa), derivats càrnics, fruits secs, cafè i certs additius; i molts d'ells són potencialment rics en amines biològicament actives, principalment histamina, putrescina i tiramina [172].

Existeix un elevat nombre de treballs que des de mitjans del segle XX assenyalen la histamina com a un dels mediadors bioquímics implicats en la fisiopatologia de la cefalea [74,76,77,178,179]. Aquest rol ha sigut demostrat mitjançant estudis dosi-resposta a través de l'administració d'histamina via oral en humans [74,76,77]. Igualment, en pacients migranyosos s'ha detectat una elevació dels nivells d'histamina en sang durant els atacs de migranya. A més, certs autors han assenyalat el dèficit de DAO com a possible causa d'una major absorció d'histamina i, per tant, de les manifestacions clíniques derivades [22,173,180]. Segons Maintz i Novak, la relació entre les cefalees i la DAO s'explicaria perquè el dèficit d'aquest enzim dona lloc a un augment de la histamina plasmàtica que

provoca l'alliberació d'àcid nítric a través de la estimulació dels receptors transmembrana H1 localitzats a les artèries intracranials [33]. En la mateixa línia, recentment s'ha proposat una relació entre diversos SNPs funcionals del gen de l'enzim DAO i el risc de patir migranya. García-Martín i col. van estudiar la presència de diversos polimorfismes genètics en pacients migranyosos espanyols de raça caucàsica i van reportar una freqüència estadísticament major de l'SNP rs10156191 (associat amb una menor activitat de l'enzim DAO) en persones migranyoses en comparació amb la població control [180]. A més, un recent treball publicat l'any 2019 per Kaur i col. va confirmar també la major freqüència d'aquest polimorfisme en dones de la Índia diagnosticades de migranya [110].

En aquest context, es va plantejar estudiar el dèficit de DAO com a factor etiològic de la migranya, un dels símptomes més freqüentment associats amb la intolerància a la histamina. La prevalença de dèficit de DAO en el grup de pacients migranyosos va ser del 87%, amb un valor mig d'activitat DAO significativament inferior a l'obtingut pel grup control. Aquests resultats assenyalen que aquest dèficit enzimàtic podria estar relacionat amb el desencadenament de la migranya. No obstant això, el percentatge restant de persones migranyoses sense dèficit de DAO (13%) va confirmar l'existència d'altres factors desencadenants d'aquesta patologia, més enllà del dèficit de DAO.

L'elevada prevalença de dèficit de DAO en població migranyosa determinada en el present treball (87%) coincideix amb la descrita l'any 2005 per Steinbrecher i Jarisch en pacients amb cefalea (85%) [125]. En aquest cas, els autors van descriure també un augment significatiu d'aquesta activitat enzimàtica després del seguiment d'una dieta baixa en histamina durant un mes, junt amb una remissió de la cefalea o una reducció de la seva freqüència en gairebé el 90% dels individus.

Si es té en compte el gènere dels voluntaris, en el present estudi el dèficit de DAO va mostrar una prevalença similar, amb un percentatge del 83% i el 90% en dones i homes migranyosos, respectivament. Fins al moment, hi ha poques dades disponibles sobre la prevalença d'aquest trastorn en funció del gènere i, a més, són poc conclusives. Com en el nostre cas, Klockler i col. no van trobar diferències en l'activitat DAO plasmàtica entre homes i dones, encara que el nombre d'individus considerats era escàs ( $n = 28$ ) [53]. Tanmateix, García-Martín i col. sí van descriure

diferències en l'activitat DAO plasmàtica en funció del gènere, essent la prevalença d'aquest dèficit enzimàtic més elevat en dones [181]. Tanmateix, en dones també s'han reportat importants fluctuacions d'aquest valor associades als diferents estadis del cicle menstrual [96,181].

En el nostre estudi, la prevalença de dèficit de DAO en la població control (no migranyosa) va ascendir a un 44%. Aquest percentatge en el grup control podria explicar-se per la possible presència d'altres símptomes associats a la intolerància a la histamina, ja que la cefalea és únicament una de les múltiples manifestacions clíniques descrites per aquest desordre. Malauradament, no es va registrar la presència d'altres símptomes pel que no es pot afirmar que els voluntaris del grup control fossin completament asimptomàtics per a la intolerància a la histamina. Per altra banda, la gran variabilitat observada en l'activitat DAO plasmàtica dels voluntaris del grup control podria indicar que els valors de normalitat establerts per aquesta activitat enzimàtica no estan prou ben ajustats. Això podria ajudar a explicar també l'elevat nombre de resultats positius pel dèficit de DAO observat en ambdós grups.

És important considerar certes limitacions a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts. En aquest sentit, diversos autors han evidenciat la idoneïtat de considerar mesures repetides de l'activitat DAO plasmàtica enlloc d'una determinació puntual, atenent les fluctuacions intraindividuals d'aquesta activitat enzimàtica [92,129]. Així mateix, seria interessant disposar de major informació sobre la història clínica dels pacients i revisar el poder discriminant del llinar de normalitat de la prova de l'activitat DAO sanguínia, ja que ambdós factors podrien ajudar a explicar, encara que parcialment, els alts percentatges de dèficit de DAO en la població.

Com en el present treball, altres estudis han avaluat l'activitat DAO plasmàtica en pacients amb símptomes associats a la intolerància a la histamina i/o amb certs trastorns gastrointestinals o dermatològics. Així, els treballs desenvolupats per Mušič i col. i Manzotti i col. en població adulta amb símptomes diversos de la intolerància a la histamina van reportar percentatges de dèficit de DAO similars a l'obtingut al present estudi (80% i 71%, respectivament) [104,120]. En ambdós casos, els autors van descriure també una activitat DAO plasmàtica



significativament menor en aquests pacients en comparació amb el grup control [104,120]. En canvi, altres estudis centrats en individus amb èczema, urticària crònica idiopàtica, dermatitis atòpica o malaltia inflamatòria intestinal han reportat una prevalença de dèficit de DAO inferior, amb valors que oscil·len entre el 19% i el 57% [101,113,121–123].

Per altra banda, els símptomes de la intolerància a la histamina no són exclusius de la població adulta, i existeixen estudis observacionals que han avaluat la prevalença de dèficit de DAO en pacients pediàtrics amb patologia gastrointestinal associada a aquesta intolerància. En aquest sentit, Rosell-Camps i col. van determinar una prevalença de dèficit de DAO del 88% en pacients menors de 15 anys amb dolor abdominal, diarrea i vòmits, mentre que, contràriament, un estudi més recent va reportar únicament un 8% de dèficit de DAO en 394 nens amb dolor abdominal crònic [45,124].

En definitiva, els resultats del present estudi i de la resta de treballs disponibles a la literatura, evidencien, encara que amb percentatges variables, una relació etiològica entre el dèficit de DAO i certs símptomes o trastorns relacionats amb la intolerància a la histamina. Nogensmenys, són necessaris més estudis per tal de valorar la significació clínica de la determinació de l'activitat DAO plasmàtica així com per desenvolupar nous mètodes diagnòstics encaminats a identificar els individus amb intolerància a la histamina per dèficit de DAO.

## Diagnòstic de la intolerància a la histamina

Actualment, el diagnòstic de la intolerància a la histamina es duu a terme, generalment, en base a les manifestacions clíniques dels pacients, considerant la presència d'almenys dos dels símptomes associats amb aquest desordre i la seva millora o remissió al seguir una dieta baixa en histamina [22,33,35,86,127]. A més, aquest diagnòstic sovint es complementa amb la determinació de l'activitat DAO plasmàtica [77,104,120,135]. No obstant això, encara que durant els darrers anys ha augmentat el nombre d'estudis que hi sumen evidència, aquesta prova analítica necessita reforçar la seva validesa clínica ja que, sovint, aquests estudis presenten resultats controvertits [126]. Per tant, sembla necessari disposar d'altres eines

diagnòstiques validades que permetin identificar un marcador objectivable de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO. En aquest context, es va plantejar el desenvolupament d'un mètode diagnòstic no invasiu basat en la determinació del perfil d'eliminació d'histamina en orina.

L'abordatge analític per a la determinació d'histamina en matrius biològiques és complex, fonamentalment per raons estructurals de l'analit (i.e. elevada polaritat i hidrofília i baix pes molecular) però també de la matriu (i.e. baixa concentració i presència de substàncies que generen interferència endògena) [182]. Actualment, existeixen kits comercials de base immunològica per a la determinació d'histamina i alguns dels seus principals metabòlits. Les tècniques d'immunoassaig tipus ELISA no permeten la detecció de més d'un compost de forma simultània i presenten limitacions en termes de sensibilitat i especificitat [182]. Les aproximacions a través de radioimmunoassaig comporten greus desavantatges en relació a la manipulació i gestió de productes radioactius [183]. La cromatografia resulta la tècnica més idònia per a la separació i quantificació simultània de forma específica i sensible d'aquests compostos en matrius biològiques. De fet, existeixen alguns mètodes HPLC per a la determinació d'histamina i alguns dels seus metabòlits en diversos teixits animals, encara que molts d'ells utilitzen tècniques de detecció poc sensibles, com l'espectrofotometria UV/Vis, o requereixen un elevat temps d'anàlisi [182,184–192].

En el marc d'aquesta tesi es va posar a punt un mètode UHPLC acoblat a detecció fluorimètrica per a la determinació rutinària d'histamina i el seu metabòlit metilat, metilhistamina, en mostres d'orina humana. En aquest cas, es va optar per una derivatització en línia i post-columna amb OPA que permet millorar la sensibilitat i selectivitat del mètode [193]. A més, el grau d'automatització d'aquest procés va suposar una millora significativa en comparació a altres mètodes prèviament descrits per a la detecció d'aquests analits, ja que evitava potencials problemes d'estabilitat dels compostos conjugats amb OPA i minimitzava dràsticament la necessitat de manipulació per part d'un usuari [183,184]. En global, el mètode analític desenvolupat i validat permet la separació i detecció d'histamina i metilhistamina en mostres d'orina en menys d'onze minuts d'elució, el que suposa una reducció important del temps d'anàlisi en comparació a altres metodologies disponibles [185,186,188]. Això es tradueix no només en un estalvi en temps de

treball sinó també en una reducció de la despesa en solvents i en l'impacte medi ambiental associat.

Per tal de valorar la futurible aplicació de la histamina i la metilhistamina com a biomarcadors de la intolerància a la histamina, es va estudiar el perfil d'eliminació d'aquests analits en mostres d'orina de 22 pacients intolerants amb presència de manifestacions clíniques i absència d'al·lèrgia alimentària o mastocitosis. Tots ells reportaven una relació entre l'aparició o exacerbació d'aquesta simptomatologia amb el consum de certs aliments potencialment rics en histamina. D'aquests, un subgrup ( $n = 7$ ) presentava, a més, un dèficit de DAO plasmàtic. Com a grup control, es van considerar 42 voluntaris sense aquest desordre ni cap quadre al·lèrgic. Encara que existeixen treballs previs que han valorat la concentració d'aquests analits en orina de persones sanes o amb determinades patologies, principalment mastocitosis sistèmica, al·lèrgies o processos cancerígens [188,194,203–205,195–202], aquest és el primer treball que ha estudiat el perfil d'eliminació d'histamina i metilhistamina en orina de persones amb intolerància a la histamina.

En aquest estudi, les persones diagnosticades amb intolerància a la histamina van manifestar una elevada simultaneïtat de símptomes ( $4,5 \pm 1,1$  símptomes/persona) i, en més del 80% dels casos es donava la presència de simptomatologia del tracte gastrointestinal i de la pell. Aquestes dades coincideixen amb el recent estudi retrospectiu publicat per Schnedl i col. on es va avaluar la simptomatologia reportada per 133 pacients diagnosticats amb intolerància a la histamina [91]. Segons aquests autors, els símptomes gastrointestinals van ser els més freqüents i també els més severos, i van registrar la combinació de més de tres símptomes en gairebé el 97% dels individus.

Els valors d'histamina i metilhistamina excretats es van normalitzar en funció de la concentració de creatinina urinària. Aquesta és l'aproximació recomanada a l'hora d'estimar els nivells d'eliminació de substàncies biològiques en mostres d'orina puntuals per la seva estabilitat en absència de patologies renals [206]. De fet, Saito i col. van reportar una ampla variabilitat en la concentració urinària d'histamina al llarg del dia i la utilitat de la normalització d'aquest valor en funció de la creatinina per tal de compensar aquestes fluctuacions [188]. En el present treball, la creatinina

en orina de tots els voluntaris es va trobar dins l'interval de normalitat, i no es van observar diferències significatives entre els valors mitjos d'ambdós grups d'estudi ( $p = 0,894$ ) [161].

La correlació entre el contingut urinari d'histamina i metilhistamina entre mostres d'orina de 24 hores i de primera hora del matí va permetre escollir com a mètode de recollida la mostra d'orina puntual. Aquesta correlació entre els continguts d'histamina i els seus metabòlits entre els diferents tipus de mostra ha sigut també observada per altres autors [188,195]. Els treballs publicats per Saito i col. i Oosting i col. van determinar també que els nivells d'aquests analits en una mostra d'orina puntual correlacionaven amb els de la recollida de 24 hores, sempre i quan s'emprés la creatinina com a tècnica de normalització [188,195]. L'elecció de mostres d'orina de primera hora aportaria, a part d'una major comoditat pel pacient, un increment de la fiabilitat de l'anàlisi degut a la major concentració dels analits (incloent la creatinina) [198]. Cal, però, contemplar la possible influència de la producció d'histamina per part de bacteris infecciosos presents al tracte urinari, especialment en dones, sobre els nivells d'aquesta amina excretats en mostres d'orina matinals [198,205,207].

En aquest estudi, l'excreció urinària d'histamina, tant en persones amb intolerància a la histamina com en els voluntaris del grup control, va mostrar nivells molt similars (valors mitjos de 32 i 35  $\mu\text{g/g}$  de creatinina, respectivament,  $p = 0,695$ ). Igualment, dins el grup d'intolerants a la histamina, tampoc es van trobar diferències significatives en els nivells d'histamina en orina entre individus amb i sense dèficit de DAO plasmàtic ( $p = 0,500$ ). Per altra banda, els valors d'histamina observats en els diferents individus d'ambdós grups es van trobar dins els intervals descrits prèviament per Oosting i col. (8.8 - 55.9  $\mu\text{g/g}$  de creatinina) i Keyzer i col. (9.8 - 73.6  $\mu\text{g/g}$  de creatinina) en persones sanes [198,205]. Similarment, Lamale i col., van determinar nivells normals d'excreció d'histamina per a dones adultes sanes en l'interval comprès entre 22,4 i 58,2  $\mu\text{g/g}$  de creatinina, a diferència de les pacients amb cistitis intersticial, que presentaven una elevació important de l'excreció urinària d'aquest compost [208].

En referència a la metilhistamina, sí que es van trobar diferències significatives en la concentració urinària d'aquest compost, amb nivells marcadament inferiors en

les persones amb la intolerància a la histamina ( $79,3 \pm 48,6$  µg/g de creatinina) en comparació amb la població control ( $145,1 \pm 64,8$  µg/g de creatinina) ( $p = 0,0001$ ). Al comparar els individus amb intolerància a la histamina amb i sense dèficit de DAO plasmàtic, es van observar valors molts similars pel que fa a l'excreció de metilhistamina urinària ( $p = 0,438$ ). A més, no es va poder establir una relació entre la freqüència o tipologia de la simptomatologia d'aquests individus amb els nivells d'excreció de metilhistamina en orina. Altrament, amb independència de les diferències observades entre grups, els valors d'excreció urinària de metilhistamina de la majoria dels individus, tant intolerants com controls, coincideixen amb els reportats per diversos autors en estudis amb persones sanes ( $55 - 230$  µg/g de creatinina) [195,198,204,205,209–212]. Aquesta gran variabilitat descrita pel que fa a l'excreció de metilhistamina podria explicar-se, en part, per les diferències interindividuais en el sistema de degradació de la histamina en l'organisme [209].

En definitiva, la reducció observada en els nivells de metilhistamina del grup intolerant fa que la determinació del perfil d'histamina i metilhistamina en orina possibiliti la identificació de pacients amb símptomes de la intolerància a la histamina, independentment del seu nivell DAO plasmàtic. D'acord amb els resultats obtinguts, la mesura de l'activitat DAO en sang únicament va aconseguir la identificació del 32% dels pacients diagnosticats amb intolerància a la histamina en base a la presència de simptomatologia.

La metilhistamina és el metabòlit derivat de la histamina per acció de l'enzim HNMT i, per tant, la seva reducció en una situació d'intolerància a la histamina per dèficit de DAO no era d'esperar. Aquest dèficit faria pensar, inicialment, que, per compensació, hi hagués una possible activació de la ruta del metabolisme de la histamina catalitzada per l'enzim HNMT donant lloc a una major presència dels metabòlits derivats d'aquesta ruta metabòlica [207,213]. El fet que no hi hagi una elevació dels nivells de metilhistamina en les persones intolerants a la histamina suggereix que l'activació de la via catalitzada per l'HNMT es tradueixi, possiblement, en una major presència d'un metabòlit final d'aquesta ruta (i.e. àcid N-metilimidazol acètic). Així, la mesura dels nivells d'àcid imidazole acètic i d'àcid N-metilimidazol acètic en orina completaria el perfil d'excreció de la histamina i proporcionaria una imatge més acurada de les possibles alteracions produïdes en el marc d'una intolerància a la histamina. Amb aquest supòsit, s'està treballant

actualment en una aproximació a través d'UHPLC-MS/MS que permeti la determinació fiable, sensible i simultània de la histamina i tots els seus metabòlits en orina. Aquesta eina podria ajudar a confirmar els resultats observats i, possiblement, també aportí més informació per tal de definir correctament el metaboloma de la histamina en persones intolerants.

## Tractament de la intolerància a la histamina

Actualment, les estratègies per al tractament de la intolerància a la histamina per dèficit de DAO són bàsicament l'exclusió de la histamina de la dieta i la possibilitat d'aportar enzim DAO en forma de complements alimentosos [22,33,86]. En aquest context, un dels objectius principals d'aquest tesi s'ha centrat en l'estudi del complement d'enzim DAO exogen com a tractament preventiu de la intolerància a la histamina. Concretament, s'ha contribuït en la millora de l'eficàcia d'un complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí i s'han identificat noves fonts d'aquest enzim, com és el cas dels llegums. Prèviament, fou necessari desenvolupar una tècnica analítica suficientment sensible i específica per tal d'avaluar l'activitat DAO d'aquest tipus de mostres.

## Mètode per a la determinació de l'activitat DAO

Els mètodes descrits a la literatura per a la determinació de l'activitat DAO consisteixen, fonamentalment, en la mesura de la taxa de degradació o formació d'un dels compostos involucrats en la reacció de desaminació oxidativa catalitzada per l'enzim DAO. Encara que algunes tècniques poden ser avantatjoses pel que fa a la seva rapidesa o capacitat d'automatització, generalment presenten una sensibilitat limitada per a la seva aplicació en mostres no purificades, com és el cas de l'extracte proteic de ronyó porcí. Els immunoassaigs de tipus radiològic destaquen per la seva elevada sensibilitat, però la necessitat de manipular material radioactiu i l'elevat cost i risc que comporta la gestió dels residus suposen un hàndicap important a l'hora d'estendre l'ús rutinari d'aquestes tècniques analítiques [214]. A més, l'ús de mètodes espectrofotomètrics basats en la mesura

de la formació de peròxid d'hidrogen o el consum d'oxigen en aquets tipus de matrius també pot comportar limitacions, ja que poden infravalorar la capacitat DAO al existir altres activitats enzimàtiques concomitants, com és el cas de la catalasa [215,216]. Així mateix, els substrats amino principalment emprats en la major part d'aquests mètodes són putrescina i cadaverina, dos compostos estructuralment similars a la histamina però amb diferent especificitat i paràmetres cinètics que aquesta envers l'enzim DAO [140,217,218].

En aquest context, es va posar a punt un nou mètode que vencés les limitacions mencionades i permetés la determinació de la capacitat per degradar histamina de mostres complexes i poc purificades, com per exemple l'extracte de ronyó porcí i els complements d'enzim DAO que el contenen. El mètode desenvolupat es basa específicament en la quantificació directa de la degradació d'histamina per l'enzim DAO i presenta la sensibilitat i reproductibilitat associada a les tècniques UHPLC. A més, el seu fonament fa que la presència de catalasa a la mostra no interfereixi en la determinació de l'activitat DAO, fet que va ser comprovat experimentalment. Aquest mètode suposa un avantatge respecte aquelles tècniques que determinen l'activitat DAO a partir de la mesura de peròxid d'hidrogen o oxigen, ja que aquestes es veuen marcadament influenciades per la presència de catalasa [38,214,226,215,219–225]. La pròpia activitat catalasa provoca un consum de peròxid d'hidrogen i una producció d'oxigen que portarien a una infravaloració de l'activitat DAO si ambdues reaccions tenen lloc concomitantment [215,216]. La freqüent presència de catalasa en teixits tant d'origen animal com vegetal fa que aquestes tècniques resultin inadequades per a determinar-ne l'activitat DAO a causa de l'efecte interferent [214–216]. En aquest sentit, Ahmadifar i col. han proposat recentment una aproximació zimogràfica consistent en la separació electroforètica de l'enzim i el seu posterior anàlisi densitomètric que, malgrat la seva complexitat metodològica, també aconseguia l'avaluació de l'activitat DAO sense interferència de la catalasa [216].

La metodologia proposada, així com la resta de mètodes que es basen en la mesura de la desaparició del substrat amino, utilitzen tècniques d'anàlisi que involucren l'absorció ultraviolat-visible o la detecció fluorimètrica i requereixen, indispensablement, d'un procés de derivatització del compost per a la seva detecció. De fet, els mètodes basats en la derivatització química d'un compost

prèvia a la seva separació cromatogràfica comporten una sèrie d'etapes que suposen una despesa temporal i la possible introducció d'imprecisions derivades de la manipulació manual del compost, així com la possible formació de subproductes que provoquen interferència per co-elució amb el substrat amino [193]. Amb la finalitat d'evitar aquest problema, es va substituir la detecció fluorimètrica per una detecció per espectrometria de masses que permetia evitar la derivatització. Aquesta nova aproximació analítica mostra avantatges de sensibilitat i especificitat, entre d'altres, i simplifica, a més, el procés de detecció. Aquesta metodologia diferent respecte a la patent vigent internacionalment pel que fa a tècniques per a la determinació de la activitat DAO en mostres de naturalesa diversa [227] i va motivar la sol·licitud d'una nova patent analítica que va ser registrada a l'OEPM. Cal destacar que la determinació de l'activitat DAO mitjançant les dos aproximacions de detecció proposades (fluorimètrica i per espectrometria de masses) va proporcionar resultats idèntics pels diferents tipus de mostra analitzats.

Amb l'objectiu d'avaluar l'aplicabilitat del mètode, es va analitzar l'activitat DAO en mostres d'extracte de ronyó porcí (valor mitjà de  $0.23 \pm 0.01$  mU/mg) i de brots de pèsol liofilitzats ( $0.40 \pm 0.01$  mU/mg). La major taxa catalítica observada per l'enzim d'origen vegetal en comparació amb el d'origen animal ja havia sigut descrita per altres autors, encara que els valors reportats per ambdós tipus de mostres són molt variables (amb valors que oscil·len des dels 0.1 als 500 mU/mg) [218,228,229]. Aquesta heterogeneïtat podria explicar-se, principalment, pel diferent grau de purificació de les mostres utilitzades en els diversos estudis [157,222,230,231]. De fet, molts dels treballs previs buscaven la purificació selectiva de l'enzim DAO per emprar-lo en sensors per a la identificació de substrats amino [232]. Addicionalment, les diferències metodològiques entre estudis, que consideren múltiples tècniques de detecció i/o substrats, també poden ajudar a explicar aquesta variabilitat [157,222,230,231]. En aquest sentit, Kivirand i col. ja van destacar la dificultat de disposar de resultats comparables com a conseqüència de l'evident dispersió de tècniques emprades i dels diferents substrats considerats [233]. Les diferents propietats cinètiques dels substrats utilitzats (i.e. putrescina, cadaverina, histamina, espermidina, espermina) explicarien l'obtenció de diferents activitats



DAO per una mateixa mostra en funció de les propietats cinètiques específiques del compost [217,218].

El nou mètode va permetre també determinar la capacitat per degradar histamina *in vitro* de complements d'enzim DAO comercialitzats a diferents països, que va oscil·lar entre els 0.04 i els 0.20 mU/mg. Aquesta variabilitat en les activitats DAO no s'explicaria per la diferent dosificació de l'ingredient actiu, que en tots els complements és de 4.2 mg d'extracte de ronyó porcí. Per tant, els diferents processos tecnològics emprats per a la seva extracció o encapsulació, així com l'estabilitat al llarg de la vida comercial, podrien explicar les diferències en les activitats DAO obtingudes. Un article publicat a inicis de l'any 2020 per Kettner i col. va reportar l'absència d'activitat enzimàtica en un complement de DAO comercialitzat a Alemanya [234]. Una possible explicació d'aquesta manca d'activitat, seria una baixa dosificació de l'ingredient actiu i/o per pèrdues ocorregudes durant el procés d'encapsulació [234]. A més, el fet que es tracti d'una mostra complexa amb presència de catalasa i que el mètode analític emprat es fonamenti en la mesura de l'alliberació de peròxid d'hidrogen, podria comportar una possible infravaloració d'aquesta capacitat enzimàtica. Malgrat els autors destaquen l'interès clínic potencial d'aquest producte per al tractament de la intolerància a la histamina, conclouen en la necessitat de disposar d'un enzim DAO que presenti no només una major activitat enzimàtica sinó també una millor estabilitat [234].

## Complement d'enzim DAO a base d'extracte de ronyó porcí

L'any 2017, l'extracte proteic de ronyó porcí va ser autoritzat per la Comissió Europea com a nou aliment en forma de complement alimentós o d'aliment per a usos mèdics especials [155,156]. Aquest extracte consisteix en un concentrat proteic ric amb enzim DAO que es recobreix de manera entèrica per garantir la seva integritat en arribar a l'intestí, lloc on s'ha de fer efectiu l'alliberament per potenciar la degradació de la histamina procedent dels aliments [156,157].

La col·laboració amb investigadors de l'Hospital General de Catalunya i de la Universitat Internacional de Catalunya va permetre la participació en un estudi clínic

aleatoritzat i doble cec sobre l'eficàcia de la suplementació amb enzim DAO de ronyó porcí en una població migranyosa amb dèficit de DAO plasmàtic. Els resultats de l'estudi van mostrar que l'administració d'aquest complement durant un mes suposava una disminució significativa en la durada dels atacs de migranya. No obstant això, no es va poder establir una relació significativa pel que fa a l'efecte d'aquest tractament sobre la freqüència dels atacs de migranya ni en la intensitat de dolor percebuda pels pacients. Malgrat que l'evidència científica sobre l'eficàcia d'aquest tractament és encara limitada, tots els estudis desenvolupats fins al moment mostren resultats positius que assenyalen una millora de diversos símptomes de la intolerància a la histamina després de la suplementació amb enzim DAO [100,120,137,158,159]. La principal limitació d'aquests estudis és haver estat realitzats amb una població i/o un temps d'intervenció (2 - 4 setmanes) reduïts. Cal destacar, però, que la població considerada en el nostre estudi és la més elevada (100 pacients) en comparació amb la resta de treballs disponibles, que no superen els 40 participants.

Malgrat la reducció obtinguda en la durada dels atacs de migranya, els resultats van motivar la necessitat d'augmentar l'activitat DAO d'aquest complement enzimàtic per tal de millorar-ne l'eficàcia clínica. Per aquest motiu, i en el context d'un projecte de transferència Universitat-Empresa, es va contribuir a l'obtenció d'un nou complement amb una major activitat DAO. En concret, es va estudiar la influència en l'activitat DAO de diferents factors del procés d'obtenció de l'extracte de ronyó porcí i la seva estabilitat al llarg del temps.

En primer lloc, l'anàlisi de 20 lots d'extracte procedents de diferents partides de ronyó porcí va demostrar que la matèria primera no influïa en l'activitat DAO de l'extracte proteic obtingut. Aquest fet resulta rellevant des d'un punt de vista productiu ja que assegura la obtenció d'un producte d'especificacions constants entre diversos lots de producció. Segons el nostre coneixement, és la primera vegada que s'avalua la influència de la matèria primera, en aquest cas els ronyons de porc, en l'activitat DAO del producte obtingut.

En relació a la influència sobre l'activitat DAO de certs factors del procés d'extracció, destaca fonamentalment l'efecte de la temperatura aplicada durant l'assecatge per a l'eliminació del dissolvent orgànic d'extracció emprat en la

purificació de l'enzim. El control d'aquesta temperatura va resultar un factor clau per garantir la màxima activitat enzimàtica de l'extracte. Augments de temperatura de 10 °C suposaven la pèrdua progressiva d'un 10% - 20% en l'activitat enzimàtica. Concretament, l'exposició de l'extracte a 70 °C durant 3 hores produïa una pèrdua de gairebé el 30% de l'activitat DAO respecte al valor inicial. Aquest percentatge superava el 60% si la temperatura assolía els 90 °C. Aquests resultats coincideixen amb els de l'estudi publicat per Mondovi i col. que assenyalava l'estabilitat de l'enzim DAO de ronyó de porc a temperatures inferiors als 60 °C, punt a partir del qual l'activitat enzimàtica patia una forta davallada a causa de la desnaturalització tèrmica de l'enzim [235]. De fet, segons informació extreta de la *Braunschweig Enzyme Database* (BRENDA), l'enzim DAO purificat de les fulles de la favera (*Vicia faba* L.), manté la seva activitat enzimàtica intacta quan es sotmet durant 10 minuts a temperatures d'entre 0 i 60 °C però perd el 100% de l'activitat al superar els 70 °C [236,237].

El tractament per garantir la seguretat biològica de l'extracte va ser un altre dels factors tecnològics que es van estudiar pel que fa a la seva potencial influència en l'activitat DAO. D'entre les estratègies biocides assajades, l'addició d'una solució aquosa d'hipoclorit i la irradiació a una dosi de 8 kGy van mostrar-se respectuoses amb l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí. Contràriament, l'addició d'una solució alcohòlica de timol i la irradiació a dosis superiors (15 i 25 kGy) van provocar pèrdues significatives en l'activitat enzimàtica DAO. Cal tenir en compte que el Parlament Europeu permet des de l'any 1999 la possibilitat d'aplicar radiacions ionitzants com a estratègia per reduir la contaminació biològica de diferents aliments de consum humà, principalment d'origen vegetal, encara que a Espanya aquest tractament higienitzant encara es troba restringit únicament a herbes aromàtiques seques, espècies i condiments vegetals [238–240]. Pel que fa a la dosi, la normativa europea considera acceptable aquella irradiació que genera una absorció d'energia per part de l'aliment inferior a 10 KGy, dosi que s'ha demostrat capaç d'inhibir la germinació de llavors i protegir l'aliment enfront insectes, paràsits i bacteris patògens no esporuladors [241].

La seguretat de la irradiació dels aliments i la seva efectivitat en el manteniment de la qualitat nutricional i organolèptica estan pràcticament demostrades actualment, però sembla ser que cada activitat enzimàtica hi respon de forma diferenciada i en

funció de la dosi de les radiacions aplicades [242,243]. En aquest sentit, Hou i col. han demostrat l'efecte protector de la irradiació a dosis baixes (0,2 – 1 KGy) sobre l'activitat enzimàtica de la catalasa i la superòxid dismutasa de *Volvariella volvacea*, un dels bolets comestibles més preuats de la cultura asiàtica [243]. Per altra banda, Wang i col. han reportat recentment una important inhibició de diversos enzims involucrats en el procés de lignificació i enfosquiment enzimàtic en brots de bambú irradiats amb dosis d'entre 1 i 5 KGy [242]. En relació al tractament amb hipoclorit de sodi, un potent desinfectant àmpliament utilitzat i capaç de combatre fins i tot agents vírics, un estudi realitzat per Pequeño-Granado i col. va demostrar que la seva aplicació a concentracions superiors al 3% sobre fulles i pecíols de l'espècie botànica *Jatropha curcas* resultava també respectuosa sobre l'activitat enzimàtica de la polifenol oxidasa [244].

Més enllà d'estudiar l'impacte en l'activitat DAO de les diferents etapes del procés d'extracció, també es va avaluar la idoneïtat d'incorporar modificacions en el procés de deshidratació per tal d'incrementar aquesta capacitat enzimàtica. La combinació del procés d'extracció amb un dissolvent orgànic amb la deshidratació en condicions controlades (no s'especifiquen les condicions del procés perquè són subjectes de protecció industrial) va permetre obtenir un producte amb una activitat enzimàtica de gairebé el doble ( $0.41 \pm 0.02$  mU/mg) respecte al procés emprat anteriorment ( $0.24 \pm 0.02$  mU/mg).

Finalment, l'optimització i la millora del procés d'obtenció de l'extracte es va traduir en la formulació d'un nou complement DAO amb una major activitat enzimàtica ( $0.17 \pm 0.02$  mU/mg) en comparació amb la de la resta de productes comercials disponibles al mercat, que oscil·lava entre 0.05 i 0.11 mU/mg.

L'estudi de l'evolució de l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí al llarg del temps va rebel·lar l'estabilitat d'aquesta activitat durant almenys 24 mesos d'emmagatzematge en refrigeració. Contràriament, la conservació d'aquest producte a temperatura ambient es va traduir en una pèrdua progressiva de l'activitat DAO al llarg del temps (aproximadament un 50% de pèrdua al cap de 24 mesos). Bouvrette i col. van reportar resultats similars en relació a l'estabilitat de l'enzim DAO purificat de ronyó porcí [222]. En aquest cas, els autors van determinar pèrdues tant en refrigeració com a temperatura ambient (20% i 50%,

respectivament). No obstant això, van descriure un augment important en l'estabilitat de l'activitat enzimàtica si s'addicionava glicerol i/o sacarosa [222].

Pel que fa a l'estabilitat de l'activitat enzimàtica del complement, encara no es disposa de dades que en descriguin l'evolució al llarg del temps. Malgrat la informació disponible és realment escassa, un estudi publicat recentment per Leonida i col. va demostrar, a nivell experimental, el manteniment de l'activitat DAO d'un enzim d'origen porcí encapsulat en nanopartícules d'un polisacàrid derivat de la quitina (chitosan) conservat en congelació domèstica durant cinc mesos [220]. Per suposat, la conservació en congelació no és la situació ideal per a la distribució i comercialització de qualsevol complement alimentós, pel que són necessaris més estudis que n'avaluïn l'estabilitat en altres condicions de conservació.

## Els llegums com a potencial font d'enzim DAO

L'extracte de ronyó porcí és l'única font de DAO autoritzada com a nou aliment fins al moment. Un altre objectiu d'aquesta tesi va ser cercar altres matrius alimentàries que es poguessin utilitzar com a font d'enzim DAO. Els pèsols, i concretament els seus brots, s'havien descrit en alguns treballs previs com a font d'aquest enzim [245]. Per tant, es va plantejar l'avaluació de la capacitat de degradar histamina d'aquest i d'altres llegums que podrien ser de potencial utilitat per a la formulació de complements d'enzim DAO d'origen vegetal. Disposar d'un complement DAO formulat únicament a base de producte vegetal podria no només suposar avantatges des del punt de vista de la sostenibilitat en la producció, sinó també ampliar el *target* d'aquest producte a persones vegetarianes/veganes, així com amb restriccions religioses pel que fa al consum de derivats del porc.

De les deu llegums estudiades, només cinc van presentar activitat DAO, i amb valors realment baixos (0.14 – 1.95 mU/g). De fet, els pocs treballs publicats que estudiaven aquest tipus de matriu, no havien sigut capaços de determinar la capacitat per degradar amines per part d'alguns llegums, possiblement arrel de limitacions pel que fa a la sensibilitat de la tècnica emprada i/o per interferències de la matriu [246,247].

La germinació d'aquests llegums va provocar un augment important en la seva activitat DAO, destacant els valors obtinguts pels brots liofilitzats de pèsol (*Pisum sativum* L.,  $0.41 \pm 0.02$  mU/mg), guixa (*Lathyrus sativus* L.,  $0.40 \pm 0.03$  mU/mg), llentia (*Lens culinaris* Medik.,  $0.32 \pm 0.02$  mU/mg), soja (*Glycine max* (L.) Merr.,  $0.31 \pm 0.01$  mU/mg) i cigrons (*Cicer arietinum* L.,  $0.30 \pm 0.01$  mU/mg). De fet, la majoria dels germinats de les espècies de lleguminoses analitzades van presentar activitat DAO, essent els brots de mongeta (*Phaseolus vulgaris* L.) i mongeta mung (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) els únics que no van ser capaços de degradar histamina *in vitro*. L'activitat DAO observada va ser del mateix ordre que la de l'extracte de ronyó porcí estudiat també en el marc d'aquesta tesi ( $0.41 \pm 0.02$  mU/mg).

La germinació és un procés fisiològic que s'inicia amb l'amarament de les llavors seques, fet que posa en marxa diverses reaccions enzimàtiques i hi promou variacions en la composició fitoquímica [248]. Així doncs, entre d'altres, el procés de germinació dels llegums potencia significativament la seva activitat DAO, que en el cas de les faves (*Vicia faba* L.), per exemple, va assolir nivells de fins a 250 vegades superiors en comparació amb l'activitat enzimàtica de la llavor no germinada. Yang i col. també van reportar un important augment en la capacitat de les faves per degradar putrescina un cop germinada la llavor, amb nivells d'activitat enzimàtica 123 vegades superiors [249]. La major presència d'enzim DAO en els brots es trobaria associada a la importància del peròxid d'hidrogen en el desenvolupament de la llavor [246,247,250,251]. Aquest compost és generat per la reacció de desaminació de la histamina i és alhora substrat de les peroxidases que intervenen en processos com ara l'estructuració de la paret cel·lular, lignificació i mobilització de reserves de la llavor [246,247,250,251].

Un cop demostrat que la germinació es un procés que potencia l'activitat DAO dels llegums, es va voler conèixer quina influència tenen certes condicions de germinació en aquesta activitat enzimàtica. És conegut que cada enzim assoleix el seu màxim en un moment determinat del procés germinatiu en funció de l'espècie vegetal i de les condicions en les que es troba [252].

La germinació durant sis dies va proporcionar la màxima activitat DAO, tant per a les llenties com pels cigrons. A més, en el cas dels cigrons, es va observar un

descens significatiu en l'activitat DAO dels brots entre el dia sis i nou de la germinació. Dels escassos treballs que existeixen sobre com la germinació influeix en la activitat d'aquest enzim, alguns coincideixen en reportar la tendència observada en el nostre estudi. Així, Kivirand i col. van estudiar l'evolució de la capacitat per degradar cadaverina d'un enzim purificat a partir de brots de pèsol durant un període de germinació de 17 dies [225]. Els autors van reportar un increment progressiu d'aquesta activitat enzimàtica al llarg de la germinació, assolint el seu valor màxim al vuitè dia i amb un descens marcat a partir d'aquest moment. Similarment, Yang i col., van determinar que un període de set dies era el més efectiu pel que fa a la capacitat dels brots de fava per degradar putrescina [249].

Un altre dels factors clau en el procés de germinació és la lluminositat. En aquest sentit, diversos treballs han reportat una major activitat DAO en brots germinats en l'obscuritat en comparació amb els que havien estat exposats a la llum [247,249,250,253–255]. Aquest comportament també es va confirmar en el present treball, on es va obtenir sempre una major activitat DAO en els brots germinats en la foscor, independentment del dies transcorreguts i de l'espècie estudiada. L'absència de llum actua, segurament, com agent estressant que estimula l'expressió de l'activitat DAO durant la germinació de la llavor [249]. De fet, s'ha suggerit que aquest comportament diferencial en funció de la lluminositat pot ésser mediat pel fitocrom, una proteïna vegetal que actua com a pigment fotoreceptor i s'encarrega de regular certes reaccions en el si de la planta en resposta a estímuls ambientals [247,249]. De la mateixa manera, alguns autors han reportat també un increment en l'expressió de l'enzim encarregat de catalitzar la degradació de putrescina, així com un augment en la producció d'àcid  $\gamma$ -aminobutíric (GABA), que és el metabòlit derivat de la putrescina, en llegums exposats a altres tipus d'estrès ambiental, com ara la concentració de sals, hipòxia o calor [256,257].

Per últim, es va estudiar l'estabilitat de l'activitat DAO dels brots de llegum liofilitzats. La conservació en congelació va mantenir intacta la capacitat enzimàtica durant almenys 12 mesos d'emmagatzematge. Per contra, la refrigeració i la conservació a temperatura ambient suposaven una reducció gradual de la seva activitat DAO, amb pèrdues de pràcticament el 50% al cap de sis mesos. Malgrat

l'escassa informació disponible, un recent treball publicat per Verma i col. ha reportat també una important pèrdua progressiva de l'activitat degradant de putrescina de l'enzim DAO purificat de llavors de pèsol al conservar-lo en refrigeració durant un mes [258]. A la vista d'aquests resultats, són necessaris futurs estudis que permetin identificar estratègies per millorar l'estabilitat de l'activitat enzimàtica d'aquesta matriu d'origen vegetal, ja sigui a través de l'addició d'excipients a l'hora de formular-ne el complement i/o de l'aplicació d'un procés d'extracció/purificació selectiu de la matèria primera que, al mateix temps, podria permetre augmentar la seva activitat DAO.

En definitiva, la recerca desenvolupada ha permès estudiar diferents fonts d'enzim DAO, tant d'origen animal com vegetal, amb activitats enzimàtiques comparables que resulten d'interès per a la suplementació en pacients amb intolerància a la histamina. Els resultats obtinguts validen la futurible utilitat dels brots de llegum com a ingredient actiu d'aquests complements amb interessants atributs des del punt de vista de la productivitat i la sostenibilitat. No obstant això, la relativament baixa estabilitat de l'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí i dels brots de llegum a temperatura ambient obre un nou camp de treball enfocat en la recerca d'estratègies que millorin l'estabilitat d'ambdós productes i n'allarguin també la vida útil. Així mateix, s'ha ampliat el coneixement sobre l'impacte que tenen diversos factors tecnològics del procés d'obtenció d'ambdós fonts en la seva activitat DAO, informació que és d'interès per tal de potenciar-ne al màxim l'activitat enzimàtica.

A més, tenint en compte l'actual interès creixent envers la intolerància a la histamina, el mètode analític desenvolupat pot esdevenir una eina útil per a la determinació d'aquesta activitat enzimàtica en d'altres matrius complexes, com poden ser altres aliments o mostres biològiques. En aquest sentit, la possible adaptació d'aquesta metodologia per a la determinació de l'activitat enzimàtica DAO en plasma o intestí, per exemple, podria presentar un interès des del punt de vista diagnòstic que podrà explorar-se en un futur.





# 6 REVISIÓ GLOBAL



## 6. REVISIÓ GLOBAL

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, així com la revisió bibliogràfica realitzada, han permès elaborar un article de revisió que forma part de l'*Special Issue "New Developments in Histamine Research"* de la revista científica d'accés obert *Biomolecules*. Aquesta participació és fruit d'una invitació per part de l'equip editorial de la revista.

### PUBLICACIÓ 8

#### **Histamine intolerance: The current state of the art**


**Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou**  
*Biomolecules*, 2020, 10, 1181.

Índex d'impacte (JCR 2019): 4,082  
Posició en l'àrea "Biochemistry & Molecular Biology": Q2 (98/297)



Review

# Histamine Intolerance: The Current State of the Art

Oriol Comas-Basté <sup>1,2,3</sup> , Sònia Sánchez-Pérez <sup>1,2,3</sup>, Maria Teresa Veciana-Nogués <sup>1,2,3</sup>,  
Marilyn Latorre-Moratalla <sup>1,2,3</sup> and María del Carmen Vidal-Carou <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; oriolcomas@ub.edu (O.C.-B.); soniasanchezperez@ub.edu (S.S.-P.); veciana@ub.edu (M.T.V.-N.); mariluzlatorre@ub.edu (M.L.-M.)

<sup>2</sup> Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>3</sup> Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA), C/Baldiri Reixac 4, 08028 Barcelona, Spain

\* Correspondence: mcvidal@ub.edu; Tel.: +34-934-031-984

Received: 28 July 2020; Accepted: 11 August 2020; Published: 14 August 2020



**Abstract:** Histamine intolerance, also referred to as enteral histaminosis or sensitivity to dietary histamine, is a disorder associated with an impaired ability to metabolize ingested histamine that was described at the beginning of the 21st century. Although interest in histamine intolerance has considerably grown in recent years, more scientific evidence is still required to help define, diagnose and clinically manage this condition. This article will provide an updated review on histamine intolerance, mainly focusing on its etiology and the existing diagnostic and treatment strategies. In this work, a glance on histamine intoxication will also be provided, as well as the analysis of some uncertainties historically associated to histamine intoxication outbreaks that may be better explained by the existence of interindividual susceptibility to ingested histamine.

**Keywords:** histamine; food intolerance; histamine intolerance; histaminosis; histamine intoxication; diamine oxidase (DAO); low-histamine diet; food supplement

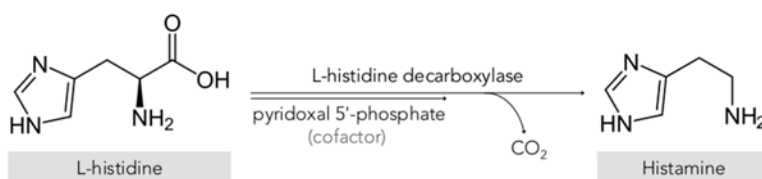
## 1. Introduction

In 2011, the European Food Safety Authority (EFSA) issued a scientific report warning that the levels of biogenic amines found in foods marketed in European Union countries may still entail a consumer health risk [1]. Among them, histamine has the highest toxic potential, along with tyramine, and is therefore of great interest in terms of food safety. First described more than 60 years ago, the deleterious effects of excessive histamine ingestion were initially referred to as scombroid fish poisoning or scombrototoxicosis, as they were associated with the consumption of fish in this family, but the condition is now known as histamine intoxication or histamine poisoning. In recent years, another disorder associated with histamine intake, arising from an enzymatic deficiency, has been described. The inability of certain individuals to metabolize histamine in the intestine, resulting in sensitivity to normal or even low histamine levels in food, may help to explain some of the uncertainties historically associated with histamine intoxication.

During the last decade, histamine intolerance has gained social and scientific recognition, with a significant increase in the interest of researchers to investigate this disorder. This review aims to analyze the pathophysiological relevance of dietary histamine, giving special focus to the adverse effects derived from histamine intake and, in particular, to the state of the art concerning the etiology, diagnosis and treatment of histamine intolerance.

## 2. Histamine

Histamine (2-[4-imidazolyl]ethylamine) is a bioactive amine that is synthesized by decarboxylation of its precursor amino acid, histidine, in an enzymatic reaction first described by Windaus and Vogt in 1907 involving L-histidine decarboxylase (EC 4.1.1.22) (Figure 1) [2]. Due to its chemical structure and number of functional groups, histamine can be defined as a heterocyclic diamine with an imidazole ring and ethylamine (i.e., an organic compound that provides a functional group in the form of a primary amine) [1,3].



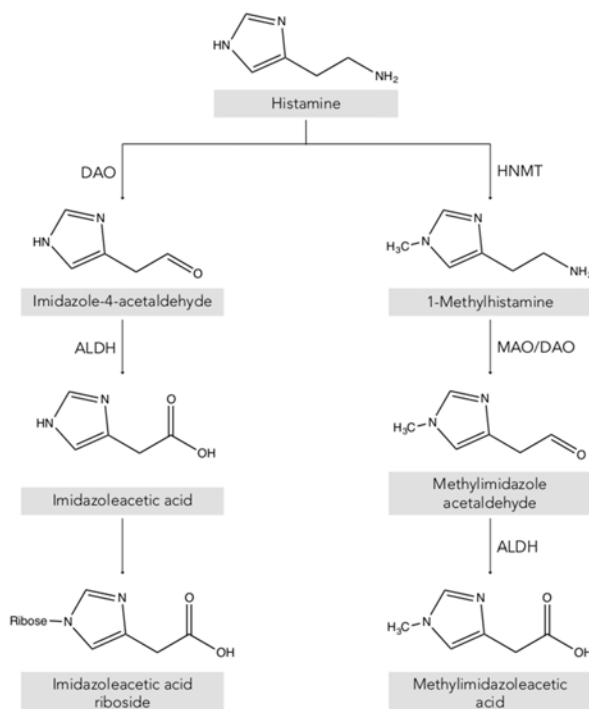
**Figure 1.** Synthesis of histamine by decarboxylation of its precursor amino acid.

The physiological and pathophysiological effects of histamine on the body were first described in 1910 by Dale and Laidlaw, two pioneering researchers who studied the functions of this organic compound at the Wellcome Physiological Research Laboratories [4–6]. Specifically, histamine is synthesized and stored in high concentrations in secretory granules, mainly in basophils and mast cells, and also in gastric enterochromaffin cells, lymph nodes and the thymus [1,7]. Functionally, this amine is involved in various immune and physiological mechanisms, stimulating gastric acid secretion, inflammation, smooth muscle cell contraction, vasodilation and cytokine production, among other processes [8–11]. In addition, histamine functions as a neurotransmitter, being synthesized by neurons located in the posterior region of the hypothalamus whose axons extend through the brain [12]. These wide-ranging physiological effects occur by interaction with four G-protein-coupled receptors with seven transmembrane domains (H1, H2, H3 and H4), which activate signal transduction pathways upon perceiving their ligand, histamine [7,12].

Two main histamine metabolic pathways are known in humans, involving the enzymes diamine oxidase (DAO) and histamine-N-methyltransferase (HNMT) (Figure 2) [10,11,13]. DAO (EC 1.4.3.22), also called histaminase or amiloride-binding protein, is a copper-dependent amino oxidase encoded by the AOC1 gene located on chromosome 7 (7q34-36) [14–16]. This functional enzyme, a homodimer with two isoforms, catalyzes the oxidative deamination of the primary amine group of histamine [14,16,17]. On the other hand, histamine can be metabolized to 1-methylhistamine by the enzyme HNMT (EC 2.1.1.8), a small monomeric protein encoded by a gene located on chromosome 2q22.1 [18]. HNMT catalyzes the methylation of the secondary amine group of the histamine imidazole aromatic heterocycle by a reaction requiring the S-adenosyl methionine cosubstrate as a methyl group donor [11,13,19].

Thus, depending on its location, the histamine present in the body is deaminated or methylated by the action of the enzymes DAO and HNMT, respectively [1,10,20]. DAO is a secretory protein stored in vesicular structures of the plasma membrane and is responsible for the degradation of extracellular histamine [1,15]. In mammals, the expression of DAO is restricted to certain tissues, mainly the small intestine, ascending colon, placenta and kidneys [14,21]. In the intestine, DAO activity increases progressively from the duodenum to the ileum and is located mainly in the intestinal villi [22]. In contrast, the enzyme HNMT is expressed in a wide range of human tissues, above all in the kidneys and liver, and also the spleen, colon, prostate, ovaries, spinal cord cells and the trachea and respiratory tract [10,13]. HNMT is a cytosolic protein responsible for the inactivation of intracellular histamine and can be synthesized in the cell itself or incorporated from the extracellular space by binding to a receptor or by membrane transporters [7,18]. Regarding substrates, HNMT is highly selective for histamine, whereas DAO can also metabolize other biogenic amines such as putrescine and cadaverine,

although it shows a preference for histamine [14,16,23]. The affinity of DAO and HNMT for histamine is very similar, although the latter shows a slightly lower Michaelis–Menten enzymatic constant ( $K_M$ : 6–13  $\mu\text{mol/L}$ ) than DAO ( $K_M$ : 20  $\mu\text{mol/L}$ ) [10].



**Figure 2.** Histamine metabolism in humans. DAO: diamine oxidase; HNMT: histamine-N-methyltransferase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; MAO: monoamine oxidase.

The gateway for dietary histamine in the body is the intestinal epithelium. Therefore, although HNMT is also present in the gastrointestinal tract, the more highly expressed DAO plays the major role in protecting the body against exogenous histamine, whether originating from ingested food or generated by the intestinal microbiota [24–26]. The protective effect of DAO has been demonstrated in animal experimentation models that were administered aminoguanidine for irreversible and selective DAO inhibition, followed by a dose of histamine [24,27,28]. The development of anaphylaxis symptoms in DAO-inhibited pigs and sheep compared to control groups indicates that the enzyme exerts a significant barrier effect against the absorption of exogenous histamine into the systemic circulation [1,13,19,24,29]. The HNMT enzyme ranks second to DAO in protecting against the absorption of dietary histamine from the intestinal lumen, but appears to be more effective against intravenously or intradermally supplied histamine [13,30].

### 3. Histamine in Foods

Histamine is present in a wide range of foods in highly variable concentrations, which are the main exogenous source of this compound [31]. The main route for histamine formation in food is the decarboxylation of histidine through the action of L-histidine decarboxylase, an enzyme of bacterial origin [32,33]. Apart from histamine, food can also contain other biogenic amines, mainly tyramine (4-hydroxy-phenethylamine), putrescine (1,4-diaminobutane) and cadaverine (1,5-diaminopentane),



which are formed through enzymatic deamination of the amino acids tyrosine, ornithine (and/or agmatine) and lysine, respectively [31,34]. The accumulation of these compounds in food is the result of the transformation of amino acids by microorganisms and depends on various factors, such as the availability of the precursor amino acids and environmental conditions favorable for growth and/or the bacterial decarboxylase activity [31,34,35].

These decarboxylation reactions have been described as a survival strategy for microorganisms in acidic environments, as well as an alternative source of metabolic energy in situations of suboptimal substrate availability [1,9]. This enzymatic activity in bacteria is a species- and strain-dependent property [32]. Several Gram-positive and Gram-negative bacteria responsible for microbial spoilage or fermentative processes in food are able to produce histamine [1,36]. Specifically, the Enterobacteriaceae species *Hafnia alvei*, *Morganella morganii* and *Klebsiella pneumonia* have been identified as some of the most prolific histamine-forming bacteria in fish [9,37]. On the other hand, in cheeses, fermented meat, vegetable derivatives and fermented beverages, various lactic acid bacteria have also been described as histamine-producing microorganisms (e.g., *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus* and *Oenococcus oeni*) as well as certain strains of Enterobacteriaceae [1,38,39].

Foods that potentially contain high levels of histamine are: a) those microbiologically altered, such as fish and meat, or derived products that may have been preserved or processed in unsuitably hygienic conditions; and b) fermented products, in which the bacteria responsible for the fermentation process may also have aminogenic capacity [3,40]. Table 1 shows histamine content in the different food categories from the Spanish market [31].

**Table 1.** Histamine content in different food categories. Adapted from [31].

Food	n	Histamine Content (mg/kg)			
		Mean (SD)	Median	Minimum	Maximum
Fruits, vegetables and plant-based products					
Fruits	136	0.07 (0.20)	ND	ND	2.51
Nuts	41	0.45 (1.23)	ND	ND	11.86
Vegetables	98	2.82 (7.43)	ND	ND	69.72
Legumes	11	ND	ND	ND	ND
Cereals	28	0.12 (0.33)	ND	ND	0.89
Chocolate	25	0.58 (0.44)	0.17	0.16	0.56
Spices	12	ND	ND	ND	ND
Alcoholic beverages					
Beer	176	1.23 (2.47)	0.70	ND	21.60
White wine	83	1.24 (1.69)	0.45	0.10	13.00
Red wine	260	3.81 (3.51)	1.90	0.09	55.00
Fish and seafood products					
Fresh fish	136	0.79 (0.71)	ND	ND	36.55
Canned fish	96	14.42 (16.03)	5.93	ND	657.05
Semipreserved fish	49	3.48 (3.37)	2.18	ND	34.90
Fresh meat	6	ND	ND	ND	ND
Cooked meat	48	0.30 (0.26)	ND	ND	4.80
Cured meat	23	12.98 (37.64)	0.80	ND	150.00
Dry-fermented sausages	209	32.15 (14.22)	8.03	ND	357.70

Table 1. Cont.

Food	n	Histamine Content (mg/kg)			
		Mean (SD)	Median	Minimum	Maximum
Meat and meat products					
Dairy products					
Unripened cheese	20	ND	ND	ND	ND
Raw milk cheese	20	59.37 (106.74)	18.38	ND	389.86
Pasteurized milk cheese	20	18.05 (38.23)	4.59	ND	162.03

ND: not detected.

#### 4. Uncertainties Associated with Histamine Poisoning: A Paradigm Shift Towards Histamine Intolerance

Although histamine has important physiological functions in the body, it can pose a health risk when ingested in high levels [41]. The proper functioning of histamine degradation systems is key in preventing its accumulation. Histamine intoxication, a kind of food poisoning, may occur after the consumption of foods with an unusually high histamine content that overpowers the degradation mechanisms (generally higher than 500 mg/kg) [1,3,42].

Historically, histamine intoxication has also been termed scombroid fish poisoning or the mahi-mahi flush because of its repeated association with the consumption of fish in the Scombridae and Scomberesocidae families (e.g., tuna, herring and mackerel) [43]. Histamine was first identified in 1946 as the causative agent of the toxic effects of consuming poorly transported tuna, and for a long time histamine poisoning was associated almost exclusively with the consumption of spoiled fish [44,45]. Over the years, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of the term histamine intoxication to better designate this pathology, as it can be caused by marine species from other families (e.g., Clupeidae, Engraulidae, Coriphaenidae and Pomatomidae) and even other foods, such as cheese [43]. A meta-analysis carried out in 2018 of the different scientific reports of histamine intoxication between 1959 and 2013 established that the causative food in 98% of cases was fish, the remaining percentage being attributed to cheese [46]. Currently, international health administrations consider histamine intoxication to be one of the main problems of global food security, both for its effects on human health and its impact on trade [47,48].

Histamine intoxication is characterized by occurring in outbreaks and having a short incubation period (i.e., 20–30 min post-ingestion), with symptoms that are generally of low/moderate severity and remit in a few hours [3]. The symptoms are closely linked to the various physiological functions of histamine in the body, affecting the skin (e.g., redness, rash, urticaria, pruritus, edema and local inflammation), the gastrointestinal tract (e.g., nausea, vomiting and diarrhea) and the hemodynamic (hypotension) and neurological (e.g., headache, palpitations and tingling) bodily functions [1,41]. The symptomatic similarity of histamine intoxication with allergy means it is likely to be underdiagnosed [43,48,49]. The diagnosis of histamine intoxication is based primarily on the determination of elevated plasma histamine levels and/or the identification of an ingested food with an unusually high histamine content [13]. In general, an outbreak of histamine poisoning tends to involve more than one individual, lasts a short period of time and a particular causative food is identified [38].

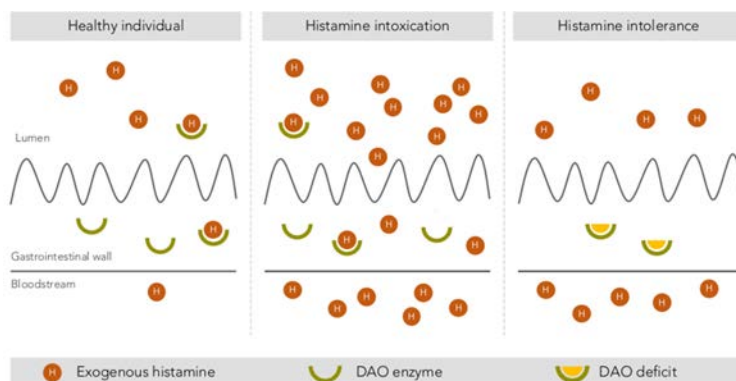
In terms of incidence, the data available for the European Union shows an increase in histamine intoxication outbreaks in the last ten years, unlike other types of food poisoning, and with an almost hegemonic predominance of fish as the causative agent (over 90% of cases) [42,50]. The most recent data from the EFSA and European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) show that in 2017, there was a 22% increase in outbreaks compared to the previous year [50]. Specifically, in 2017, there were a total of 117 outbreaks of histamine intoxication involving 572 people, 9% of whom required hospitalization. Fortunately, no deaths have been attributed to histamine poisoning over the past

decade [42]. The same trend is observed in the information provided by the European Union Food and Feed Warning System (RASFF), with a progressive rise in the number of cases of histamine poisoning linked to tuna consumption in 2014–2017 and a particularly high increase in 2017 [3].

Although histamine intoxication has been extensively studied in recent decades, unresolved questions remain, concerning, for example, the variable histamine concentrations in the foods triggering outbreaks, or the heterogeneity in the degree and type of adverse effects [46]. Furthermore, the fact that oral administration of histamine in doses equivalent to those normally found in foods causing illness does not produce the same range and/or severity of symptoms is a paradox that has led to multiple hypotheses [30].

Several authors have proposed that alcohol and certain food components, such as other biogenic amines, may have a potentiating effect on histamine toxicity [13,48]. Amines such as putrescine and cadaverine, which are usually found in foods along with histamine, can also act as DAO substrates. It has therefore been suggested that these amines could weaken the protective barrier against dietary histamine by competitively interacting with degradation enzymes in the intestine [3,49]. Other possible potentiators are alcohol and its metabolite acetaldehyde, as they compete with histamine for the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH), which is simultaneously involved in histamine and alcohol metabolism [1,32]. The potentiation effect of these components could help explain the differences in absorption of the same dose of histamine when ingested in isolation or in a food matrix [48,49]. The FAO and WHO have acknowledged that the involvement of potentiators can alter the threshold dose for toxicity, and they recommend that future studies focus on clarifying the ambiguities in the pathogenesis of histamine intoxication [30].

Finally, several authors have reported considerable interindividual variability in histamine tolerance, which has been demonstrated in intervention studies [1,3,10,13]. After the oral administration of the same histamine dosage, not all participants showed symptoms, and those who did varied in symptom type and severity and even had different blood histamine levels [48,51,52]. These results indicate the existence of population subgroups with greater sensitivity and clinical responses to histamine, likely linked to a diminished histamine degradation capacity, which could explain some of the historical uncertainties associated with histamine intoxication outbreaks [1]. Without disputing the clinical entity of histamine intoxication, the paradigm shift lies precisely in moving the focus from food to the human body, maintaining histamine as the causative agent, but focusing on how each person is able to respond to the intake of variable levels of histamine from food. Thus, histamine intolerance is the clinical condition that describes the inability of certain individuals to degrade histamine and results in the onset of symptoms caused by its accumulation in the blood (Figure 3).



**Figure 3.** Intestinal degradation of histamine by the DAO enzyme in three different situations: in a healthy individual, with histamine intoxication and with histamine intolerance. Adapted from [13].

## 5. Histamine Intolerance

According to the 2003 review of allergy nomenclature by the World Allergy Organization, adverse reactions to food without an immunological basis should be referred to as nonallergic food hypersensitivity, in order to clearly differentiate them from food allergies initiated by a specific immune mechanism [53]. Nonallergic food hypersensitivity is commonly known as food intolerance, a response triggered by a food or any of its components at a dose normally tolerated by the healthy population [54]. While the prevalence of food allergies is estimated at 1–2% in adults, currently almost 20% of the Westernized world's population suffers from some type of food intolerance, with lactose intolerance being the most common [54].

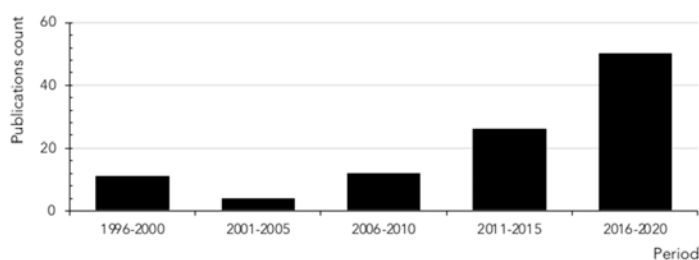
Histamine intolerance, also referred to as enteric histaminosis or sensitivity to dietary histamine, can be defined as a disorder arising from reduced histamine degradation capacity in the intestine due to impaired DAO activity, leading to its accumulation in plasma and the appearance of adverse effects [11,41,55].

The DAO enzyme was first identified back in 1929 by Charles H. Best in autolyzing lung tissue, which he called histaminase because of its ability to degrade histamine [56]. Years later, given its ability to also degrade other diamines, as described above, the more accurate designation of DAO was proposed [57,58]. Beyond its role in the intestinal degradation of histamine in humans, DAO is also present in microorganisms, plants and animals, where it also catalyzes the oxidative deamination of the primary amino group of histamine into its corresponding aldehyde, concomitantly producing stoichiometric amounts of ammonia and hydrogen peroxide (Figure 4) [14,59,60].



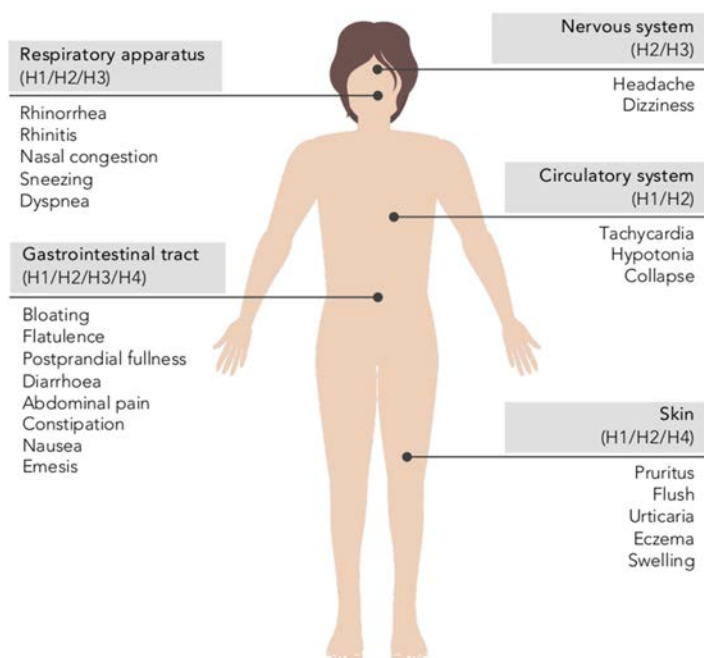
**Figure 4.** Oxidative deamination of histamine by the DAO enzyme.

Although the first scientific references to histamine intolerance date from more than 20 years ago, it is significant that almost 80% are from the last decade, reflecting the growing interest of researchers in this disorder (Figure 5). In 2011, EFSA already considered histamine intolerance as one of the risks associated with histamine intake, clinically differentiating it from histamine intoxication [1]. In a subsequent joint report, the WHO and FAO emphasized that the no observed adverse effect level (NOAEL) established for histamine was only valid for healthy people, and not for members of susceptible populations, such as those with histamine intolerance [30]. EFSA concluded that only foods with histamine levels below the detection limits are safe for individuals with histamine intolerance [1].



**Figure 5.** Count of scientific publications containing the keywords histamine intolerance or histaminosis, according to a search performed through the PubMed search engine at the MEDLINE bibliographic database (search performed in July 2020).

Clinical manifestations of histamine intolerance consist of a wide range of nonspecific gastrointestinal and extraintestinal symptoms, due to the ubiquitous distribution of the four histamine receptors in different organs and tissues of the body (Figure 6) [10,13,54,61]. In a very recently published study, a team of Austrian researchers comprehensively analyzed the symptoms experienced by 133 patients diagnosed with histamine intolerance [62]. The most frequent and severe manifestations were gastrointestinal, with abdominal distension observed in 92% of patients and postprandial fullness, diarrhea, abdominal pain and constipation in 55–73%. Impairments of the nervous and cardiovascular systems, such as dizziness, headaches and palpitations, were recorded in second place, followed by respiratory and dermatological symptoms. Highlighting the complexity of the clinical picture of histamine intolerance, combinations of three or more symptoms involving different organs were recorded in 97% of cases, with an average of 11 symptoms per patient. The low specificity and complex variability of symptoms undoubtedly contribute to the current difficulty in achieving consensus on the diagnostic criteria for histamine intolerance, as will be discussed in detail below [13]. A lack of data also makes it difficult to determine the current incidence of this condition, although some authors have estimated that it affects 1–3% of the population, a percentage that will possibly increase as more knowledge and diagnostic tools for histamine intolerance become available [10,13,63].



**Figure 6.** Main symptoms of histamine intolerance and possibly corresponding histamine receptors [10,64].

### 5.1. The Etiology of Histamine Intolerance

As mentioned in previous sections, the main barrier against exogenous histamine in the intestines is the DAO enzyme, which prevents its passage into the systemic circulation [10,13,65]. Numerous clinical studies have provided data on the prevalence of low plasma DAO levels in individuals showing symptoms of histamine intolerance, mainly headaches and gastrointestinal or dermatological disorders [66]. Although certain studies have limitations, either in the design or number of participants, the majority point to an association between symptoms and DAO deficiency, establishing a general

trend that supports the key role of DAO in the etiology of these disorders. A DAO deficiency that predisposes a population subgroup to histamine intolerance may have a genetic, pathological or pharmacological origin [1,41].

Regarding the genetic background of histamine intolerance, several studies have analyzed in depth the polymorphisms in genes encoding the enzymes L-histidine decarboxylase, DAO and HNMT, as well as the different histamine receptors. More than 50 nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the DAO-encoding gene have been identified, some of which can produce a protein with altered activity and lead to symptoms of histamine intolerance [67–72]. Specifically, the most relevant SNPs affecting DAO enzyme functionality in Caucasian individuals are rs10156191, rs1049742, rs2268999 and especially rs1049793 [69,71]. On the other hand, an SNP in the promoter region of the gene has also been identified that causes a lower transcriptional activity of the DAO-encoding gene (rs2052129), as well as several genetic variations responsible for enzyme deficiency in people of Asian or African origin (rs45558339 and rs35070995, respectively) [67,72]. In most cases, the effect of these genetic variations on DAO functionality is through changes in enzyme kinetics, the resulting increase in  $K_M$  causing a reduction in the rate of histamine degradation [69]. In parallel, three SNPs have been identified as being responsible for enhanced DAO enzyme activity (rs2071514, rs1049748 and rs2071517) [72]. There is also evidence of DAO mutations in patients with certain cardiovascular, gastrointestinal and nervous system pathologies, although with contradictory results regarding positive/negative effects [68].

DAO deficiency can also be an acquired condition, caused by certain pathologies or interaction with drugs. Several inflammatory bowel pathologies affecting mucosal integrity are known to result in impaired DAO activity, the degree of which can be correlated with the severity of mucosal damage [73–75]. Thus, DAO activity has been proposed as a marker of integrity of the intestinal mucosa. Miyoshi et al. demonstrated that DAO activity can be a useful predictor of intestinal mucosal damage in patients receiving chemotherapy [76]. Additionally, DAO deficiency has also been linked to certain functional gastrointestinal disorders, such as carbohydrate malabsorption and nonceliac gluten sensitivity (NCGS) [63,73,77–79]. Enko et al. found that a concomitant reduction in DAO and lactase enzyme activities could be a consequence of mucosal damage in the small intestine due to gastrointestinal disorders (e.g., gastroenteritis, irritable bowel syndrome, short bowel syndrome and gastrointestinal surgery) [73]. Moreover, patients with lactose intolerance and plasma DAO deficit showed higher end-expiratory  $H_2$  levels and the appearance of more symptoms during the  $H_2$  breath test in comparison with lactose-intolerant individuals with normal DAO activity [79]. More recently, two works have suggested a potential relationship between a reduced DAO activity and the presence of NCGS. Schnedl et al. based this relationship on the broad parallelism between the symptomatology of NCGS and histamine intolerance, while the pilot study conducted by Griauzdaite et al. reported a strong association between reduced DAO activity and the presence of NCGS, although with a reduced number of patients [77,78]. In fact, Griauzdaite et al. found out that nine of 10 patients with NCGS had decreased serum DAO activity levels [78]. This recently indicated relationship between both disorders, NCGS and histamine intolerance, should be further explored as it may be of interest for the correct clinical management of affected patients.

Finally, DAO deficiency can be a temporary and reversible condition, caused by the inhibitory effect of substances such as biogenic amines and alcohol, as discussed above, as well as several widely used drugs (Table 2) [1,10]. It has been estimated that approximately 20% of the European population regularly take DAO-inhibiting drugs, which significantly increases the number of people susceptible to the adverse effects of dietary histamine [28]. In vitro experimental results show a potent inhibitory effect (greater than 90%) of chloroquine, a historical antimalarial active ingredient, and clavulanic acid, a  $\beta$ -lactam antibiotic widely used in combination with amoxicillin [80]. A significant inhibition of the enzymatic activity has also been observed with the antihypertensive drug verapamil and the histamine  $H_2$  receptor antagonist cimetidine, although the clinical use of the latter is currently anecdotal [23,80]. Other substances have also shown an inhibitory effect, albeit to a lesser extent (Table 2) [23,80,81].

In most cases, the structural similarity of the cited drugs with histamine could explain their potential to bind to the active site of DAO and reduce its enzymatic activity [23]. Along the same lines, substances with an inhibitory effect on other enzymes involved in any of the metabolic pathways of histamine in the body (i.e., HNMT, ALDH and MAO) may act as a trigger of histamine hypersensitivity [82].

**Table 2.** Active ingredients with an experimentally demonstrated inhibitory effect on the DAO enzyme [23,28,80,81].

Active Ingredient	Indication
Chloroquine	Antimalarial
Clavulanic acid	Antibiotic
Colistimethate	Antibiotic
Cefuroxime	Antibiotic
Verapamil	Antihypertensive
Clonidine	Antihypertensive
Dihydralazine	Antihypertensive
Pentamidine	Antiprotozoal
Isoniazid	Antituberculous
Metamizole	Analgesic
Diclofenac	Analgesic and anti-inflammatory
Acetylcysteine	Mucoactive
Amitriptyline	Antidepressant
Metoclopramide	Antiemetic
Suxamethonium	Muscle relaxant
Cimetidine	Antihistamine (H2 antagonist)
Prometazina	Antihistamine (H1 antagonist)
Ascorbic acid	Vitamin C
Thiamine	Vitamin B1

### 5.2. Prevalence of DAO Deficit in Persons with Symptoms Related to Histamine Intolerance

Several studies have evaluated the prevalence of DAO deficit in plasma of individuals with symptoms of histamine intolerance and/or diagnosis with certain chronic disorders.

Mušič et al. found DAO deficiency in 80% of 316 adult patients showing various symptoms associated with histamine intolerance (e.g., urticaria, pruritus, diarrhea, abdominal pain, vomiting, constipation, cough, rhinitis and headache), as well as significantly lower plasma DAO activity compared to the control group [83]. Similarly, in a retrospective study, Manzotti et al. evaluated DAO activity in 14 patients with a confirmed diagnosis of histamine intolerance who showed mainly gastrointestinal and dermatological symptoms, but also headaches [84]. In this case, patients showed a high prevalence of DAO deficit (71%) and a significantly lower mean DAO activity compared to healthy volunteers. A lower percentage of DAO deficiency in histamine-intolerant patients (24%) was reported by Pinzer et al. [63]. Those patients featured elevated histamine levels and constantly reduced DAO activities throughout the day.

In a study focused only on headache symptoms, Steinbrecher and Jarisch reported DAO deficiency in 23 of 27 patients (85%) [85]. In parallel, the authors described a significant increase in DAO activity after patients followed a low-histamine diet for four weeks, along with a remission or reduction in frequency of headaches in almost 90% of individuals. More recently, Izquierdo et al. studied the prevalence of DAO deficit in 137 patients diagnosed with a confirmed migraine diagnosis and in a control group of 61 nonmigraine individuals [66]. In this study, a high prevalence of DAO deficiency was observed in the migraine group (87%) and with a mean DAO activity significantly lower in comparison with that obtained from control volunteers. However, the prevalence of DAO deficiency in the control population amounted up to 44%, which was attributed to the fact that certain individuals could present other symptoms associated with histamine intolerance or DAO deficiency other than

migraines. Another study with 44 migraine patients reported a 60% prevalence of DAO deficiency and a significant copresence of certain gastrointestinal disorders, such as celiac disease and NCGS [78].

In the field of dermatological symptomatology, several studies have monitored plasma DAO activity in patients with eczema, chronic idiopathic urticaria and atopic dermatitis. Overall, the reported prevalence of DAO deficiency ranges from 19 to 57%, with the exception of the study by Worm et al., who did not detect statistically significant differences in plasma DAO activity between control patients and those with atopic dermatitis [86–89].

Finally, regarding gastrointestinal symptoms, Honzawa et al. assessed the clinical significance of plasma DAO activity levels in 98 patients suffering inflammatory bowel disease [90]. This study showed that DAO activity in blood was significantly lower in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis compared to the control population, suggesting its potential importance as a marker of intestinal permeability. In a pediatric population under 15 years of age, Rosell-Camps et al. determined DAO deficiency in 88% of patients with abdominal pain, diarrhea and vomiting [91]. In contrast, in a more recent study by a group of Austrian researchers, DAO deficiency was found in only 8% of 394 children with chronic abdominal pain [92].

To date, little data is available on the prevalence of this enzymatic deficiency related to gender, and it is inconclusive. Klockler et al. found no differences in plasma DAO activity between men and women, although the number of individuals considered was scarce ( $n = 28$ ) [93]. Likewise, the study performed by Izquierdo et al. reported similar percentages of DAO deficiency in migraine-suffering women (83%) and men (90%) [66]. On the contrary, García-Martín et al. did describe differences in plasma DAO activity by gender, with the prevalence of this enzyme deficiency being higher in women [94]. Significant fluctuations in DAO activity values have also been reported in women associated with different stages of the menstrual cycle [94,95].

One factor that could explain the discordance among the prevalence data of DAO deficit in patients with disorders associated with histamine intolerance is that the parameter considered in all of them was serum DAO activity, which, a priori, would not reflect an enzymatic deficiency derived from certain intestinal pathologies. Overall, in spite of the varying percentages in DAO deficiency, the currently available studies seem to indicate an etiological relationship between DAO deficiency and certain symptoms or disorders related to histamine intolerance. Nevertheless, more studies are needed to assess the clinical significance of the determination of plasma DAO activity, as well as to develop new diagnostic methods aimed at identifying individuals with histamine intolerance due to DAO deficiency.

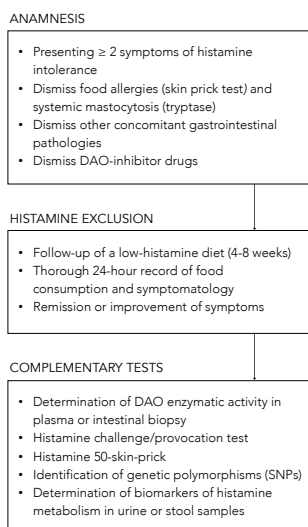
### 5.3. Diagnosis of Histamine Intolerance

Despite significant advances in the understanding of histamine intolerance, reaching a consensus on a diagnostic algorithm remains a pending challenge. The nonspecificity of symptoms and lack of validated diagnostic tools prompts many affected individuals to go “doctor shopping”; that is, to consult several medical specialists in search of an explanation and solution for their varied symptomatology [13,63]. In the absence of a consensual and clinically validated diagnosis, Figure 7 shows a schematic summary of the diagnostic algorithm for histamine intolerance based on the available scientific evidence reviewed below.

The combination of diagnostic criteria currently in use includes the appearance of typical clinical manifestations and the exclusion of other related disorders [10,13,54]. All the authors who have proposed a diagnostic algorithm for histamine intolerance emphasize the need to initially rule out other potential causes of symptoms associated with an increase in plasma histamine [10,13,54]. For this purpose, it is advisable to carry out an intradermal skin allergy test (i.e., skin prick test) to discard IgE sensitization caused by food allergy, and to measure plasma tryptase to exclude an underlying systemic mastocytosis [10]. It is also important to know whether the patient is taking any medication with a possible inhibitory effect on DAO activity [55]. If these conditions are negative, the appearance of two or more typical symptoms of histamine intolerance and their improvement or remission



after the following of a low-histamine diet (i.e., a diet excluding foods that, a priori, contain high histamine levels) will confirm the diagnosis of histamine intolerance [10,54,96,97]. In the diet follow-up, a thorough 24-h record of all the foods consumed and symptoms experienced is recommended in order to establish a relationship, if any, between a food and the onset of symptoms [10,13]. The duration of the low-histamine diet to confirm the diagnosis is not clearly stipulated, although some studies suggest a period of 4 to 8 weeks [54,97]. In addition to the diet, testing the effect of antihistamine treatment on symptoms has also been proposed, although its usefulness once dietary histamine is removed is unclear [10,54].



**Figure 7.** Summary of the described approaches to the diagnosis of histamine intolerance. SNPs: single-nucleotide polymorphisms.

Once it has been established that dietary histamine is responsible for the intolerance-associated symptoms, the diagnosis of this disorder is virtually confirmed. A range of nonvalidated complementary tests have also been proposed by several authors with the aim of obtaining a marker to confirm the diagnosis [97]. However, it has to be taken into account that not all of the tests consider the different origins of DAO deficiency (i.e., genetic, pathological or pharmacological). Thus, a genetic origin would lead to a reduction of the DAO enzymatic activity in the whole organism. Likewise, the pharmacological blockade of DAO would take place in all tissues where the drug is distributed after entering the systemic circulation, although in a punctual manner upon the substance's introduction. Lastly, the scope of a DAO deficit due to intestinal pathologies would be limited to the local intestinal environment.

Due to the genetic background of DAO deficiency, one of the strategies for the diagnosis could be the determination of genetic polymorphisms (SNPs) that characterize the population as genetically susceptible to histamine [54]. Currently, there is already the possibility of performing a noninvasive genetic analysis capable of identifying three of the SNPs associated with reduced DAO activity (i.e., rs10156191, rs1049742 and rs1049793) from a sample of the oral mucosa, although evidence-based studies on the diagnosis potential of this test are still needed. It is important to note that this test will only reflect the existence of a genetic DAO deficiency.

The most studied, and possibly also the most controversial, is the determination of plasma DAO activity. This analytical test consists of measuring the amount of histamine degraded in a blood sample in a given time interval. Two types of commercial testing kits are currently available on the market, one consisting of an ELISA-type immunoassay, and the other a radioimmunoassay using radioactively

labeled putrescine [83,84]. The evidence for the validity of blood DAO activity measurements for the diagnosis of histamine intolerance is neither abundant nor conclusive. Some studies have proposed that determining blood DAO activity may be helpful in identifying subjects with symptoms associated with histamine intolerance [63,83,84]. In contrast, three studies did not find a significant relationship between the clinical history of patients with typical symptoms of histamine intolerance and blood DAO activity values, concluding that this technique cannot be recommended as a diagnostic tool in routine clinical practice until studies have validated its effectiveness [98–100]. Moreover, the work performed by Schnoor et al. also reported a high interassay variation in DAO activity values that made the proper classification of histamine-intolerant subjects impossible [100]. This controversy is described in a joint article published in 2017 by the German and Swiss allergology societies, which emphasizes the need for more research before giving plasma DAO activity a definitive diagnostic value for histamine intolerance [97].

A variant of the intradermal skin allergy test called the histamine 50-skin-prick test was also proposed by Kofler et al. to diagnose histamine intolerance [101]. In this technique, the results were read after 50 min (as opposed to the usual 20 min) and showed that, although the size of the wheal did not differ between the histamine intolerant and control groups, the time course was significantly different. Patients with symptoms of intolerance showed a delayed remission of the wheal induced by cutaneous administration of histamine, signaling a reduced degradation ability. The same results were obtained in a study recently published by Wagner et al., who re-evaluated this skin test as a diagnostic tool of histamine intolerance, also observing a correlation between the delay in wheal disappearance and a lower plasma DAO activity [102].

Both the determination of plasma DAO activity and the histamine 50-skin-prick test could be suitable tests to identify a DAO deficiency from genetic or pharmacological origin, but they would not be useful to determine a deficit secondary to certain intestinal diseases.

On the contrary, there are certain alternatives, such as the intestinal biopsy, the histamine provocation test or the histamine metabolomics in urine, that could make it possible to diagnose histamine intolerance due to DAO deficiency without excluding any of the possible etiological causes.

The measurement of intestinal DAO activity by a colon biopsy during endoscopic procedures has been studied as a possible diagnostic marker. The few available studies have shown a reduced intestinal DAO catabolic activity in patients with recurrent urticaria, food allergy and colon adenoma, accompanied by an increase in histamine levels [103–106]. Although this test has interesting diagnostic potential, more studies are needed to validate its clinical significance and its relationship with the symptoms of histamine intolerance [97]. If proven, this diagnostic test would be very adequate since this disorder originates from a reduced ability of the intestinal DAO enzyme to cope with dietary histamine.

Histamine challenge/provocation test has also been proposed by some authors as a diagnostic tool for intolerance, which would, at the same time, establish the individual tolerance threshold. This double-blind, placebo-controlled test involves oral administration of histamine and requires patient medical supervision and hospitalization. In the study by Wöhrle et al., half of the healthy volunteers developed symptoms after the administration of a solution containing 75 mg of histamine [107]. In contrast, the results of a multicenter study by Komericki et al. using the same oral dose of histamine indicated the challenge test was unreliable for diagnosing histamine intolerance due to a lack of intraindividual reproducibility of symptoms after two different provocation tests [108]. The application of this procedure is still limited because of the risk of serious adverse side effects and the absence of a standardized dose of histamine and properly established protocol [97].

Finally, in recent years, efforts have been made to identify a noninvasive marker to establish a solid and clinically irrefutable diagnostic criterion for histamine intolerance due to DAO deficiency. Currently, the application of metabolomics as a tool for the identification of biomarkers of histamine metabolism in urine is also being challenged as a possible new diagnostic strategy [11]. The hypothesis is that individuals with histamine intolerance could have a different excretion profile of histamine and its metabolites in urine than normal individuals. For this purpose, Comas-Basté et al. have recently

proposed a chromatographic approach that allows for determining in a fast and unequivocal manner the urinary levels of histamine and its methylated metabolite, methylhistamine [11]. It is still necessary to validate the potential diagnostic utility of this approach in patients with histamine intolerance, as well as complementing the excretion profile with other histamine metabolites to obtain a more accurate image of the possible alterations produced in this intolerance.

#### 5.4. Treatment Approaches to Histamine Intolerance

Currently, the main strategy to avoid the symptoms of histamine intolerance is to follow a low-histamine diet. Supplementation with exogenous DAO has recently been postulated as a complementary treatment to enhance dietary histamine degradation in intolerant individuals who have a deficiency of this enzyme in the intestine [109,110].

##### 5.4.1. Low-Histamine Diet

A low-histamine or histamine-free diet has been proposed as the main strategy for the preventive treatment of histamine intolerance [10,54,82,111]. Conceptually, these diets exclude a number of foods that patients associate with the onset of symptoms, primarily those that may contain high levels of histamine [82]. However, there is no single dietary recommendation of a low-histamine diet. As it may be seen in Table 3, there is no coincidence in all the foods excluded in the different low-histamine diets found in the literature [10,87,91,112–118].

**Table 3.** Foods excluded in the different low-histamine diets found in the literature [10,87,91,112–118].

Foods Excluded by Low-Histamine Diets		
<20% *	20–60% *	>60% *
Milk	Shellfish	Cured and semicured cheese
Lentils	Eggs	Grated cheese
Chickpeas	Fermented soy derivatives	Oily fish
Soybeans	Eggplant	Canned and semipreserved oily fish derivatives
Mushrooms	Avocado	Dry-fermented meat products
	Banana	Spinach
	Kiwi	Tomatoes
	Pineapple	Fermented cabbage
	Plum	Citrus
	Nuts	Strawberries
	Chocolate	Wine
		Beer

\* Percentage of low-histamine diets from the literature that exclude each foodstuff.

Histamine is widely distributed in different food categories and in highly variable concentrations, as its accumulation is influenced by multiple factors [3,119]. In fresh foods such as fish and meat, and in some derived products, the presence of histamine is due to a lack of freshness or an inadequately hygienic quality of raw materials and/or production processes [31]. For this reason, meat and fish can be consumed in the framework of a low-histamine diet, as long as their freshness is ensured. In contrast, fermented products are systematically excluded, due to a high probability of containing histamine [31]. Other foods such as spinach, eggplant and tomatoes should also be avoided for the same reason. In general, all these abovementioned foods are unanimously eliminated in most published low-histamine diets (Table 3).

On the other hand, there are certain foods that a priori do not contain histamine, but that patients associate with the appearance of symptoms. For these foods, there is much more variability when it comes to their exclusion from low-histamine diets (Table 3). The exclusion of foods could be based on their content of other biogenic amines, such as putrescine and cadaverine, which act as competitive substrates for DAO and may therefore inhibit intestinal degradation of histamine if present in significant

quantities [1,82]. Thus, the onset of symptoms after the consumption of citrus fruits, mushrooms, soybeans, bananas and nuts may be due to high levels of other amines, specially putrescine [82]. These diets may also exclude certain foods free of histamine and with low enough concentrations of other amines to justify their exclusion. This is the case, for example, for papayas, kiwis, strawberries, pineapples and plums, which have been reported to trigger the release of endogenous histamine, although the mechanism responsible has not yet been elucidated [8,13].

The effectiveness of a low-histamine diet has been demonstrated in clinical studies, which report favorable results in terms of improvement or total remission of symptoms frequently associated with histamine intolerance and DAO deficiency (Table 4). As shown in Table 4, over the past three decades, various clinical studies have assessed the effect of a low-histamine diet on the evolution of various symptoms, mainly dermatological, gastrointestinal and neurological, including cases with more than one type. Although most studies have involved only a small group of patients (a mean of 38 per study, with a minimum of 10 and maximum of 157), they report an efficacy rate for the diet ranging from 33% to 100%. Specifically, 10 of the 13 studies reviewed found an improvement in symptoms in more than 50% of patients who followed the diet; two studies show success rates of less than 50% (33% and 46%), and only one did not observe any beneficial effects (Table 4). Most of the studies involved patients with dermatological symptoms, primarily chronic idiopathic urticaria, atopic dermatitis and eczema. In this field, a recent systematic literature review included a total of 1668 patients with chronic urticaria undergoing different exclusion diets, including low-histamine, pseudoallergen-free (i.e., without preservatives and artificial colors present in processed foods or aromatic compounds from certain natural products) and fish exclusion diets [120]. Overall, following any of the exclusion diets resulted in the total or partial remission of symptoms in 4.9% and 37.5% of patients, respectively. A low-histamine diet for an average of 3 weeks resulted in one of the highest remission rates. Despite the promising results of a low-histamine diet for the treatment of dermatological conditions, scientific societies of dermatology still consider this exclusion diet of unproven utility pending randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials to confirm its effectiveness [121].

In general, the duration of the dietary treatment considered in the different clinical studies ranges from 3 to 4 weeks, and no positive relationship could be established between a longer duration and the success rate in symptom remission (Table 4). As may also be seen in this table, some studies have also assessed the effect of diet on other variables, such as plasma histamine levels or plasma DAO activity [83,85–87,112,122,123]. Regarding DAO activity, the studies published by Steinbrecher et al., Maintz et al., Mušič et al. and Lackner et al. all point out an increase in plasma enzymatic activity in more than 50% of patients after the dietary intervention, although no explanatory hypothesis has been yet suggested [83,85,86,123]. In contrast, Guida et al., Wagner et al. and Son et al. reported no changes in serum DAO activity [87,112,122]. The inconsistency of these data highlights the need to develop more research in this specific field before conclusions can be drawn.

**Table 4.** Clinical studies on the efficacy of a low-histamine diet for the treatment of symptoms of histamine intolerance.

Design and Outcomes of the Study	Number of Patients and Symptoms	Duration	Percentage of Patients with Improvement in the Study Outcomes	Reference
Prospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology	28 patients with chronic headache and 17 with other dermatological and respiratory symptoms	4 weeks	68% reduction in chronic headache and 82% reduction in other symptoms	[124]
Prospective study with evaluation of the evolution of symptoms, plasma histamine levels and DAO activity	10 patients with chronic idiopathic urticaria and 19 control individuals	3 weeks	100% reduction in symptoms, 100% reduction in plasma histamine and no changes in DAO activity	[122]

Table 4. Cont.

Prospective study with evaluation of the evolution of symptoms, plasma histamine levels and DAO activity	35 patients with headache and other symptoms (urticaria, arrhythmia, diarrhea and asthma)	4 weeks	77% reduction in symptoms, 73% increase in DAO activity and no changes in plasma histamine levels	[85]
Prospective study with evaluation of the evolution of symptoms and DAO activity (in five of the patients)	17 patients with DAO deficiency, atopic eczema and other symptoms (headache, flushing and gastrointestinal symptoms)	2 weeks	100% reduction in symptoms and 60% (three out of five) increase in DAO activity	[86]
Prospective study with evaluation of the evolution of symptoms and the use of antihistamine drugs	13 patients with chronic idiopathic urticaria and 35 control patients (without diet)	4 weeks	Lack of improvement in symptoms and no changes in the use of antihistamines	[125]
Prospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology	36 patients with atopic dermatitis and 19 control individuals	2 weeks	33% reduction in symptoms	[88]
Prospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology and DAO activity	20 patients with DAO deficiency and dermatological, gastrointestinal and respiratory symptoms	6–12 months	100% reduction in symptoms and 100% increase in DAO activity	[83]
Retrospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology	16 pediatric patients with diffuse abdominal pain, diarrhea, headache, vomiting and rash	4 weeks	100% reduction of symptoms	[91]
Prospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology	16 pediatric patients with chronic abdominal pain and DAO deficiency	4 weeks	88% reduction of symptoms	[92]
Retrospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology	157 patients with chronic idiopathic urticaria	4 weeks	46% reduction of symptoms	[126]
Prospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology and DAO activity	56 patients with chronic idiopathic urticaria and gastrointestinal symptoms	3 weeks	75% reduction in symptoms and no changes in DAO activity	[87]
Prospective study with evaluation of the evolution of symptoms, plasma histamine levels and DAO activity	22 patients with chronic idiopathic urticaria	4 weeks	100% reduction in symptoms, 100% reduction in plasma histamine levels and no changes in DAO activity	[112]
Retrospective study with evaluation of the evolution of the symptomatology and DAO activity	63 patients with gastrointestinal symptoms	7–18 months	79% reduction in symptoms and 52% increase in DAO activity	[123]

#### 5.4.2. Exogenous DAO Supplementation

Similar to the current treatment for lactose intolerance, the possibility of oral supplementation with exogenous DAO has been proposed by several authors to facilitate dietary histamine degradation [13,127]. Improving intestinal DAO activity would allow a less restrictive diet, which could include foods with a tolerable dose of histamine [10,61]. In this context, in the update of the official list of novel foods in 2017, the European Commission gave the green light to the marketing of a DAO supplement as food supplement or as food for special medical purposes [128]. Specifically, European regulations authorize

the formulation of porcine kidney protein extract with an enteric coating to ensure its integrity during its passage through the gastric environment [128]. In this specific regulation, the minimum DAO enzymatic capacity required for the supplement is determined through a radio extraction assay (REA). This technique, based on the radioactive labeling of putrescine and the scintillation counting of its consumption, is advantageous in terms of rapidity and sensitivity, but it was mainly conceived to be applicable to serum samples. Comas-Basté et al. have recently developed a rapid and reliable methodology through ultra-high performance liquid chromatography and fluorimetric detection (UHPLC-FL) for the *in vitro* determination of DAO activity specifically for the analysis of unpurified complex matrixes, such as porcine kidney extract and DAO supplements [129]. This methodological approach is based in the direct determination of histamine degradation and overcomes certain drawbacks in terms of matrix interferences and handling of radioactive materials.

Porcine kidneys are the main source of DAO enzyme, according to the literature. Several studies have demonstrated the capacity of this product to degrade histamine and other biogenic amines *in vitro* [57,129–133]. A wide variability of the DAO capacity of porcine kidney extracts has been reported (with values ranging from 0.1 to more than 100 mU/mg), depending on the purification grade applied to the matrix and/or the amine compound used as the reaction substrate [57,129–133]. In fact, many of these works sought the selective purification of the DAO enzyme to design biosensors for the biorecognition of biogenic amines as indicators of freshness in foods [134]. More recently, two studies have been published specifically focused in investigating the *in vitro* DAO activity of porcine kidney protein extract expressly used as active ingredient to formulate food supplements for the preventive treatment of histamine intolerance [129,130]. Comas-Basté et al. studied the *in vitro* enzymatic activity of 13 different production batches of porcine kidney protein extract used in the elaboration of food supplements, reporting a low influence of the raw material (porcine kidney) on the DAO activity of the extract, with a mean value of  $0.23 \pm 0.01$  mU/mg [129]. Later, Kettner et al. obtained a porcine kidney crude extract with an *in vitro* DAO activity of  $0.5 \pm 0.06$  mU/mg, and described a 10-fold increase of this enzymatic activity through the application of several consecutive purification steps [130].

Regarding the food supplement, divergent results have also been reported, since while certain authors discard its enzymatic capacity, DAO activity values ranging from 0.04 to 0.20 mU/mg have also been described for different commercial products available in the market [129,130]. Overall, these works coincide in the need to identify alternative sources to porcine kidney DAO for exogenous supplementation in histamine-intolerant individuals.

A higher catalytic capacity of DAO enzymes of plant origin in degrading certain amino substrates has been described by some authors in comparison with those of animal origin [129,135–137]. Specifically, the germinated sprouts of certain edible legumes have been pointed out as interesting sources of DAO enzyme. Germination is a physiological process that has been described as capable of increasing the DAO enzymatic capacity of sprouts by up to 250 times compared to ungerminated seeds [61,138]. The increased presence of DAO enzyme in legume sprouts could be associated with the importance of hydrogen peroxide, a byproduct of the deamination reaction, in the cell wall structuring, lignification and mobilization of seed reserves during germination [139–142]. In fact, it has been demonstrated that the germination of legume seeds for a period of 6–8 days in darkness provides the optimal environment to maximize the DAO activity of this plant-origin matrix [61,138,143]. From a commercial point of view, having a plant source of this enzyme would expand the target of this novel food for the vegetarian/vegan population, as well as those with religious restrictions on the consumption of pork products. In addition, obtaining DAO enzyme from legumes would be a practice in accordance with the current call for action of the Sustainable Development Goals.

Nowadays, only five published intervention studies (four from the last five years) have tested the clinical efficacy of exogenous DAO supplementation in patients with symptoms of histamine intolerance (Table 5). Although there is some variability, the available research points to the effectiveness of DAO supplements in reducing the appearance and intensity of symptoms. However, it is difficult to compare the different studies, since they differ in the design, the enzyme dosage, the intervention time

and the measurement of efficacy outcomes. Komericki et al., Manzotti et al. and Schnedl et al. assayed the efficacy of DAO supplementation in patients with diverse symptoms associated with histamine intolerance (gastrointestinal, cardiovascular, respiratory and dermatological and/or neurological complaints) [84,108,109]. All three studies reported an important improvement in the intensity or frequency of symptoms, although they involved a small study population (14, 28 and 39 patients) and/or a reduced intervention time (from two to four weeks). Moreover, Schnedl et al. also evaluated the changes in plasmatic DAO activity, reporting a slight increase in 61% of patients during the intervention, which the authors linked to a possible improvement in the integrity of the intestinal mucosa due to the supplementation [109].

**Table 5.** Studies on the efficacy of DAO enzyme supplementation for the treatment of symptoms of histamine intolerance.

Design	Number of Patients and Symptoms	Duration of DAO Supplementation	Efficacy Outcomes	Reference
Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover provocation study using histamine-containing and histamine-free tea in combination with DAO capsules or placebo	39 patients with histamine intolerance (headache and gastrointestinal and skin complaints)	-	Statistically significant reduction of histamine-associated symptoms compared to placebo	[108]
Retrospective study with evaluation of the clinical response to DAO supplementation	14 patients with diagnosis of histamine intolerance (headache and gastrointestinal, cardiovascular, respiratory and skin complaints)	2 weeks	Reduction of at least one of the reported symptoms in 93% of patients	[84]
Double-blind, placebo-controlled, crossover study	20 patients with chronic spontaneous urticaria	1 month	Significant reduction of 7-Day Urticaria Activity Score (UAS-7) and slight significant reduction of daily antihistamine dose	[144]
Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial	100 patients with episodic migraine and serum DAO deficit	1 month	Significant decrease in the duration of migraine attacks and decrease in triptans intake	[110]
Open-label interventional pilot study	28 patients with histamine intolerance (gastrointestinal, cardiovascular, respiratory and skin complaints) and reduced serum DAO values	1 month of intervention and 1 month of follow-up	Significant improvement in frequency and intensity of all symptoms. 61% of patients showed slightly increase in serum DAO values. During the follow-up period (without DAO supplementation), the symptoms sum scores increased and DAO levels decreased.	[109]

The clinical trials developed by Yacoub et al. and Izquierdo-Casas et al. were focused on a single disorder related to histamine intolerance (chronic spontaneous urticaria and migraine, respectively) [110,144]. Yacoub et al. considered 20 patients with chronic spontaneous urticaria who showed a significant reduction in the severity of the complaint according to the Urticaria Activity Score (UAS-7) [144]. Regarding migraines, the randomized double-blind clinical trial conducted by Izquierdo et al. considered a larger number of patients (100 patients) and obtained a statistically significant decrease in the duration of pain attacks with no recorded adverse side effects [110]. However,

the authors did not find statistical differences when considering other research outputs, such as the frequency and intensity of pain.

Overall, despite the promising results, more ambitious clinical studies with a rigorous experimental design, longer treatment periods and properly sized samples are essential to establish the clinical efficacy of this treatment.

## 6. Conclusions and Perspectives

Histamine intolerance is currently a clinical entity of increasing interest, which can appear due to the intake of histamine from foods, mainly caused by a deficiency of the DAO enzyme at the intestinal level. Novel knowledge and studies of histamine intolerance have helped clarify many of the uncertainties that were classically associated with histamine intoxication. Etiologically, various SNPs have been identified in the gene encoding the DAO enzyme related to lower enzyme activity. Moreover, certain inflammatory bowel diseases that limit enzyme secretion or some DAO-inhibiting drugs have also been identified as possible causes of DAO deficiency. This intolerance manifests through a plethora of nonspecific gastrointestinal and extraintestinal symptoms.

The diagnosis of histamine intolerance is usually performed after ruling out allergic symptoms and by the presence of at least two clinical manifestations and their improvement or remission after following a low-histamine diet. Various complementary tests are currently being proposed to improve the diagnosis of this intolerance based, among others, on determining the DAO activity in blood or intestinal biopsy samples or on identifying genetic or metabolic urinary markers by noninvasive techniques.

The clinical management is carried out mainly through the follow-up of a low-histamine diet, although there is no consensus on the list of foods to be excluded. Even so, there are different clinical studies that show the efficacy of this dietary intervention in improving the quality of life of patients with symptoms of histamine intolerance. Oral supplementation with exogenous DAO enzyme from porcine kidney is also being used to enhance the intestinal capacity to degrade dietary histamine. Although few works have assayed the clinical efficacy of this preventive treatment, promising results have been obtained so far. Research is currently also being made to identify new sources of DAO enzyme, especially of plant origin, due to its higher catalytic capacity and other potential productive and commercial advantages.

In this context, it is necessary to keep promoting the multidisciplinary study of this disorder, both from basic (i.e., analytical chemistry, food science, physiology and biochemistry) and clinically applied research, meant to increase the scientific base and the currently available diagnostic and treatment strategies for histamine intolerance.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** Sònia Sánchez-Pérez is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APIF2018).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* **2011**, *9*, 1–93. [[CrossRef](#)]
2. Windaus, A.; Vogt, W. Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1907**, *40*, 3691–3695. [[CrossRef](#)]
3. Comas-Basté, O.; Luz Latorre-Moratalla, M.; Sánchez-Pérez, S.; Teresa Veciana-Nogués, M.; del Carmen Vidal-Carou, M. Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance. In *Biogenic Amines*; Proestos, C., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019.
4. Dale, H.H.; Laidlaw, P.P. The physiological action of  $\beta$ -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* **1910**, *41*, 318–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5. Tansey, E.M. The wellcome physiological research laboratories 1894–1904: The home office, pharmaceutical firms, and animal experiments. *Med. Hist.* **1989**, *33*, 1–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Riley, J.F. Histamine and Sir Henry Dale. *Br. Med. J.* **1965**, *1*, 1488–1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Panula, P.; Chazot, P.L.; Cowart, M.; Gutzmer, R.; Leurs, R.; Liu, W.L.S.; Stark, H.; Thurmond, R.L.; Haas, H.L. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 601–655. [[CrossRef](#)]
8. Vlieg-Boerstra, B.J.; van der Heide, S.; Oude Elberink, J.N.G.; Kluin-Nelemans, J.C.; Dubois, A.E.J. Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods: What is the evidence? *Neth. J. Med.* **2005**, *63*, 244–249.
9. Russo, P.; Spano, G.; Arena, M.P.; Capozzi, V.; Fiocco, D.; Grieco, F.; Beneduce, L. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food. *Curr Res. Technol. Edu. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* **2010**, 1087–1095.
10. Maintz, L.; Novak, N. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1185–1196. [[CrossRef](#)]
11. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Bernacchia, R.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *145*, 379–385. [[CrossRef](#)]
12. Worm, J.; Falkenberg, K.; Olesen, J. Histamine and migraine revisited: Mechanisms and possible drug targets. *J. Headache Pain* **2019**, *20*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kovacova-Hanuszkova, E.; Buday, T.; Gavliakova, S.; Plevkova, J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* **2015**, *43*, 498–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Elmore, B.O.; Bollinger, J.A.; Dooley, D.M. Human kidney diamine oxidase: Heterologous expression, purification, and characterization. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7*, 565–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; Houen, G. Mapping of the binding sites of human diamine oxidase (DAO) monoclonal antibodies. *Inflamm. Res.* **2018**, *67*, 245–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Finney, J.; Moon, H.J.; Ronnebaum, T.; Lantz, M.; Mure, M. Human copper-dependent amine oxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *546*, 19–32. [[CrossRef](#)]
17. Boehm, T.; Pils, S.; Gludovacz, E.; Szoelloesi, H.; Petroczi, K.; Majdic, O.; Quaroni, A.; Borth, N.; Valent, P.; Jilma, B. Quantification of human diamine oxidase. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 444–451. [[CrossRef](#)]
18. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; Houen, G. Mapping of the binding sites of human histamine N-methyltransferase (HNMT) monoclonal antibodies. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 1021–1029. [[CrossRef](#)]
19. Schwelberger, H.G. Histamine intolerance: Overestimated or underestimated? *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 51–52. [[CrossRef](#)]
20. Jarisch, R.; Wantke, F.; Raithel, M.; Hemmer, W. Histamine and biogenic amines. In *Histamine Intolerance: Histamine and Seasickness*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 3–43. ISBN 9783642554476.
21. Gludovacz, E.; Maresch, D.; De Carvalho, L.L.; Puxbaum, V.; Baier, L.J.; Sützl, L.; Guédez, G.; Grünwald-Gruber, C.; Ulm, B.; Pils, S.; et al. Oligomannosidic glycans at asn-110 are essential for secretion of human diamine oxidase. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 1070–1087. [[CrossRef](#)]
22. Elsenhans, B.; Hunder, G.; Strugala, G.; Schümann, K. Longitudinal pattern of enzymatic and absorptive functions in the small intestine of rats after short-term exposure to dietary cadmium chloride. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *36*, 341–346. [[CrossRef](#)]
23. McGrath, A.P.; Hilmer, K.M.; Collyer, C.A.; Shepard, E.M.; Elmore, B.O.; Brown, D.E.; Dooley, D.M.; Guss, J.M. Structure and inhibition of human diamine oxidase. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9810–9822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boehm, T.; Reiter, B.; Ristl, R.; Petroczi, K.; Sperr, W.; Stimpfl, T.; Valent, P.; Jilma, B. Massive release of the histamine-degrading enzyme diamine oxidase during severe anaphylaxis in mastocytosis patients. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 583–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Maršavelski, A.; Petrović, D.; Bauer, P.; Vianello, R.; Kamerlin, S.C.L. Empirical Valence Bond Simulations Suggest a Direct Hydride Transfer Mechanism for Human Diamine Oxidase. *ACS Omega* **2018**, *3*, 3665–3674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Smolinska, S.; Jutel, M.; Cramer, R.; O'Mahony, L. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* **2014**, *69*, 273–281. [[CrossRef](#)]
27. Sjaastad, Ö.V. Potentiation by aminoguanidine of the sensitivity of sheep to histamine given by mouth. Effect of aminoguanidine on the urinary excretion of endogenous histamine. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **1967**, *52*, 319–330. [[CrossRef](#)]

28. Sattler, J.; Häfner, D.; Klotter, H.J.; Lorenz, W.; Wagner, P.K. Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions* **1988**, *23*, 361–365. [[CrossRef](#)]
29. Klocker, J.; Mätzler, S.A.; Huetz, G.-N.; Drasche, A.; Kolbitsch, C.; Schwelberger, H.G. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm. Res.* **2005**, *54* (Suppl. 1), S54–S57. [[CrossRef](#)]
30. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations); WHO (World Health Organization). *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting Report*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.
31. Bover-Cid, S.; Latorre-Moratalla, M.L.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Processing Contaminants: Biogenic Amines. In *Encyclopedia of Food Safety*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 2, pp. 381–391. ISBN 9780123786128.
32. Vidal-Carou, M.C.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S. Biogenic Amines: Risks and Control. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*; Toldrá, F., Hui, Y., Astiasarán, I., Sebranek, J., Talon, R., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Oxford, UK, 2014; pp. 413–428. ISBN 9781118522653.
33. Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M.S. Biogenic amines in foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26*, 1463–1474. [[CrossRef](#)]
34. Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G.; Özogul, F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
35. Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S.; Bosch-Fusté, J.; Vidal-Carou, M.C. Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L. curvatus* CTC273. *Food Microbiol.* **2012**, *29*, 43–48. [[CrossRef](#)]
36. Linares, D.M.; Martín, M.C.; Ladero, V.; Alvarez, M.A.; Fernández, M. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 691–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Visciano, P.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ladero, V.; Calles-Enriquez, M.; Fernandez, M.; Alvarez, M.A. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 145–156. [[CrossRef](#)]
39. Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S.; Talon, R.; Aymerich, T.; Garriga, M.; Zanardi, E.; Ianieri, A.; Fraqueza, M.J.; Elias, M.; Drosinos, E.H.; et al. Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *J. Food Prot.* **2010**, *73*, 524–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Naila, A.; Flint, S.; Fletcher, G.; Bremer, P.; Meerdink, G. Control of biogenic amines in food - Existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, R139–R150. [[CrossRef](#)]
41. Latorre-Moratalla, M.L.; Comas-Basté, O.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M.C. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *99*, 78–85. [[CrossRef](#)]
42. European Food Safety Authority (EFSA). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. Technical report. *EFSA Support. Publ.* **2017**, *14*, 1–37. [[CrossRef](#)]
43. Taylor, S.L. *Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese, and Other Foods*; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 1985; Volume 46.
44. Legroux, R.; Levaditi, J.; Segond, L. Methode de mise en evidence de l’histamine dans les aliments causes d’intoxications collectives a l’aide de l’inoculation au cobaye. *C. R. Biol.* **1946**, *140*, 863–864.
45. Legroux, R.; Levaditi, J.; Boudin, G.; Bovet, D. Intoxications histaminiques collectives consecutives a l’ingestion de thon frais. *Presse Med.* **1964**, *54*, 545–546.
46. Colombo, F.M.; Cattaneo, P.; Confalonieri, E.; Bernardi, C. Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1131–1151. [[CrossRef](#)]
47. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations); WHO (World Health Organization). *Histamine in Salmonids. Joint FAO/WHO Literature Review*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018; ISBN 9789241514439.
48. Lehane, L.; Olley, J. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *58*, 1–37. [[CrossRef](#)]
49. Hungerford, J.M. Scombroid poisoning: A review. *Toxicol* **2010**, *56*, 231–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **2018**, *16*. [[CrossRef](#)]
51. Van Gelderen, C.E.M.; Savelkoul, T.J.F.; van Ginkel, L.A.; van Dokkum, W. The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers. *Clin. Toxicol.* **1992**, *30*, 585–596. [[CrossRef](#)]
52. Motil, K.J.; Scrimshaw, N.S. The role of exogenous histamine in scombroid poisoning. *Toxicol. Lett.* **1979**, *3*, 219–223. [[CrossRef](#)]
53. Johansson, S.G.O.; Bieber, T.; Dahl, R.; Friedmann, P.S.; Lanier, B.Q.; Lockey, R.F.; Motala, C.; Ortega Martell, J.A.; Platts-Mills, T.A.E.; Ring, J.; et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 832–836. [[CrossRef](#)]
54. Tuck, C.J.; Biesiekierski, J.R.; Schmid-Grendelmeier, P.; Pohl, D. Food Intolerances. *Nutrients* **2019**, *11*, 1684. [[CrossRef](#)]
55. Amon, U.; Bangha, E.; Küster, T.; Menne, A.; Vollrath, I.B.; Gibbs, B.F. Enteral histaminosis: Clinical implications. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 291–295. [[CrossRef](#)]
56. Best, C.H. The disappearance of histamine from autolysing lung tissue. *J. Physiol.* **1929**, *67*, 256–263. [[CrossRef](#)]
57. Mondovi, B.; Rotilio, G.; Finazzi, A.; Scioscia-Santoro, A. Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochem. J.* **1964**, *91*, 408–415. [[CrossRef](#)]
58. Wolvekamp, M.C.J.; de Bruin, R.W.F. Diamine Oxidase: An Overview of Historical, Biochemical and Functional Aspects. *Dig. Dis.* **1994**, *12*, 2–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Schwelberger, H.G.; Bodner, E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1997**, *1340*, 152–164. [[CrossRef](#)]
60. Herbert, T. Diamine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1950**, *188*, 125–136.
61. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Rabell-González, J.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *125*, 109201. [[CrossRef](#)]
62. Schnedl, W.J.; Lackner, S.; Enko, D.; Schenk, M.; Holasek, S.J.; Mangge, H. Evaluation of symptoms and symptom combinations in histamine intolerance. *Intest. Res.* **2019**, *17*, 427–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Pinzer, T.C.; Tietz, E.; Waldmann, E.; Schink, M.; Neurath, M.F.; Zopf, Y. Circadian profiling reveals higher histamine plasma levels and lower diamine oxidase serum activities in 24% of patients with suspected histamine intolerance compared to food allergy and controls. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *73*, 949–957. [[CrossRef](#)]
64. Schnedl, W.J.; Lackner, S.; Enko, D.; Schenk, M.; Mangge, H.; Holasek, S.J. Non-celiac gluten sensitivity: People without celiac disease avoiding gluten—Is it due to histamine intolerance? *Inflamm. Res.* **2018**, *67*, 279–284. [[CrossRef](#)]
65. Aschenbach, J.R.; Honscha, K.U.; Von Vietinghoff, V.; Gäbel, G. Bioelimination of histamine in epithelia of the porcine proximal colon of pigs. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 269–276. [[CrossRef](#)]
66. Izquierdo-Casas, J.; Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Lorente-Gascón, M.; Duelo, A.; Vidal-Carou, M.C.; Soler-Singla, L. Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. *J. Physiol. Biochem.* **2018**, *74*, 93–99. [[CrossRef](#)]
67. García-Martín, E.; Ayuso, P.; Martínez, C.; Blanca, M.; Agúndez, J.A.G. Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* **2009**, *10*, 867–883. [[CrossRef](#)]
68. Kucher, A.N. Association of Polymorphic Variants of Key Histamine Metabolism Genes and Histamine Receptor Genes with Multifactorial Diseases. *Russ. J. Genet.* **2019**, *55*, 794–814. [[CrossRef](#)]
69. Ayuso, P.; García-Martín, E.; Martínez, C.; Agúndez, J.A.G. Genetic variability of human diamine oxidase: Occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. *Pharmacogenet. Genom.* **2007**, *17*, 687–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. García-Martín, E.; García-Menaya, J.; Sánchez, B.; Martínez, C.; Rosendo, R.; Agúndez, J.A.G. Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **2007**, *37*, 1175–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kaur, S.; Ali, A.; Siahbalaee, Y.; Ahmad, U.; Nargis, F.; Pandey, A.K.; Singh, B. Association of Diamine oxidase (DAO) variants with the risk for migraine from North Indian population. *Meta Gene* **2019**. [[CrossRef](#)]

72. Maintz, L.; Yu, C.F.; Rodríguez, E.; Baurecht, H.; Bieber, T.; Illig, T.; Weidinger, S.; Novak, N. Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *66*, 893–902. [[CrossRef](#)]
73. Enko, D.; Meinitzer, A.; Mangge, H.; Kriegshäuser, G.; Halwachs-Baumann, G.; Reininghaus, E.Z.; Bengesser, S.A.; Schnedl, W.J. Concomitant Prevalence of Low Serum Diamine Oxidase Activity and Carbohydrate Malabsorption. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *2016*, 1–4. [[CrossRef](#)]
74. Mondovi, B.; Fogel, W.A.; Federico, R.; Calinescu, C.; Mateescu, M.A.; Rosa, A.C.; Masini, E. Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2013**, *7*, 20–34. [[CrossRef](#)]
75. Fukudome, I.; Kobayashi, M.; Dabanaka, K.; Maeda, H.; Okamoto, K.; Okabayashi, T.; Baba, R.; Kumagai, N.; Oba, K.; Fujita, M.; et al. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. *Med. Mol. Morphol.* **2014**, *47*, 100–107. [[CrossRef](#)]
76. Miyoshi, J.; Miyamoto, H.; Goji, T.; Taniguchi, T.; Tomonari, T.; Sogabe, M.; Kimura, T.; Kitamura, S.; Okamoto, K.; Fujino, Y.; et al. Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anticancer drugs. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 1582–1590. [[CrossRef](#)]
77. Schnedl, W.J.; Enko, D. Considering histamine in functional gastrointestinal disorders. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *1–8*. [[CrossRef](#)]
78. Griauzdaitė, K.; Maselis, K.; Žvirblienė, A.; Vaitkus, A.; Jančiauskas, D.; Banaitytė-Baleišienė, I.; Kupčinskas, L.; Rastenyte, D. Associations between migraine, celiac disease, non-celiac gluten sensitivity and activity of diamine oxidase. *Med. Hypotheses* **2020**, *142*, 109738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Enko, D.; Kriegshäuser, G.; Halwachs-Baumann, G.; Mangge, H.; Schnedl, W.J. Serum diamine oxidase activity is associated with lactose malabsorption phenotypic variation. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 50–53. [[CrossRef](#)]
80. Leitner, R.; Zoernpfening, E.; Missbichler, A. Evaluation of the inhibitory effect of various drugs/active ingredients on the activity of human diamine oxidase in vitro. *Clin. Transl. Allergy* **2014**, *4*, P23. [[CrossRef](#)]
81. Sattler, J.; Hesterberg, R.; Lorenz, W.; Schmidt, U.; Crombach, M.; Stahlknecht, C.D. Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in an intensive care unit: Relevance for clinical side effects? *Agents Actions* **1985**, *16*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Sánchez-Pérez, S.; Comas-Basté, O.; Rabell-González, J.; Veciana-Nogués, M.; Latorre-Moratalla, M.; Vidal-Carou, M. Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods* **2018**, *7*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Mušič, E.; Korošec, P.; Šilar, M.; Adamič, K.; Košnik, M.; Rijavec, M. Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2013**, *125*, 239–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Manzotti, G.; Breda, D.; Di Gioacchino, M.; Burastero, S.E. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2016**, *29*, 105–111. [[CrossRef](#)]
85. Steinbrecher, I.; Jarisch, R. Histamin und kopfschmerz. *Allergologie* **2005**, *28*, 85–91. [[CrossRef](#)]
86. Maintz, L.; Benfadal, S.; Allam, J.P.; Hagemann, T.; Fimmers, R.; Novak, N. Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 1106–1112. [[CrossRef](#)]
87. Wagner, N.; Dirk, D.; Peveling-Oberhag, A.; Reese, I.; Rady-Pizarro, U.; Mitzel, H.; Staubach, P. A Popular myth—low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria—fact or fiction? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31*, 650–655. [[CrossRef](#)]
88. Worm, M.; Fiedler, E.M.; Dölle, S.; Schink, T.; Hemmer, W.; Jarisch, R.; Zuberbier, T. Exogenous histamine aggravates eczema in a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **2009**, *89*, 52–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Cho, H.J.; Cho, S.I.; Kim, H.O.; Park, C.W.; Lee, C.H. Lack of association of plasma histamine with diamine oxidase in chronic idiopathic urticaria. *Ann. Dermatol.* **2013**, *25*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Honzawa, Y.; Nakase, H.; Matsuura, M.; Chiba, T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 23–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

91. Rosell-Camps, A.; Zibetti, S.; Pérez-Esteban, G.; Vila-Vidal, M.; Ramis, L.F.; García-Teresa-García, E.; Ferrés-Ramis, L.; García-Teresa-García, E. Intolerancia a la histamina como causa de síntomas digestivos crónicos en pacientes pediátricos. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2013**, *105*, 201–207. [[CrossRef](#)]
92. Hoffmann, K.M.; Gruber, E.; Deutschmann, A.; Jahnel, J.; Hauer, A.C. Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Arch. Dis. Child.* **2013**, *98*, 832–833. [[CrossRef](#)]
93. Klocker, J.; Perkmann, R.; Klein-Weigel, P.; Mörsdorf, G.; Drasche, A.; Klingler, A.; Fraedrich, G.; Schwelberger, H.G. Continuous administration of heparin in patients with deep vein thrombosis can increase plasma levels of diamine oxidase. *Vascul. Pharmacol.* **2004**, *40*, 293–300. [[CrossRef](#)]
94. García-Martín, E.; Ayuso, P.; Martínez, C.; Agúndez, J.A.G. Improved analytical sensitivity reveals the occurrence of gender-related variability in diamine oxidase enzyme activity in healthy individuals. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 1339–1341. [[CrossRef](#)]
95. Hamada, Y.; Shinohara, Y.; Yano, M.; Yamamoto, M.; Yoshio, M.; Satake, K.; Toda, A.; Hirai, M.; Usami, M. Effect of the menstrual cycle on serum diamine oxidase levels in healthy women. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 99–102. [[CrossRef](#)]
96. Jarisch, R. *Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit*, 2nd ed.; Thieme: Stuttgart, Germany, 2004.
97. Reese, I.; Ballmer-Weber, B.; Beyer, K.; Fuchs, T.; Kleine-Tebbe, J.; Klimek, L.; Lepp, U.; Niggemann, B.; Saloga, J.; Schäfer, C.; et al. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Asso. *Allergo J. Int.* **2017**, *26*, 72–79. [[CrossRef](#)]
98. Töndury, B.; Wüthrich, B.; Schmid-Grendelmeier, P.; Seifert, B.; Ballmer-Weber, B. Histamine intolerance: Is the determination of diamine oxidase activity in the serum useful in routine clinical practice? *Allergologie* **2008**, *31*, 350–356. [[CrossRef](#)]
99. Kofler, H.; Aberer, W.; Deibl, M.; Hawranek, T.; Klein, G.; Reider, N.; Fellner, N. Diamine oxidase (DAO) serum activity: Not a useful marker for diagnosis of histamine intolerance. *Allergologie* **2009**, *32*, 105–109. [[CrossRef](#)]
100. Schnoor, H.S.J.; Mosbech, H.; Skov, P.S.; Poulsen, L.K.; Jensen, B.M. Diamine oxidase determination in serum. Low assay reproducibility and misclassification of healthy subjects. *Allergo J.* **2013**, *22*, 108–111. [[CrossRef](#)]
101. Kofler, L.; Ulmer, H.; Kofler, H. Histamine 50-Skin-Prick Test: A Tool to Diagnose Histamine Intolerance. *ISRN Allergy* **2011**, *2011*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Wagner, A.; Buczyłko, K.; Zielińska-Bliźniewska, H.; Wagner, W. Impaired resolution of wheals in the skin prick test and low diamine oxidase blood level in allergic patients. *Postep. Dermatol. i Alergol.* **2019**, *36*, 538–543. [[CrossRef](#)]
103. Lessof, M.H.; Gant, V.; Hinuma, K.; Murphy, G.M.; Dowling, R.H. Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity. *Clin. Exp. Allergy* **1990**, *20*, 373–376. [[CrossRef](#)]
104. Raithel, M.; Küfner, M.; Ulrich, P.; Hahn, E.G. The Involvement of the Histamine Degradation Pathway by Diamine Oxidase in Manifest Gastrointestinal Allergies. In *Proceedings of the Inflammation Research*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1999; Volume 48, pp. 75–76.
105. Kuefner, M.A.; Schwelberger, H.G.; Weidenhiller, M.; Hahn, E.G.; Raithel, M. Both catabolic pathways of histamine via histamine-N-methyl-transferase and diamine oxidase are diminished in the colonic mucosa of patients with food allergy. *Inflamm. Res.* **2004**, *53*. [[CrossRef](#)]
106. Kuefner, M.A.; Schwelberger, H.G.; Hahn, E.G.; Raithel, M. Decreased histamine catabolism in the colonic mucosa of patients with colonic adenoma. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 436–442. [[CrossRef](#)]
107. Wöhrl, S.; Hemmer, W.; Focke, M.; Rappersberger, K.; Jarisch, R. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.* **2004**, *25*, 305–311.
108. Komericki, P.; Klein, G.; Reider, N.; Hawranek, T.; Strimitzer, T.; Lang, R.; Kranzelbinder, B.; Aberer, W. Histamine intolerance: Lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: A randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2011**, *123*, 15–20. [[CrossRef](#)]
109. Schnedl, W.J.; Schenk, M.; Lackner, S.; Enko, D.; Mangge, H.; Forster, F. Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Sci. Biotechnol.* **2019**, *28*, 1779–1784. [[CrossRef](#)]

110. Izquierdo-Casas, J.; Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Lorente-Gascón, M.; Duelo, A.; Soler-Singla, L.; Vidal-Carou, M.C. Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 152–158. [CrossRef]
111. San Mauro Martin, I.; Brachero, S.; Garicano Vilar, E. Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* **2016**, *44*, 475–483. [CrossRef] [PubMed]
112. Son, J.H.; Chung, B.Y.; Kim, H.O.; Park, C.W. A histamine-free diet is helpful for treatment of adult patients with chronic spontaneous urticaria. *Ann. Dermatol.* **2018**, *30*, 164–172. [CrossRef] [PubMed]
113. Joneja, J.M.V.; Carmona-Silva, C. Outcome of a histamine-restricted diet based on chart audit. *J. Nutr. Environ. Med.* **2001**, *11*, 249–262. [CrossRef]
114. Pediatrii, K.; Alergologii Dziecięcej, N.; Kacik, J. Objawy pseudoalergii a zaburzenia metabolizmu histaminy Symptoms of pseudoallergy and histamine metabolism disorders. *Pediatr. i Med. Rodz.* **2016**, *12*, 234–241. [CrossRef]
115. Böhn, L.; Störsrud, S.; Törnblom, H.; Bengtsson, U.; Simré, M. Self-Reported Food-Related Gastrointestinal Symptoms in IBS Are Common and Associated With More Severe Symptoms and Reduced Quality of Life. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 634–641. [CrossRef] [PubMed]
116. Lefèvre, S.; Astier, C.; Kanny, G. Histamine intolerance or false food allergy with histamine mechanism. *Rev. Fr. Allergol.* **2017**, *57*, 24–34. [CrossRef]
117. Ede, G. Histamine intolerance: Why freshness matters? *J. Evol. Health* **2017**, *2*, 11. [CrossRef]
118. Swiss Interest Group Histamine Intolerance (SIGHI) Therapy of Histamine Intolerance. Available online: <https://www.histaminintoleranz.ch/en/introduction.html> (accessed on 22 July 2020).
119. Vidal-Carou, M.C.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.L. Intolerancia a la Histamina e Hipersensibilidad a Aditivos Alimentarios. In *Nutrición y dietética clínica*; Salas-Salvadó, J., Bonadai Sanjaume, A., Trallero-Casañas, R., Saló i Solà, M.E., Burgos-Peláez, R., Eds.; Elsevier: Barcelona, Spain, 2019; pp. 535–540. ISBN 9788491133032.
120. Cornillier, H.; Giraudeau, B.; Samimi, M.; Munck, S.; Hacard, F.; Jonville-Bera, A.P.; Jegou, M.H.; D’acremont, G.; Pham, B.N.; Chosidow, O.; et al. Effect of diet in chronic spontaneous urticaria: A systematic review. *Acta Derm. Venereol.* **2019**, *99*, 127–132. [CrossRef]
121. Zuberbier, T.; Aberer, W.; Asero, R.; Abdul Latiff, A.H.; Baker, D.; Ballmer-Weber, B.; Bernstein, J.A.; Bindslev-Jensen, C.; Brzoza, Z.; Buense Bedrikow, R.; et al. The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *73*, 1393–1414. [CrossRef]
122. Guida, B.; De Martino, C.D.; De Martino, S.D.; Tritto, G.; Patella, V.; Trio, R.; D’Agostino, C.; Pecoraro, P.; D’Agostino, L. Histamine plasma levels and elimination diet in chronic idiopathic urticaria. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, *54*, 155–158. [CrossRef] [PubMed]
123. Lackner, S.; Malcher, V.; Enko, D.; Mangge, H.; Holasek, S.J.; Schnedl, W.J. Histamine-reduced diet and increase of serum diamine oxidase correlating to diet compliance in histamine intolerance. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *73*, 102–104. [CrossRef] [PubMed]
124. Wantke, F.; Götz, M.; Jarisch, R. Histamine-free diet: Treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clin. Exp. Allergy Exp. Allergy* **1993**, *23*, 982–985. [CrossRef] [PubMed]
125. Park, C.; Park, C.; Choi, J.; Lee, H. A study of elimination diet for chronic idiopathic urticaria in Korea. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, *58*, AB38. [CrossRef]
126. Siebenhaar, F.; Melde, A.; Magerl, M.; Zuberbier, T.; Church, M.K.; Maurer, M. Histamine intolerance in patients with chronic spontaneous urticaria. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2016**, *30*, 1774–1777. [CrossRef]
127. Parker, A.M.; Watson, R.R. Lactose Intolerance. In *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 205–211. ISBN 9780128097632.
128. European Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470 of 20 December 2017 establishing the Union list of novel foods in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union* **2017**, *L 351*, 72–201.
129. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 7595–7602. [CrossRef]

130. Kettner, L.; Seitzl, I.; Fischer, L. Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. *J. Food Sci.* **2020**, *85*. [[CrossRef](#)]
131. Mondovì, B.; Rotilio, G.; Costa, M.T.; Finazzi-Agrò, A.; Chiancone, E.; Hansen, R.E.; Beinert, H. Diamine oxidase from pig kidney. Improved purification and properties. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1160–1167.
132. Floris, G.; Fadda, M.B.; Pellegrini, M.; Corda, M.; Agro', A.F. Purification of pig kidney diamine oxidase by gel-exclusion chromatography. *FEBS Lett.* **1976**, *72*, 179–181. [[CrossRef](#)]
133. Bouvrette, P.; Male, K.B.; Luong, J.H.T.; Gibbs, B.F. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 32–38. [[CrossRef](#)]
134. Kivirand, K.; Rinke, T. Biosensors for Biogenic Amines: The Present State of Art Mini-Review. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 2821–2833. [[CrossRef](#)]
135. Blemur, L.; Le, T.C.; Marcocci, L.; Pietrangeli, P.; Mateescu, M.A. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2016**, *63*, 344–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Pietrangeli, P.; Federico, R.; Mondovì, B.; Morpurgo, L. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 997–1004. [[CrossRef](#)]
137. Masini, E.; Bani, D.; Marzocca, C.; Mateescu, M.A.; Mannaioni, P.F.; Federico, R.; Mondovì, B. Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders: A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Sci. World J.* **2007**, *7*, 888–902. [[CrossRef](#)]
138. Yang, R.; Chen, H.; Gu, Z. Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia faba* L.) during Germination. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11616–11620. [[CrossRef](#)]
139. Torrigiani, P.; Serafini-Fracassini, D.; Fara, A. Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 69–73. [[CrossRef](#)]
140. Joseph, P.; Srivastava, S.K. Photoregulation of Diamine Oxidase from Pea Seedlings. *J. Plant Physiol.* **1995**, *146*, 108–114. [[CrossRef](#)]
141. Laurenzi, M.; Tipping, A.J.; Marcus, S.E.; Knox, J.P.; Federico, R.; Angelini, R.; McPherson, M.J. Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* **2001**, *214*, 37–45. [[CrossRef](#)]
142. Tavladoraki, P.; Cona, A.; Angelini, R. Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
143. Kivirand, K.; Rinke, T. Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* **2007**, *56*, 164–171.
144. Yacoub, M.R.; Ramirez, G.A.; Berti, A.; Mercurio, G.; Breda, D.; Saporiti, N.; Burastero, S.; Dagna, L.; Colombo, G. Diamine Oxidase Supplementation in Chronic Spontaneous Urticaria: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2018**, *176*, 268–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# 7 CONCLUSIONS





## 7. CONCLUSIONS

1. El risc de patir efectes adversos per a la salut, estimat mitjançant un anàlisi probabilístic, pel consum d'aliments susceptibles de contenir histamina és molt baix per a persones sanes però incrementa en el cas de la població amb intolerància a la histamina. Un 0,7% de la població espanyola podria desencadenar símptomes d'aquesta intolerància només pel consum de derivats carnis fermentats crus curats.
2. L'elevada prevalença de dèficit de DAO plasmàtic en població amb migranya, atenent que les cefalees són un dels símptomes més freqüents de la intolerància a la histamina, recolza la relació etiològica amb el dèficit de DAO.
3. El mètode UHPLC amb derivatització post-columna en línia i detecció fluorimètrica (FL) desenvolupat permet la determinació ràpida i inequívoca d'histamina i metilhistamina en orina. Aquesta tècnica esdevé una eina d'interès per a la valoració d'aquests analits com a potencials biomarcadors no invasius de la intolerància a la histamina.
4. El perfil d'excreció urinari d'histamina i metilhistamina dels individus amb símptomes de la intolerància a la histamina és diferent al de la població control. Els individus intolerants presentaren una reducció significativa dels nivells de metilhistamina en orina.
5. El mètode UHPLC-FL desenvolupat i validat per a la determinació de l'activitat DAO *in vitro* es basa en la quantificació directa de la degradació de la histamina al llarg del temps de reacció i és aplicable a diferents matrius alimentàries. Aquest mètode presenta l'elevada sensibilitat necessària per aplicar-se a matrius complexes no purificades de diferent naturalesa i alhora garanteix la no-interferència de la catalasa en la determinació. La posterior optimització del mètode aplicant una detecció per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) esdevé avantatjosa en comparació amb les tècniques existents fins al moment perquè evita la necessitat de derivatitzar el substrat amino.

6. L'activitat DAO de l'extracte de ronyó porcí ha augmentat notablement mitjançant millores en el procés d'obtenció d'aquest extracte proteic. S'ha optimitzat l'extracció i la higienització de l'extracte i s'ha comprovat l'estabilitat de la seva activitat enzimàtica durant almenys 24 mesos d'emmagatzematge en refrigeració. Amb aquestes millores s'ha contribuït al desenvolupament d'un nou complement d'enzim DAO amb una major activitat enzimàtica
7. S'ha demostrat el potencial dels brots de certs llegums de consum humà com a nova font d'enzim DAO d'origen vegetal, amb una activitat enzimàtica comparable o, fins i tot, superior a la de l'enzim d'origen animal. Les condicions òptimes per obtenir la màxima activitat DAO foren la germinació durant sis dies en l'obscuritat i la seva posterior liofilització. S'ha comprovat l'estabilitat de l'activitat DAO del producte liofilitzat durant almenys 12 mesos en congelació, mentre que s'observen pèrdues progressives si s'emmagatzema en refrigeració o a temperatura ambient.

# 8 CONTINUÏTAT

DE LA RECERCA DE LA TESI DOCTORAL



## 8. CONTINUÏTAT DE LA RECERCA DE LA TESI DOCTORAL

Més enllà de la consecució dels objectius plantejats, la recerca realitzada en el marc d'aquesta tesi doctoral ha obert diverses línies de treball que serà interessant poder plantejar en un futur per seguir aprofundint en el coneixement de la intolerància a la histamina i les seves diferents estratègies de diagnòstic i tractament.

Així, per caracteritzar adequadament els individus amb intolerància a la histamina és necessari disposar d'un perfil metabòlic més ampli, més enllà de la histamina i la metilhistamina, capaç d'aportar informació rellevant sobre l'estat global del sistema de degradació enzimàtica d'aquest compost. Cal, per tant, treballar en una aproximació a través d'UHPLC-MS/MS que permeti la determinació simultània de la histamina i tots els seus metabòlits en orina i així millorar els resultats obtinguts fins al moment. Per altra banda, també existeix el repte d'explorar la significació clínica d'altres proves de potencial interès diagnòstic, com és el cas de la mesura de l'activitat DAO en plasma o en biòpsia intestinal, així com la seva relació amb les diferents manifestacions clíniques de la intolerància a la histamina.

El mètode analític desenvolupat per a la determinació de l'activitat DAO pot emprar-se per tal d'identificar altres fonts alternatives d'enzim DAO, així com per seguir recopilant informació sobre la influència de diferents factors tecnològics sobre l'activitat enzimàtica de matrius de naturalesa diversa. A més, existeix la possibilitat d'adaptar aquesta tècnica a mostres biològiques, com ara plasma o intestí, fet que podria esdevenir d'interès des d'un punt de vista del diagnòstic.

En l'àmbit de la suplementació amb enzim DAO exogen, els resultats obtinguts motiven el desenvolupament de nous projectes de recerca encaminats a millorar l'estabilitat de l'activitat enzimàtica de l'extracte de ronyó porcí i dels brots de llegum liofilitzats. En aquest sentit, poden explorar-se diverses estratègies, com és el cas de l'aplicació de determinats processos d'extracció selectiva de l'enzim i/o l'addició d'excipients en la formulació galènica del complement. En el cas de l'enzim DAO d'origen vegetal, queda pendent explorar la influència d'altres factors

en l'activitat DAO dels brots (e.g. composició del sòl, addició de sals o fitohormones), així com ampliar l'*screening* a altres parts de la morfologia dels propis llegums o, fins i tot, a altres espècies botàniques de consum humà.

Finalment, és convenient el disseny de futurs estudis clínics amb un rigorós i ambiciós disseny experimental per tal de poder establir l'eficàcia clínica de la suplementació amb enzim DAO en el tractament dels símptomes de la intolerància a la histamina.

# 9 COROL·LARI





## 9. COROL·LARI

La revisió bibliogràfica realitzada en el marc d'aquesta tesi doctoral ha fet palès l'interès creixent envers la intolerància a la histamina, un desordre escassament descrit fins a principis del segle XXI. Actualment, però, és constant el degoteig de publicacions científiques en l'àmbit de la medicina, la nutrició o la ciència i tecnologia dels aliments que van sumant de forma progressiva evidència en favor d'aquesta intolerància. No obstant això, la novetat, complexitat i, fins i tot, controvèrsia que envolten el dèficit de DAO fan que resti pendent l'establiment d'una definició de consens capaç de descriure fisiopatològicament la intolerància a la histamina. Fruit de la revisió i recerca realitzada, i amb la voluntat d'aportar un granet de sorra en la descripció i coneixement de la intolerància a la histamina, es proposa la següent aproximació:

La intolerància a la histamina, també anomenada síndrome d'histaminosi enteral o sensibilitat a la histamina alimentària, és una reacció adversa no tòxica provocada pel consum d'aliments que manca de mediació immunològica. És un trastorn associat a la ingesta d'aliments que contenen histamina i s'origina per una reducció en la capacitat de l'organisme humà per metabolitzar-la, provocant la seva acumulació en plasma i la subseqüent aparició d'un ampli ventall de símptomes gastrointestinals i extra-intestinals inespecífics (i.e. distensió abdominal, diarrea, dolor abdominal, restrenyiment, cefalees, taquicàrdia, rinorrea, rinitis, pruíja i envermelliment cutani, entre d'altres). Un dèficit en l'enzim DAO intestinal, que pot tenir un origen genètic, patològic o farmacològic, sembla ser el principal factor determinant pel qual la població intolerant és sensible a dosis d'histamina normalment tolerades per a la població sana.



# 10 BIBLIOGRAFIA



## 10. BIBLIOGRAFIA

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* **2011**, *9*, 1–93, doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
2. Agència de Salut Pública de Catalunya (Generalitat de Catalunya) *Memòria anual sobre la situació de la seguretat alimentària a Catalunya, 2017*; Barcelona, 2019;
3. Vlieg-Boerstra, B.J.; van der Heide, S.; Oude Elberink, J.N.G.; Kluin-Nelemans, J.C.; Dubois, A.E.J. Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods: what is the evidence? *Neth. J. Med.* **2005**, *63*, 244–9.
4. Esposito, F.; Montuori, P.; Schettino, M.; Velotto, S.; Stasi, T.; Romano, R.; Cirillo, T. Level of Biogenic Amines in Red and White Wines, Dietary Exposure, and Histamine-Mediated Symptoms upon Wine Ingestion. *Molecules* **2019**, *24*, 3629, doi:10.3390/molecules24193629.
5. Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G.; Özogul, F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01218.
6. Simons, F.E.R.; Simons, K.J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 1139–1150, doi:10.1016/j.jaci.2011.09.005.
7. Windaus, A.; Vogt, W. Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1907**, *40*, 3691–3695, doi:10.1002/cber.190704003164.
8. Alstadhaug, K.B. Histamine in migraine and brain. *Headache* **2014**, *54*, 246–259, doi:10.1111/head.12293.
9. Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M.S. Biogenic amines in foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26*, 1463–1474, doi:10.1007/s10068-017-0239-3.
10. Bover-Cid, S.; Latorre-Moratalla, M.L.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Processing Contaminants: Biogenic Amines. In *Encyclopedia of Food Safety*; Motarjemi, Y., Moy, G., Todd, E., Eds.; Academic Press, 2014; Vol. 2, pp. 381–391 ISBN 9780123786128.
11. Russo, P.; Spano, G.; Arena, M.P.; Capozzi, V.; Fiocco, D.; Grieco, F.; Beneduce, L. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food. *Curr Res. Technol. Edu. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol* **2010**, 1087–1095.
12. Abee, T.; Wouters, J.A. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *50*, 65–91, doi:10.1016/s0168-1605(99)00078-1.
13. Vidal-Carou, M.C.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S.

- Biogenic Amines: Risks and Control. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*; Toldrà, F., Hui, Y., Astiasarán, I., Sebranek, J., Talon, R., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Oxford, 2014; pp. 413–428 ISBN 9781118522653.
14. Linares, D.M.; Martín, M.C.; Ladero, V.; Alvarez, M.A.; Fernández, M. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 691–703, doi:10.1080/10408398.2011.582813.
  15. Hungerford, J.M. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* **2010**, *56*, 231–243, doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.006.
  16. Biji, K.B.; Ravishankar, C.N.; Venkateswarlu, R.; Mohan, C.O.; Gopal, T.K.S. Biogenic amines in seafood: a review. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2210–2218, doi:10.1007/s13197-016-2224-x.
  17. Ladero, V.; Calles-Enriquez, M.; Fernandez, M.; A. Alvarez, M. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 145–156, doi:10.2174/157340110791233256.
  18. Visciano, P.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fmicb.2014.00500.
  19. Naila, A.; Flint, S.; Fletcher, G.; Bremer, P.; Meerdink, G. Control of biogenic amines in food - Existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, R139–R150, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x.
  20. Sánchez-Pérez, S.; Comas-Basté, O.; Rabell-González, J.; Veciana-Nogués, M.; Latorre-Moratalla, M.; Vidal-Carou, M. Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods* **2018**, *7*, 205, doi:10.3390/foods7120205.
  21. Chong, C.Y.; Bakar, F.A.; Abdul Rahman, R.; Bakar, J.; Mahyudin, N.A. The effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Res. J.* **2011**, *18*, 867–876.
  22. Kovacova-Hanuszkova, E.; Buday, T.; Gavliakova, S.; Plevkova, J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **2015**, *43*, 498–506, doi:10.1016/j.aller.2015.05.001.
  23. Naila, A.; Flint, S.; Fletcher, G.C.; Bremer, P.J.; Meerdink, G. Histamine stability in Rihaakuru at -80, 4 and 30 °C. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1226–1229, doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.066.
  24. Jiang, Q.-Q.; Dai, Z.-Y.; Zhou, T.; Wu, J.-J.; Bu, J.-Z.; Zheng, T.-L. Histamine production and bacterial growth in mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) during storage. *J. Food Biochem.* **2013**, *37*, 246–253, doi:10.1111/jfbc.12021.
  25. Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C.

- Control of biogenic amines in fermented sausages: Role of starter cultures. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–9, doi:10.3389/fmicb.2012.00169.
26. Latorre-Moratalla, M.L.; Comas-Basté, O.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M.C. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *99*, 78–85, doi:10.1016/j.fct.2016.11.011.
  27. Alvarez, M.A.; Moreno-Arribas, M.V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *39*, 146–155, doi:10.1016/j.tifs.2014.07.007.
  28. Dale, H.H.; Laidlaw, P.P. The physiological action of  $\beta$ -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* **1910**, *41*, 318–344, doi:10.1113/jphysiol.1910.sp001406.
  29. Tansey, E.M. The wellcome physiological research laboratories 1894-1904: The home office, pharmaceutical firms, and animal experiments. *Med. Hist.* **1989**, *33*, 1–41, doi:10.1017/S0025727300048894.
  30. Riley, J.F. Histamine and Sir Henry Dale. *Br. Med. J.* **1965**, *1*, 1488–1490, doi:10.1136/bmj.1.5448.1488.
  31. Panula, P.; Chazot, P.L.; Cowart, M.; Gutzmer, R.; Leurs, R.; Liu, W.L.S.; Stark, H.; Thurmond, R.L.; Haas, H.L. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 601–655, doi:10.1124/pr.114.010249.
  32. Worm, J.; Falkenberg, K.; Olesen, J. Histamine and migraine revisited: mechanisms and possible drug targets. *J. Headache Pain* **2019**, *20*, 30, doi:10.1186/s10194-019-0984-1.
  33. Maintz, L.; Novak, N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* **2007**, *85*, 1185–1196, doi:10.1093/ajcn/85.5.1185.
  34. Maintz, L.; Schwarzer, V.; Bieber, T.; van der Ven, K.; Novak, N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: A critical review. *Hum. Reprod. Update* **2008**, *14*, 485–495, doi:10.1093/humupd/dmn014.
  35. Jarisch, R. *Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit*; Thieme, Ed.; 2nd ed.; Stuttgart, 2004;
  36. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; Houen, G. Mapping of the binding sites of human histamine N-methyltransferase (HNMT) monoclonal antibodies. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 1021–1029, doi:10.1007/s00011-017-1086-7.
  37. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report*; World Health Organization:



Rome, 2013;

38. Elmore, B.O.; Bollinger, J.A.; Dooley, D.M. Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7*, 565–79, doi:10.1007/s00775-001-0331-1.
39. Gludovacz, E.; Maresch, D.; Bonta, M.; Szöllösi, H.; Furtmüller, P.G.; Weik, R.; Altmann, F.; Limbeck, A.; Borth, N.; Jilma, B.; et al. Characterization of recombinant human diamine oxidase (rhDAO) produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. *J. Biotechnol.* **2016**, *227*, 120–130, doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.002.
40. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; Houen, G. Mapping of the binding sites of human diamine oxidase (DAO) monoclonal antibodies. *Inflamm. Res.* **2018**, *67*, 245–253, doi:10.1007/s00011-017-1118-3.
41. Finney, J.; Moon, H.J.; Ronnebaum, T.; Lantz, M.; Mure, M. Human copper-dependent amine oxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *546*, 19–32, doi:10.1016/j.abb.2013.12.022.
42. García-Martín, E.; Ayuso, P.; Martínez, C.; Blanca, M.; Agúndez, J.A.G. Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* **2009**, *10*, 867–883, doi:10.2217/pgs.09.26.
43. Boehm, T.; Pils, S.; Gludovacz, E.; Szoelloesi, H.; Petroczi, K.; Majdic, O.; Quaroni, A.; Borth, N.; Valent, P.; Jilma, B. Quantification of human diamine oxidase. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 444–451, doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.12.011.
44. McGrath, A.P.; Hilmer, K.M.; Collyer, C.A.; Shepard, E.M.; Elmore, B.O.; Brown, D.E.; Dooley, D.M.; Guss, J.M. Structure and inhibition of human diamine oxidase. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9810–9822, doi:10.1021/bi9014192.
45. Rosell-Camps, A.; Zibetti, S.; Pérez-Esteban, G.; Vila-Vidal, M.; Ramis, L.F.; García-Teresa-García, E.; Ferrés-Ramis, L.; García-Teresa-García, E. Intolerancia a la histamina como causa de síntomas digestivos crónicos en pacientes pediátricos. *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* **2013**, *105*, 201–207, doi:10.4321/S1130-01082013000400004.
46. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Bernacchia, R.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *145*, 379–385, doi:10.1016/j.jpba.2017.06.029.
47. Schwelberger, H.G. Histamine intolerance: Overestimated or underestimated? *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 51–52, doi:10.1007/s00011-009-2004-4.
48. Jarisch, R.; Wantke, F.; Raithel, M.; Hemmer, W. Histamine and biogenic amines. In *Histamine Intolerance: Histamine and Seasickness*; Jarisch, R., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 2015; pp. 3–43 ISBN 9783642554476.

49. Gludovacz, E.; Maresch, D.; De Carvalho, L.L.; Puxbaum, V.; Baier, L.J.; Sützl, L.; Guédez, G.; Grünwald-Gruber, C.; Ulm, B.; Pils, S.; et al. Oligomannosidic glycans at asn-110 are essential for secretion of human diamine oxidase. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 1070–1087, doi:10.1074/jbc.M117.814244.
50. Boehm, T.; Reiter, B.; Ristl, R.; Petroczi, K.; Sperr, W.; Stimpfl, T.; Valent, P.; Jilma, B. Massive release of the histamine-degrading enzyme diamine oxidase during severe anaphylaxis in mastocytosis patients. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 583–593, doi:10.1111/all.13663.
51. Schwelberger, H.G.; Feurle, J.; Houen, G. New tools for studying old questions: Antibodies for human diamine oxidase. *J. Neural Transm.* **2013**, *120*, 1019–1026, doi:10.1007/s00702-012-0936-2.
52. Elsenhans, B.; Hunder, G.; Strugala, G.; Schümann, K. Longitudinal pattern of enzymatic and absorptive functions in the small intestine of rats after short-term exposure to dietary cadmium chloride. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *36*, 341–346, doi:10.1007/s002449900480.
53. Klocker, J.; Perkmann, R.; Klein-Weigel, P.; Mörsdorf, G.; Drasche, A.; Klingler, A.; Fraedrich, G.; Schwelberger, H.G. Continuous administration of heparin in patients with deep vein thrombosis can increase plasma levels of diamine oxidase. *Vascul. Pharmacol.* **2004**, *40*, 293–300, doi:10.1016/j.vph.2004.02.002.
54. Taylor, S.L.; Eitenmiller, R.R. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* **1986**, *17*, 91–128, doi:10.3109/10408448609023767.
55. Maršavelski, A.; Petrović, D.; Bauer, P.; Vianello, R.; Kamerlin, S.C.L. Empirical Valence Bond Simulations Suggest a Direct Hydride Transfer Mechanism for Human Diamine Oxidase. *ACS Omega* **2018**, *3*, 3665–3674, doi:10.1021/acsomega.8b00346.
56. Smolinska, S.; Jutel, M.; Cramer, R.; O'Mahony, L. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* **2014**, *69*, 273–281, doi:10.1111/all.12330.
57. Schink, M.; Konturek, P.C.; Tietz, E.; Dieterich, W.; Pinzer, T.C.; Wirtz, S.; Neurath, M.F.; Zopf, Y. Microbial patterns in patients with histamine intolerance. *J. Physiol. Pharmacol.* **2018**, *69*, 579–593, doi:10.26402/jpp.2018.4.09.
58. Sjaastad, Ö. V. Potentiation by aminoguanidine of the sensitivity of sheep to histamine given by mouth. Effect of aminoguanidine on the urinary excretion of endogenous histamine. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **1967**, *52*, 319–330, doi:10.1113/expphysiol.1967.sp001918.
59. Sattler, J.; Häfner, D.; Klotter, H.J.; Lorenz, W.; Wagner, P.K. Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions* **1988**, *23*, 361–365,

doi:10.1007/BF02142588.

60. Klocker, J.; Mätzler, S.A.; Huetz, G.N.; Drasche, A.; Kolbitsch, C.; Schwelberger, H.G. Synthesis, metabolism and release of histamine. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm. Res.* **2005**, *54*, S54–S57, doi:10.1007/s00011-004-0425-7.
61. European Food Safety Authority (EFSA) Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. Technical report. *EFSA Support. Publ.* **2017**, *14*, 1–37, doi:10.2903/sp.efsa.2017.en-1301.
62. Mariné Font, A. *Les Amines biògenes en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l'alimentació*; Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques: Barcelona, 2005; ISBN 8472837882.
63. Taylor, S.L. *Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods*; World Health Organization Press: Geneve, 1985; Vol. 46;.
64. Legroux, R.; Levaditi, J.; Segond, L. Methode de mise en evidence de l'histamine dans les aliments causes d'intoxications collectives a l'aide de l'inoculation au cobaye. *C. R. Biol.* **1946**, *140*, 863–864.
65. Legroux, R.; Levaditi, J.; Boudin, G.; Bovet, D. Intoxications histaminiques collectives consecutives a l'ingestion de thon frais. *Presse Med.* **1964**, *54*, 545–546.
66. Colombo, F.M.; Cattaneo, P.; Confalonieri, E.; Bernardi, C. Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1131–1151, doi:10.1080/10408398.2016.1242476.
67. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) *Histamine in Salmonids. Joint FAO/WHO literature review*; World Health Organization: Geneva, 2018; ISBN 9789241514439.
68. Lehane, L.; Olley, J. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *58*, 1–37, doi:10.1016/S0168-1605(00)00296-8.
69. Comas-Basté, O.; Luz Latorre-Moratalla, M.; Sánchez-Pérez, S.; Teresa Veciana-Nogués, M.; del Carmen Vidal-Carou, M. Histamine and Other Biogenic Amines in Food. From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance. In *Biogenic Amines*; Proestos, C., Ed.; IntechOpen, 2019.
70. Feng, C.; Teuber, S.; Gershwin, M.E. Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2016**, *50*, 64–69, doi:10.1007/s12016-015-8467-x.
71. Ricci, G.; Zannoni, M.; Cigolini, D.; Caroselli, C.; Codogni, R.; Caruso, B.; Bonello, E.; Rocca, G.P. Tryptase serum level as a possible indicator of scombroid syndrome. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 203–206, doi:10.3109/15563651003649177.

72. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017*; Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2018; Vol. 16;.
73. 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, doi:10.1016/j.foodcont.2008.07.011.
74. Van Gelderen, C.E.M.; Savelkoul, T.J.F.; van Ginkel, L.A.; van Dokkum, W. The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers. *Clin. Toxicol.* **1992**, *30*, 585–596, doi:10.3109/15563659209017944.
75. Lüthy, J.; Schlatter, C. Biogene Amine in Lebensmitteln: Zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Phenylethylamin auf den Menschen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1983**, *177*, 439–443, doi:10.1007/BF01409672.
76. Motil, K.J.; Scrimshaw, N.S. The role of exogenous histamine in scombroid poisoning. *Toxicol. Lett.* **1979**, *3*, 219–223, doi:10.1016/0378-4274(79)90037-7.
77. Wöhrle, S.; Hemmer, W.; Focke, M.; Rappersberger, K.; Jarisch, R. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.* **2004**, *25*, 305–311.
78. Wantke, F.; Gotz, M.; Jarisch, R. The red wine provocation test: Intolerance to histamine as a model for food intolerance. *Allergy Proc.* **1994**, *15*, 27–32, doi:10.2500/108854194778816599.
79. European Commission Regulation 2073/2005/EC. Microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2005**, *338*, 1–26.
80. Food and Drug Administration *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*; 4th ed.; U.S. Department of Health and Human Services: Gainesville, 2020;
81. Taylor, S.L.; Stratton, J.E.; Nordlee, J.A. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): An allergy-like intoxication. *Clin. Toxicol.* **1989**, *27*, 225–240, doi:10.3109/15563658908994420.
82. Blakesley, M.L. Scombroid poisoning: prompt resolution of symptoms with cimetidine. *Ann. Emerg. Med.* **1983**, *12*, 104–6, doi:10.1016/s0196-0644(83)80386-2.
83. European Parliament; Council of the European Union *Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food saf*; 2002; Vol. 31;.

84. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) *Working Principles for Risk Analysis for Food Safety for Application by Governments (Codex Alimentarius)*; 1st ed.; FAO/WHO: Rome, 2007; ISBN 978-92-5-005911-2.
85. Johansson, S.G.O.; Bieber, T.; Dahl, R.; Friedmann, P.S.; Lanier, B.Q.; Lockey, R.F.; Motala, C.; Ortega Martell, J.A.; Platts-Mills, T.A.E.; Ring, J.; et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 832–836, doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591.
86. Tuck, C.J.; Biesiekierski, J.R.; Schmid-Grendelmeier, P.; Pohl, D. Food Intolerances. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11071684.
87. Lomer, M.C.E. Review article: the aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2015**, *41*, 262–275, doi:10.1111/apt.13041.
88. Schnedl, W.J.; Enko, D. Considering histamine in functional gastrointestinal disorders. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *1–8*, doi:10.1080/10408398.2020.1791049.
89. Amon, U.; Bangha, E.; Küster, T.; Menne, A.; Vollrath, I.B.; Gibbs, B.F. Enteral histaminosis: Clinical implications. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 291–295, doi:10.1007/s000110050462.
90. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 7595–7602, doi:10.1007/s00216-019-02178-2.
91. Schnedl, W.J.; Lackner, S.; Enko, D.; Schenk, M.; Holasek, S.J.; Mangge, H. Evaluation of symptoms and symptom combinations in histamine intolerance. *Intest. Res.* **2019**, *17*, 427–433, doi:10.5217/ir.2018.00152.
92. Pinzer, T.C.; Tietz, E.; Waldmann, E.; Schink, M.; Neurath, M.F.; Zopf, Y. Circadian profiling reveals higher histamine plasma levels and lower diamine oxidase serum activities in 24% of patients with suspected histamine intolerance compared to food allergy and controls. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *73*, 949–957, doi:10.1111/all.13361.
93. Aschenbach, J.R.; Honscha, K.U.; Von Vietinghoff, V.; Gäbel, G. Bioelimination of histamine in epithelia of the porcine proximal colon of pigs. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 269–276, doi:10.1007/s00011-008-8091-9.
94. Guida, B.; De Martino, C.D.; De Martino, S.D.; Tritto, G.; Patella, V.; Trio, R.; D'Agostino, C.; Pecoraro, P.; D'Agostino, L. Histamine plasma levels and elimination diet in chronic idiopathic urticaria. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, *54*, 155–8.

95. Enko, D.; Meinitzer, A.; Mangge, H.; Kriegshaüser, G.; Halwachs-Baumann, G.; Reininghaus, E.Z.; Bengesser, S.A.; Schnedl, W.J. Concomitant Prevalence of Low Serum Diamine Oxidase Activity and Carbohydrate Malabsorption. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *2016*, 1–4, doi:10.1155/2016/4893501.
96. Hamada, Y.; Shinohara, Y.; Yano, M.; Yamamoto, M.; Yoshio, M.; Satake, K.; Toda, A.; Hirai, M.; Usami, M. Effect of the menstrual cycle on serum diamine oxidase levels in healthy women. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 99–102, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.10.013.
97. Honzawa, Y.; Nakase, H.; Matsuura, M.; Chiba, T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 23–25, doi:10.1002/ibd.21588.
98. Kacik, J.; Wróblewska, B.; Lewicki, S.; Zdanowski, R.; Kalicki, B. Serum diamine oxidase in pseudoallergy in the pediatric population. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1039*, 35–44, doi:10.1007/5584\_2017\_81.
99. Kamei, H.; Hachisuka, T.; Nakao, M.; Takagi, K. Quick recovery of serum diamine oxidase activity in patients undergoing total gastrectomy by oral enteral nutrition. *Am. J. Surg.* **2005**, *189*, 38–43, doi:10.1016/j.amjsurg.2004.03.015.
100. Komericki, P.; Klein, G.; Reider, N.; Hawranek, T.; Strimitzer, T.; Lang, R.; Kranzelbinder, B.; Aberer, W. Histamine intolerance: Lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: A randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2011**, *123*, 15–20, doi:10.1007/s00508-010-1506-y.
101. Maintz, L.; Benfadal, S.; Allam, J.P.; Hagemann, T.; Fimmers, R.; Novak, N. Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 1106–1112, doi:10.1016/j.jaci.2005.11.041.
102. Miyoshi, J.; Miyamoto, H.; Goji, T.; Taniguchi, T.; Tomonari, T.; Sogabe, M.; Kimura, T.; Kitamura, S.; Okamoto, K.; Fujino, Y.; et al. Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anticancer drugs. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 1582–1590, doi:10.1111/jgh.13004.
103. Miyoshi, M.; Ueno, M.; Matsuo, M.; Hamada, Y.; Takahashi, M.; Yamamoto, M.; Yamamoto, I.; Mikajiri, R.; Tabuchi, S.; Wakida, K.; et al. Effect of dietary fatty acid and micronutrient intake/energy ratio on serum diamine oxidase activity in healthy women. *Nutrition* **2017**, *39–40*, 67–70, doi:10.1016/j.nut.2017.03.004.
104. Mušič, E.; Korošec, P.; Šilar, M.; Adamič, K.; Košnik, M.; Rijavec, M. Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2013**, *125*, 239–243, doi:10.1007/s00508-013-0354-y.

105. Töndury, B.; Wüthrich, B.; Schmid-Grendelmeier, P.; Seifert, B.; Ballmer-Weber, B. Histamine intolerance: Is the determination of diamine oxidase activity in the serum useful in routine clinical practice? *Allergologie* **2008**, *31*, 350–356.
106. Kucher, A.N. Association of Polymorphic Variants of Key Histamine Metabolism Genes and Histamine Receptor Genes with Multifactorial Diseases. *Russ. J. Genet.* **2019**, *55*, 794–814, doi:10.1134/S102279541907010X.
107. Ayuso, P.; García-Martín, E.; Martínez, C.; Agúndez, J.A.G. Genetic variability of human diamine oxidase: Occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, *17*, 687–693, doi:10.1097/FPC.0b013e328012b8e4.
108. García-Martín, E.; García-Menaya, J.; Sánchez, B.; Martínez, C.; Rosendo, R.; Agúndez, J.A.G. Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **2007**, *37*, 1175–82, doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02769.x.
109. Maintz, L.; Yu, C.F.; Rodríguez, E.; Baurecht, H.; Bieber, T.; Illig, T.; Weidinger, S.; Novak, N. Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *66*, 893–902, doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02548.x.
110. Kaur, S.; Ali, A.; Siahbalaee, Y.; Ahmad, U.; Nargis, F.; Pandey, A.K.; Singh, B. Association of Diamine oxidase (DAO) variants with the risk for migraine from North Indian population. *Meta Gene* **2019**, doi:10.1016/j.mgene.2019.100619.
111. Mondovi, B.; Fogel, W.A.; Federico, R.; Calinescu, C.; Mateescu, M.A.; Rosa, A.C.; Masini, E. Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2013**, *7*, 20–34.
112. Fukudome, I.; Kobayashi, M.; Dabanaka, K.; Maeda, H.; Okamoto, K.; Okabayashi, T.; Baba, R.; Kumagai, N.; Oba, K.; Fujita, M.; et al. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. *Med. Mol. Morphol.* **2014**, *47*, 100–107, doi:10.1007/s00795-013-0055-7.
113. Enko, D.; Kriegshäuser, G.; Halwachs-Baumann, G.; Mangge, H.; Schnedl, W.J. Serum diamine oxidase activity is associated with lactose malabsorption phenotypic variation. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 50–53, doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.08.019.
114. Schnedl, W.J.; Lackner, S.; Enko, D.; Schenk, M.; Mangge, H.; Holasek, S.J. Non-celiac gluten sensitivity: people without celiac disease avoiding gluten—is it due to histamine intolerance? *Inflamm. Res.* **2018**, *67*, 279–284, doi:10.1007/s00011-017-1117-4.
115. Griaudzaitė, K.; Maselis, K.; Žvirblienė, A.; Vaitkus, A.; Jančiauskas, D.; Banaitytė-

- Baleišienė, I.; Kupčinskas, L.; Rastenytė, D. Associations between migraine, celiac disease, non-celiac gluten sensitivity and activity of diamine oxidase. *Med. Hypotheses* **2020**, *142*, 109738, doi:10.1016/j.mehy.2020.109738.
116. Leitner, R.; Zoernpfenning, E.; Missbichler, A. Evaluation of the inhibitory effect of various drugs / active ingredients on the activity of human diamine oxidase in vitro. *Clin. Transl. Allergy* **2014**, *4*, P23, doi:10.1186/2045-7022-4-s3-p23.
117. Sattler, J.; Hesterberg, R.; Lorenz, W.; Schmidt, U.; Crombach, M.; Stahlknecht, C.-D. Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in an intensive care unit: Relevance for clinical side effects? *Agents Actions* **1985**, *16*, 91–94, doi:10.1007/BF01983109.
118. Rasmussen, B. Epidemiology of headache. *Cephalalgia* **2001**, *21*, 774–777, doi:10.1111/j.1468-2982.2001.00248.x.
119. Schmidt, W.U.; Sattler, J.; Hesterberg, R.; Röher, H.D.; Zoedler, T.; Sitter, H.; Lorenz, W. Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment? *Agents Actions* **1990**, *30*, 267–70, doi:10.1007/bf01969057.
120. Manzotti, G.; Breda, D.; Di Gioacchino, M.; Burastero, S.E. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2016**, *29*, 105–111, doi:10.1177/0394632015617170.
121. Wagner, N.; Dirk, D.; Peveling-Oberhag, A.; Reese, I.; Rady-Pizarro, U.; Mitzel, H.; Staubach, P. A Popular myth – low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria – fact or fiction? *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2017**, *31*, 650–655, doi:10.1111/jdv.13966.
122. Worm, M.; Fiedler, E.M.; Dölle, S.; Schink, T.; Hemmer, W.; Jarisch, R.; Zuberbier, T. Exogenous histamine aggravates eczema in a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **2009**, *89*, 52–56, doi:10.2340/00015555-0565.
123. Cho, H.J.; Cho, S.I.; Kim, H.O.; Park, C.W.; Lee, C.H. Lack of association of plasma histamine with diamine oxidase in chronic idiopathic urticaria. *Ann. Dermatol.* **2013**, *25*, 189–195, doi:10.5021/ad.2013.25.2.189.
124. Hoffmann, K.M.; Gruber, E.; Deutschmann, A.; Jahnel, J.; Hauer, A.C. Histamine intolerance in children with chronic abdominal pain. *Arch. Dis. Child.* **2013**, *98*, 832–833, doi:10.1136/archdischild-2013-305024.
125. Steinbrecher, I.; Jarisch, R. Histamin und kopfschmerz. *Allergologie* **2005**, *28*, 85–91, doi:10.5414/alp28085.
126. Reese, I.; Ballmer-Weber, B.; Beyer, K.; Fuchs, T.; Kleine-Tebbe, J.; Klimek, L.; Lepp, U.; Niggemann, B.; Saloga, J.; Schäfer, C.; et al. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the German



- Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Asso. *Allergo J Int* **2017**, *26*, 72–79, doi:10.1007/s40629-017-0011-5.
127. Schuppan, D.; Gisbert-Schuppan, K. Lactose, Fructose and Histamine Intolerance: Over-Diagnosed and Overrated. In *Wheat Syndromes*; Schuppan, D., Gisbert-Schuppan, K., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp. 93–96 ISBN 9783030190231.
  128. Kofler, H.; Aberer, W.; Deibl, M.; Hawranek, T.; Klein, G.; N, R.; N, F.; Aberer, W.; Deibl, M.; Hawranek, T.; et al. Diamine oxidase (DAO) serum activity: Not a useful marker for diagnosis of histamine intolerance. *Allergologie* **2009**, *32*, 105–109, doi:10.5414/ALP32105.
  129. Schnoor, H.S.J.; Mosbech, H.; Skov, P.S.; Poulsen, L.K.; Jensen, B.M. Diamine oxidase determination in serum. Low assay reproducibility and misclassification of healthy subjects. *Allergo J.* **2013**, *22*, 108–111, doi:10.1007/s15007-013-0063-x.
  130. Kuefner, M.A.; Schwelberger, H.G.; Hahn, E.G.; Raithel, M. Decreased histamine catabolism in the colonic mucosa of patients with colonic adenoma. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 436–442, doi:10.1007/s10620-007-9861-x.
  131. Kuefner, M.A.; Schwelberger, H.G.; Weidenhiller, M.; Hahn, E.G.; Raithel, M. Both catabolic pathways of histamine via histamine-N-methyl-transferase and diamine oxidase are diminished in the colonic mucosa of patients with food allergy. *Inflamm. Res.* **2004**, *53*, doi:10.1007/s00011-003-0314-5.
  132. Lessof, M.H.; Gant V.; Hinuma, K.; Murphy, G.M.; Dowling, R.H. Recurrent urticaria and reduced diamine oxidase activity. *Clin. Exp. Allergy* **1990**, *20*, 373–376, doi:10.1111/j.1365-2222.1990.tb02796.x.
  133. Raithel, M.; Küfner, M.; Ulrich, P.; Hahn, E.G. The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 75–76, doi:10.1007/s000110050414.
  134. Kuefner, M.A.; Schwelberger, H.G.; Ulrich, P.; Hahn, E.G.; Raithel, M. Total histamine degradation capacity (THDC) as an important biological marker of histamine metabolism in human colonic mucosa. *Inflamm. Res.* **2002**, *51*, 87–88, doi:10.1007/pl00022461.
  135. Kofler, L.; Ulmer, H.; Kofler, H. Histamine 50-Skin-Prick Test: A Tool to Diagnose Histamine Intolerance. *ISRN Allergy* **2011**, *2011*, 1–5, doi:10.5402/2011/353045.
  136. Wagner, A.; Buczyłko, K.; Zielińska-Bliźniewska, H.; Wagner, W. Impaired resolution of wheals in the skin prick test and low diamine oxidase blood level in allergic patients. *Postep. Dermatologii i Alergol.* **2019**, *36*, 538–543, doi:10.5114/ada.2019.89504.
  137. Schnedl, W.J.; Schenk, M.; Lackner, S.; Enko, D.; Mangge, H.; Forster, F. Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine

- intolerance. *Food Sci. Biotechnol.* **2019**, *28*, 1779–1784, doi:10.1007/s10068-019-00627-3.
138. Vidal-Carou, M.C.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.L. Intolerancia a la histamina e hipersensibilidad a aditivos alimentarios. In *Nutrición y dietética clínica*; Salas-Salvadó, J., Bonadai Sanjaume, A., Trallero-Casañas, R., Saló i Solà, M.E., Burgos-Peláez, R., Eds.; Elsevier: Barcelona, 2019; pp. 535–540 ISBN 9788491133032.
139. San Mauro Martin, I.; Brachero, S.; Garicano Vilar, E. Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **2016**, *44*, 475–483, doi:10.1016/j.aller.2016.04.015.
140. Schwelberger, H.G.; Bodner, E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1997**, *1340*, 152–164, doi:10.1016/S0167-4838(97)00039-3.
141. Son, J.H.; Chung, B.Y.; Kim, H.O.; Park, C.W. A histamine-free diet is helpful for treatment of adult patients with chronic spontaneous urticaria. *Ann. Dermatol.* **2018**, *30*, 164–172, doi:10.5021/ad.2018.30.2.164.
142. Wantke, F.; M., G.; Jarisch, R. Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clin. Exp. Allergy Exp. Allergy* **1993**, *23*, 982–985, doi:10.1111/j.1365-2222.1993.tb00287.x.
143. Siebenhaar, F.; Melde, A.; Magerl, M.; Zuberbier, T.; Church, M.K.; Maurer, M. Histamine intolerance in patients with chronic spontaneous urticaria. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2016**, *30*, 1774–1777, doi:10.1111/jdv.13778.
144. Lackner, S.; Malcher, V.; Enko, D.; Mangge, H.; Holasek, S.J.; Schnedl, W.J. Histamine-reduced diet and increase of serum diamine oxidase correlating to diet compliance in histamine intolerance. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *73*, 102–104, doi:10.1038/s41430-018-0260-5.
145. Park, C.; Park, C.; Choi, J.; Lee, H. A study of elimination diet for chronic idiopathic urticaria in Korea. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, *58*, AB38, doi:10.1016/j.jaad.2007.10.180.
146. Cornillier, H.; Giraudeau, B.; Samimi, M.; Munck, S.; Hacard, F.; Jonville-Bera, A.P.; Jegou, M.H.; D'acremont, G.; Pham, B.N.; Chosidow, O.; et al. Effect of diet in chronic spontaneous urticaria: A systematic review. *Acta Derm. Venereol.* **2019**, *99*, 127–132, doi:10.2340/00015555-3015.
147. Jaros, J.; Shi, V.Y.; Katta, R. Diet and Chronic Urticaria: Dietary Modification as a Treatment Strategy. *Dermatol. Pract. Concept.* **2020**, *10*, doi:10.5826/DPC.1001A04.
148. Zuberbier, T.; Aberer, W.; Asero, R.; Abdul Latiff, A.H.; Baker, D.; Ballmer-Weber,

- B.; Bernstein, J.A.; Bindslev-Jensen, C.; Brzoza, Z.; Buense Bedrikow, R.; et al. The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *73*, 1393–1414, doi:10.1111/all.13397.
149. Best, C.H. The disappearance of histamine from autolysing lung tissue. *J. Physiol.* **1929**, *67*, 256–263, doi:10.1113/jphysiol.1929.sp002566.
150. Mondovì, B.; Rotilio, G.; Finazzi, A.; Scioscia-Santoro, A. Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochem. J.* **1964**, *91*, 408–415, doi:10.1042/bj0910408.
151. Wolvekamp, M.C.J.; de Bruin, R.W.F. Diamine Oxidase: An Overview of Historical, Biochemical and Functional Aspects. *Dig. Dis.* **1994**, *12*, 2–14, doi:10.1159/000171432.
152. Naila, A.; Flint, S.; Fletcher, G.C.; Bremer, P.J.; Meerdink, G.; Morton, R.H. Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chem.* **2012**, *135*, 2650–2660, doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.022.
153. Herbert, T. Diamine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1950**, *188*, 125–136.
154. Parker, A.M.; Watson, R.R. Lactose Intolerance. In *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*; Watson, R., Collier, R.J., Preedy, V., Eds.; Academic Press, 2017; pp. 205–211 ISBN 9780128097632.
155. European Commission Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470 of 20 December 2017 establishing the Union list of novel foods in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union* **2017**, *L 351*, 72–201.
156. Hiemenz, W.; Stez, P. Process of making histaminase preparations 1942.
157. Mondovì, B.; Rotilio, G.; Costa, M.T.; Finazzi-Agrò, A.; Chiancone, E.; Hansen, R.E.; Beinert, H. Diamine oxidase from pig kidney. Improved purification and properties. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1160–7.
158. Yacoub, M.R.; Ramirez, G.A.; Berti, A.; Mercurio, G.; Breda, D.; Saporiti, N.; Burastero, S.; Dagna, L.; Colombo, G. Diamine Oxidase Supplementation in Chronic Spontaneous Urticaria: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2018**, *176*, 268–271, doi:10.1159/000488142.
159. Izquierdo-Casas, J.; Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Lorente-Gascón, M.; Duelo, A.; Soler-Singla, L.; Vidal-Carou, M.C. Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 152–158, doi:10.1016/j.clnu.2018.01.013.

160. Medina-Remón, A.; Barrionuevo-González, A.; Zamora-Ros, R.; Andres-Lacueva, C.; Estruch, R.; Martínez-González, M.Á.; Díez-Espino, J.; Lamuela-Raventos, R.M. Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *634*, 54–60, doi:10.1016/j.aca.2008.12.012.
161. Barr, D.B.; Wilder, L.C.; Caudill, S.P.; Gonzalez, A.J.; Needham, L.L.; Pirkle, J.L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 192–200, doi:10.1289/ehp.7337.
162. Singh, V.P.; Pathak, V.; Verma, A.K. Fermented meat products: Organoleptic qualities and biogenic amines-A review. *Am. J. Food Technol.* **2012**, *7*, 278–288, doi:10.3923/ajft.2012.278.288.
163. Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *44*, 489–599, doi:10.1080/10408690490489341.
164. Roig-Sagues, A.X.; Hernandez-Herrero, M.; Lopez-Sabater, E.I.; Rodriguez-Jerez, J.J.; Mora-Ventura, M.T. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichon, a Spanish cured sausage. *J. Food Prot.* **1996**, *59*, 516–520, doi:10.4315/0362-028X-59.5.516.
165. Bover-Cid, S.; Hugas, M.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *66*, 185–9, doi:10.1016/s0168-1605(00)00526-2.
166. Suzzi, G.; Gardini, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *88*, 41–54, doi:10.1016/s0168-1605(03)00080-1.
167. Spano, G.; Russo, P.; Lonvaud-Funel, A.; Lucas, P.; Alexandre, H.; Grandvalet, C.; Coton, E.; Coton, M.; Barnavon, L.; Bach, B.; et al. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, S95–S100, doi:10.1038/ejcn.2010.218.
168. Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) *Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (ENIDE)*; 2011;
169. Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) *Encuesta Nacional de Alimentación en población adulta, mayores y embarazadas (ENALIA 2)*; 2015;
170. Kokavec, A. Migraine: A disorder of metabolism? *Med. Hypotheses* **2016**, *97*, 117–130, doi:10.1016/j.mehy.2016.10.029.
171. Selby, G.; Lance, J.W. Observations on 500 cases of migraine and allied vascular headache. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1960**, *23*, 23–32, doi:10.1136/jnnp.23.1.23.

172. Finocchi, C.; Sivori, G. Food as trigger and aggravating factor of migraine. *Neurol. Sci.* **2012**, *33*, 77–80, doi:10.1007/s10072-012-1046-5.
173. Zaeem, Z.; Zhou, L.; Dilli, E. Headaches: a Review of the Role of Dietary Factors. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2016**, *16*, 101, doi:10.1007/s11910-016-0702-1.
174. Kelman, L. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia* **2007**, *27*, 394–402, doi:10.1111/j.1468-2982.2007.01303.x.
175. Carod-Artal, F.J.; Ezpeleta, D.; Martín-Barriga, M.L.; Guerrero, A.L. Triggers, symptoms, and treatment in two populations of migraineurs in Brazil and Spain. A cross-cultural study. *J. Neurol. Sci.* **2011**, *304*, 25–28, doi:10.1016/j.jns.2011.02.027.
176. Hauge, A.W.; Kirchmann, M.; Olesen, J. Trigger factors in migraine with aura. *Cephalalgia* **2010**, *30*, 346–353, doi:10.1111/j.1468-2982.2009.01930.x.
177. Andress-Rothrock, D.; King, W.; Rothrock, J. An analysis of migraine triggers in a clinic-based population. *Headache* **2010**, *50*, 1366–1370, doi:10.1111/j.1526-4610.2010.01753.x.
178. Yuan, H.; Silberstein, S.D. Histamine and Migraine. *Headache* **2018**, *58*, 184–193, doi:10.1111/head.13164.
179. Unger, L. Histamine cephalalgia and its relation to migraine. *Ann. Allergy* **1958**, *16*, 300–305.
180. García-Martín, E.; Martínez, C.; Serrador, M.; Alonso-Navarro, H.; Ayuso, P.; Navacerrada, F.; Agúndez, J.A.G.G.; Jiménez-Jiménez, F.J. Diamine oxidase rs10156191 and rs2052129 variants are associated with the risk for migraine. *Headache* **2015**, *55*, 276–286, doi:10.1111/head.12493.
181. García-Martín, E.; Ayuso, P.; Martínez, C.; Agúndez, J.A.G. Improved analytical sensitivity reveals the occurrence of gender-related variability in diamine oxidase enzyme activity in healthy individuals. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 1339–1341, doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.07.019.
182. Kawanishi, H.; Toyooka, 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. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1132*, 148–56, doi:10.1016/j.chroma.2006.07.086.
183. Oguri, S.; Yoneya, Y. Assay and biological relevance of endogenous histamine and its metabolites: application of microseparation techniques. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *781*, 165–79.
184. Toyooka, T. Separation assay of histamine and its metabolites in biological specimens. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, *22*, 919–30, doi:10.1002/bmc.1027.

185. Itoh, Y.; Oishi, R.; Adachi, N.; Saeki, K. A Highly Sensitive Assay for Histamine Using Ion-Pair HPLC Coupled with Postcolumn Fluorescent Derivatization: Its Application to Biological Specimens. *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 884–889, doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb09339.x.
186. Saito, K.; Horie, M.; Nose, N.; Nakagomi, K.; Nakazawa, H. High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* **1992**, *595*, 163–8.
187. Van Haaster, C.M.; Engels, W.; Lemmens, P.J.; Hornstra, G.; Van der Vusse, G.J. Rapid and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 3-methylhistamine in biological samples using fluorecamine as the derivatizing agent. *J. Chromatogr.* **1993**, *617*, 233–40.
188. Saito, K.; Horie, M.; Nakazawa, H. Determination of urinary excretion of histamine and 1-methylhistamine by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1994**, *654*, 270–5.
189. Kitanaka, N.; Kitanaka, J.; Nishiguchi, M.; Kinoshita, H.; Ouchi, H.; Minami, T.; Hishida, S.; Takemura, M. Decreased histamine-stimulated phosphoinositide hydrolysis in the cerebral cortex of a rat line selectively bred for high alcohol preference. *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 1431–6.
190. von Vietinghoff, V.; Gäbel, G.; Aschenbach, J.R. High-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 1-methylhistamine in biological buffers. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *844*, 335–9, doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.017.
191. Croyal, M.; Dauvilliers, Y.; Labeeuw, O.; Capet, M.; Schwartz, J.-C.; Robert, P. Histamine and tele-methylhistamine quantification in cerebrospinal fluid from narcoleptic subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry with precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* **2011**, *409*, 28–36, doi:10.1016/j.ab.2010.09.045.
192. Zhang, Y.; Tingley, F.D.; Tseng, E.; Tella, M.; Yang, X.; Groeber, E.; Liu, J.; Li, W.; Schmidt, C.J.; 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 (CSF). *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 2023–33, doi:10.1016/j.jchromb.2011.05.030.
193. Vidal-Carou, M.C.; Latorre-Moratalla, M.L.; Bover-Cid, S. Biogenic Amines. In *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*; Nollet, L.M.L., Toldrà, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2011; pp. 399–420 ISBN 9781439848173.
194. Feldman, J.M. Histaminuria From Histamine-Rich Foods. *Arch. Intern. Med.* **1983**, *143*, 2099–2102, doi:10.1001/archinte.1983.00350110085020.

195. Oosting, E.; Keyzer, J.J.; Wolthers, B.G. Correlation between urinary levels of histamine metabolites in 24-hour urine and morning urine samples of man: influence of histamine-rich food. *Agents Actions* **1989**, *27*, 205–7.
196. Keyzer, J.J.; Breukelman, H.; Wolthers, B.G.; van den Heuvel, M.; Kromme, N.; Berg, W.C. Urinary excretion of histamine and some of its metabolites in man: influence of the diet. *Agents Actions* **1984**, *15*, 189–94, doi:10.1007/bf01972348.
197. Van Doormaal, J.J.; Van Der Veer, E.; Van Voorst Vader, P.C.; Kluin, P.M.; Mulder, A.B.; Van Der Heide, S.; Arends, S.; Kluin-Nelemans, J.C.; Oude Elberink, J.N.G.; De Monchy, J.G.R. Tryptase and histamine metabolites as diagnostic indicators of indolent systemic mastocytosis without skin lesions. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *67*, 683–690, doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02809.x.
198. Oosting, E.; Keyzer, J.J.; Wolthers, B.G.; Scholtis, R.J. Age dependent normal values of histamine and histamine metabolites in human urine. *Agents Actions* **1988**, *23*, 307–10, doi:10.1007/bf02142572.
199. Granerus, G.; Olafsson, J.H.; Roupe, G. Studies on histamine metabolism in mastocytosis. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 410–416, doi:10.1111/1523-1747.ep12555351.
200. Di Lorenzo, G.; Pacor, M.L.; Vignola, A.M.; Profita, M.; Esposito-Pellitteri, M.; Biasi, D.; Corrocher, R.; Caruso, C. Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebo-controlled challenge with ASA and food additives in chronic urticaria patients. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *57*, 1180–1186, doi:10.1034/j.1398-9995.2002.23767.x.
201. Granerus, G. Effects of oral histamine, histidine and diet on urinary excretion of histamine, methylhistamine and 1-methyl-4-imidazoleacetic acid in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1968**, *104*, 49–58.
202. Granerus, G.; Wass, U. Urinary excretion of histamine, methylhistamine (1-MeHi) and methylimidazoleacetic acid (MelMAA) in mastocytosis: Comparison of new HPLC methods with other present methods. *Agents Actions* **1984**, *14*, 341–345, doi:10.1007/BF01973823.
203. Bruce, C.; Weatherstone, R.; Seaton, A.W.H. Histamine levels in plasma, blood, and urine in severe asthma, and the effect of corticosteroid treatment. *Thorax* **1976**, *31*, 724–729, doi:10.1136/thx.31.6.724.
204. Oranje, A.P.; Mulder, P.G.H.; Heide, R.; Tank, B.; Riezebos, P.; van Toorenenbergen, A.W. Urinary N-methylhistamine as an indicator of bone marrow involvement in mastocytosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2002**, *27*, 502–6.
205. Keyzer, J.J.; de Monchy, J.G.R.; Van Doormaal, J.J.; Van Voorst Vader, P.C. Improved Diagnosis of Mastocytosis by Measurement of Urinary Histamine Metabolites. *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1603–1605,

- doi:10.1056/NEJM198312293092603.
206. Ruiz, N.; Segarra, A.B.; Lara, L.; Ramírez-Sánchez, M.; Prieto, I. Diet and oxidative status. The dietary pattern and urinary 8-isoprostane in healthy spanish women. *Antioxidants* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8080271.
  207. Butterfield, J.H.; Pongdee, T.; Ravi, A. Urinary Markers of Mast Cell Disease and Their Role in Diagnosis and Management. In *Mastocytosis*; Akin, C., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 55–67 ISBN 978-3-030-27820-5.
  208. Lamale, L.M.; Lutgendorf, S.K.; Zimmerman, M.B.; Kreder, K.J. Interleukin-6, histamine, and methylhistamine as diagnostic markers for interstitial cystitis. *Urology* **2006**, *68*, 702–706, doi:10.1016/j.urology.2006.04.033.
  209. Van Toorenenbergen, A.W.; Oranje, A.P. Comparison of serum tryptase and urine N-methylhistamine in patients with suspected mastocytosis. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *359*, 72–77, doi:10.1016/j.cccn.2005.03.041.
  210. Divekar, R.; Butterfield, J. Urinary 11 $\beta$ -PGF2 $\alpha$  and N-methyl histamine correlate with bone marrow biopsy findings in mast cell disorders. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *70*, 1230–1238, doi:10.1111/all.12668.
  211. Morrow, J.D.; Guzzo, C.; Lazarus, G.; Oates, J.A.; Roberts, L.J. Improved diagnosis of mastocytosis by measurement of the major urinary metabolite of prostaglandin D2. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *104*, 937–940, doi:10.1111/1523-1747.ep12606209.
  212. Guzzo, C.; Lavker, R.; Roberts, L.J.; Fox, K.; Schechter, N.; Lazarus, G. Urticaria Pigmentosa: Systemic Evaluation and Successful Treatment with Topical Steroids. *Arch. Dermatol.* **1991**, *127*, 191–196, doi:10.1001/archderm.1991.01680020059005.
  213. He, G.-H.; Cai, W.-K.; Zhang, J.-B.; Ma, C.-Y.; Yan, F.; Lu, J.; Xu, G.-L. Associations of Polymorphisms in HRH2, HRH3, DAO, and HNMT Genes with Risk of Chronic Heart Failure. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/1208476.
  214. Neufeld, E.; Chayen, R. An evaluation of three methods for the measurement of diamine oxidase (DAO) activity in amniotic fluid. *Anal. Biochem.* **1979**, *96*, 411–418, doi:10.1016/0003-2697(79)90601-8.
  215. Calinescu, C.; Mondovi, B.; Federico, R.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M.A. Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 48–56, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.02.032.
  216. Ahmadifar, S.; Le, T.C.; Marcocci, L.; Pietrangeli, P.; Mateescu, M.A. Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *975*, 78–85, doi:10.1016/j.aca.2017.04.006.



217. Medda, R.; Padiglia, A.; Floris, G. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1–9, doi:10.1016/0031-9422(94)00756-J.
218. Pietrangeli, P.; Federico, R.; Mondovì, B.; Morpurgo, L. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 997–1004, doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.03.014.
219. Jumarie, C.; Séide, M.; Marcocci, L.; Pietrangeli, P.; Mateescu, M.A. Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, *182*, 1171–1181, doi:10.1007/s12010-016-2390-3.
220. Leonida, M.; Belbekhouche, S.; Adams, F.; Bijja, U.K.; Choudhary, D.A.; Kumar, I. Enzyme nanovehicles: Histaminase and catalase delivered in nanoparticulate chitosan. *Int. J. Pharm.* **2019**, *557*, 145–153, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.050.
221. Ebrahimnejad, H.; Gheisari, H.; Khan Nazer, K. Pea Seedling Amine Oxidase Application: an Emerging Antihistamine Strategy in Tuna Fish. *J. Food Process. Technol.* **2013**, *04*, 1–6, doi:10.4172/2157-7110.1000242.
222. Bouvrette, P.; Male, K.B.; Luong, J.H.T.; Gibbs, B.F. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 32–38, doi:10.1016/S0141-0229(96)00064-6.
223. Torre, R.; Costa-Rama, E.; Lopes, P.; Nouws, H.P.A.; Delerue-Matos, C. Amperometric enzyme sensor for the rapid determination of histamine. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 1155–1158, doi:10.1039/c8ay02610f.
224. Federico, R.; Befani, O.; Mondovì, B.; Mulhbacher, J.; Mateescu, M.A. Immobilization of plant histaminase for medical applications. *Inflamm. Res.* **2000**, *49*, 60–61, doi:10.1007/pl00000184.
225. Kivirand, K.; Rincken, T. Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* **2007**, *56*, 164–171.
226. Rinaldi, A.; Floris, G.; Finazzi-Agro, A. Purification and Properties of Diamine Oxidase from Euphorbia Latex. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *127*, 417–422, doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06888.x.
227. Missbichler, A.; Mayer, I. Method for determining diamine oxidase 2011.
228. Masini, E.; Bani, D.; Marzocca, C.; Mateescu, M.A.; Mannaioni, P.F.; Federico, R.; Mondovì, B. Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders: A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Sci. World J.* **2007**, *7*, 888–902, doi:10.1100/tsw.2007.139.
229. Blemur, L.; Le, T.C.; Marcocci, L.; Pietrangeli, P.; Mateescu, M.A. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2016**, *63*, 344–353, doi:10.1002/bab.1369.

230. Wilflingseder, D.; Schwelberger, H.G. Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *737*, 161–6, doi:10.1016/s0378-4347(99)00444-2.
231. Floris, G.; Fadda, M.B.; Pellegrini, M.; Corda, M.; Agrò, A.F. Purification of pig kidney diamine oxidase by gel-exclusion chromatography. *FEBS Lett.* **1976**, *72*, 179–181, doi:10.1016/0014-5793(76)80839-3.
232. Kivirand, K.; Rinke, T. Biosensors for Biogenic Amines: The Present State of Art Mini-Review. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 2821–2833, doi:10.1080/00032719.2011.565445.
233. Kivirand, K.; Sömerik, H.; Oldekop, M.L.; Rebane, R.; Rinke, T. Effect of spermidine and its metabolites on the activity of pea seedlings diamine oxidase and the problems of biosensing of biogenic amines with this enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *82*, 133–137, doi:10.1016/j.enzmictec.2015.09.007.
234. Kettner, L.; Seitzl, I.; Fischer, L. Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. *J. Food Sci.* **2020**, *85*, doi:10.1111/1750-3841.15069.
235. Mondovi, B.; Befani, O.; Gerosa, P.; Mateescu, M.A. Specific temperature dependence of diamine oxidase activity and its thermal stability in the presence of polyvinylalcohol. *Agents Actions* **1992**, *37*, 220–6, doi:10.1007/bf02028112.
236. Matsuda, H.; Suzuki, Y. Purification and Properties of the Diamine Oxidase from *Vicia faba* Leaves. *Plant Cell Physiol.* **1981**, *22*, 737–746, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076219.
237. Department of Biochemistry and Bioinformatics of the Technische Universität Braunschweig. Braunschweig Enzyme Database (BRENDA): Information on EC 1.4.3.22 - Diamine Oxidase Available online: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.4.3.22> (accessed on Feb 9, 2020).
238. European Commission List of Member States' authorisations of food and food ingredients which may be treated with ionising radiation. *Off. J. Eur. Union* **2009**, *C 283*, 1.
239. Ministerio de la Presidencia Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. *Boletín Of. del Estado* **2001**, *82*, 1–9.
240. European Parliament Directive 1999/3/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Off. J. Eur. Union* **1999**, *L66*, 24–25.
241. Farkas, J.; Mohácsi-Farkas, C. History and future of food irradiation. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 121–126, doi:10.1016/j.tifs.2010.04.002.

242. Wang, J.; Jiang, J.; Wang, J.; Wang, Z.; Yang, X.; Jia, L. The influence of gamma irradiation on the storage quality of bamboo shoots. *Radiat. Phys. Chem.* **2019**, *159*, 124–130, doi:10.1016/j.radphyschem.2019.02.021.
243. Hou, L.; Lin, J.; Ma, L.; Qu, S.; Li, H.; Jiang, N. Effect of <sup>60</sup>Co gamma irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of *Volvariella volvacea*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2018**, *235*, 382–390, doi:10.1016/j.scienta.2018.02.074.
244. Pequeño-Granado, I.; Martínez-Ávila, G.; Aguirre-Arzola, V.; Iracheta-Donjuan, L.; Mojica-Marín, V.; Rodríguez-Pérez, G.; Ojeda-Zacarías, M. Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. *Bioagro* **2015**, *27*, 167–172.
245. Smith, T.A.; Barker, J.H.A. The Di- and Polyamine Oxidases of Plants. In *Progress in Polyamine Research*; Zappia, V., Pegg, A.E., Eds.; Springer: Boston, 1988; pp. 573–587 ISBN 978-1-4684-5637-0.
246. Torrigiani, P.; Serafini-Fracassini, D.; Fara, A. Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 69–73, doi:10.1104/pp.89.1.69.
247. Joseph, P.; Srivastava, S.K. Photoregulation of Diamine Oxidase from Pea Seedlings. *J. Plant Physiol.* **1995**, *146*, 108–114, doi:10.1016/S0176-1617(11)81975-9.
248. Verni, M.; Coda, R.; Rizzello, C.G. The Use of Faba Bean Flour to Improve the Nutritional and Functional Features of Cereal-Based Foods: Perspectives and Future Strategies. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*; Preddy, V.R., Watson, R.R., Eds.; Academic Press, 2019; pp. 465–475 ISBN 978-0-12-814639-2.
249. Yang, R.; Chen, H.; Gu, Z. Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia faba* L.) during Germination. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11616–11620, doi:10.1021/jf202645p.
250. Laurenzi, M.; Tipping, A.J.; Marcus, S.E.; Knox, J.P.; Federico, R.; Angelini, R.; McPherson, M.J. Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* **2001**, *214*, 37–45, doi:10.1007/s004250100600.
251. Tavladoraki, P.; Cona, A.; Angelini, R. Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fpls.2016.00824.
252. Xia, Q.; Maharajah, P.; Cuff, G.; Rajjou, L.; Prodhomme, D.; Gibon, Y.; Bailly, C.; Corbineau, F.; Meimoun, P.; El-Maarouf-Bouteau, H. Integrating proteomics and enzymatic profiling to decipher seed metabolism affected by temperature in seed dormancy and germination. *Plant Sci.* **2018**, *269*, 118–125,

- doi:10.1016/j.plantsci.2018.01.014.
253. Choudhary, A.; Singh, R.P. Cadmium-induced changes in diamine oxidase activity and polyamine levels in *Vigna radiata* Wilczek seedlings. *J. Plant Physiol.* **2000**, *156*, 704–710, doi:10.1016/S0176-1617(00)80235-7.
  254. Maccarrone, M.; Rossi, A.; Avigliano, L.; Finazzi Agro, A. Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedling under different growth conditions. *Plant Sci.* **1991**, *79*, 51–55, doi:10.1016/0168-9452(91)90068-J.
  255. Federico, R.; Angelini, R.; Cesta, A.; Pini, C. Determination of Diamine Oxidase in Lentil Seedlings by Enzymic Activity and Immunoreactivity. *Plant Physiol.* **1985**, *79*, 62–64, doi:10.1104/pp.79.1.62.
  256. Fait, A.; Fromm, H.; Walter, D.; Galili, G.; Fernie, A.R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 14–19, doi:10.1016/j.tplants.2007.10.005.
  257. Xing, S.G.; Jun, Y.B.; Hau, Z.W.; Liang, L.Y. Higher accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, *45*, 560–566, doi:10.1016/j.plaphy.2007.05.007.
  258. Verma, N.; Sisodiya, L.; Gahlaut, A.; Hooda, V.; Hooda, V. Novel approach using activated cellulose film for efficient immobilization of purified diamine oxidase to enhance enzyme performance and stability. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *50*, 468–476, doi:10.1080/10826068.2019.1709976.



# 11 ANNEXOS



## 11. ANNEXOS

### 11.1. Contribucions científiques derivades de la tesi doctoral

#### 11.1.1. Publicacions

##### PUBLICACIÓ 1

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2019). Histamine and other biogenic amines in foods. From scrombroid poisoning to histamine intolerance. *Biogenic Amines. Editor: Charalampos Proestos. IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.84333

##### PUBLICACIÓ 2

M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou (2017). Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 78-85. DOI: 10.1016/j.fct.2016.11.011

##### PUBLICACIÓ 3

Joan Izquierdo-Casas, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, M. Carmen Vidal-Carou, Luis Soler-Singla (2018). Low serum diamine oxidase (DAO) activity levels in patients with migraine. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74, 93-99. DOI: 10.1007/s13105-017-0571-3

##### PUBLICACIÓ 4

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Roberta Bernacchia, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2017). New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 379-385. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.06.029

##### PUBLICACIÓ 5

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2019). In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 7595-7602. DOI: 10.1007/s00216-019-02178-2



#### PUBLICACIÓ 6

Joan Izquierdo-Casas, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, Luis Soler-Singla, M. Carmen Vidal-Carou (2019). Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clinical Nutrition*, 38, 152-158. DOI: 10.1016/j.clnu.2018.01.013

#### PUBLICACIÓ 7

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Judit Rabell-González, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2020). Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT - Food Science and Technology*, 125, 109201. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109201

#### PUBLICACIÓ 8

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, 10, 1181. DOI: 10.3390/biom10081181

### 11.1.2. Patents

#### SOL·LICITUD DE PATENT

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2020). Procedimiento para la determinación *in vitro* de la actividad diamino oxidasa (DAO). *Oficina Espanyola de Patents i Marques*, P32924ES00.

### 11.1.3. Comunicacions orals

#### COMUNICACIÓ ORAL 1 | [Premi a la millor comunicació oral](#)

Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, Sònia Sánchez-Pérez, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Nuevas fuentes de enzima DAO: del riñón de cerdo a los brotes de legumbre. *II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias*, 2019, Almeria.

#### COMUNICACIÓ ORAL 2 | [Premi a la millor comunicació oral](#)

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Roberto Garza-Guajardo, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. What about legumes as a plant source of the DAO enzyme? *XVII Congreso de la Sociedad Española de*

*Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA), 2018, Barcelona.*

#### 11.1.4. Comunicacions escrites

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 1

M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Sara Bover-Cid, M. Carmen Vidal-Carou. Evaluación del riesgo de efectos adversos de histamina y tiramina por el consumo de embutidos fermentados en grupos sensibles de la población española. *XII Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL), 2016, Antequera.*

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 2

M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Joan Izquierdo-Casas, Luis Soler-Singla, Marian Lorente-Gascón, Adriana Duelo, M. Carmen Vidal-Carou. Actividad diamino oxidasa (DAO) sérica en pacientes migrañosos. *XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ), 2016, Santiago de Compostela.*

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 3

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. A new approach for the diagnosis of histamine intolerance: histamine metabolites UHPLC-FL determination in urine. *XI International Mediterranean Diet Conference, 2016, Barcelona.*

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 4

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Salvador Hernández-Macias, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Determination of histamine-degrading activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *XV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL), 2019, Alicante.*

##### COMUNICACIÓ ESCRITA 5

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Roberto Garza-Guajardo, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. In vitro DAO activity of porcine kidney extracts and DAO supplements. *XII International Mediterranean Diet Conference, 2018, Barcelona.*

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 6

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Brotes de legumbre como potencial fuente vegetal de enzima DAO. *XIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2018, Salamanca.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 7

Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, Federica Pederzani, Sònia Sánchez-Pérez, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Histamine-degrading capacity of lyophilised legume sprouts. *XVIII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2019, Soria.

## 11.2. Altres contribucions científiques

Les següents contribucions científiques, encara que no es troben directament vinculades als objectius d'aquesta tesi doctoral, s'han produït durant el període de realització de la tesi fruit de la participació del doctorand en les diferents línies de recerca del grup d'investigació.

### 11.2.1. Publicacions

#### PUBLICACIÓ 9

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou (2018). Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are They Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods*, 7, 205. DOI: 10.3390/foods7120205

#### PUBLICACIÓ 10

Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Natalia Toro-Funes, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou (2019). Polyamines in Food. *Frontiers in Nutrition*, 6, 108. DOI: 10.3389/fnut.2019.00108

#### PUBLICACIÓ 11 | LXXXVII Premi Sant Jordi 2018 de l'Institut d'Estudis Catalans

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Victòria Castell-Garralda, M. Carmen Vidal-Carou (2018). Valoració de les declaracions de salut en l'etiquetatge d'aliments comercialitzats a Catalunya. *TECA: Tecnologia i Ciència dels Aliments*, 17, 6-21. DOI: 10.2436/20.2005.01.75

## 11.2.2. Comunicacions orals

### COMUNICACIÓ ORAL 3

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Noves eines en el diagnòstic i control de la intolerència a la histamina. *XI Jornada de Recerca de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació*, 2018, Barcelona.

### COMUNICACIÓ ORAL 4 | Premi a la millor comunicació oral

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Prebiotic effect of cava lees on probiotic strains with DAO activity. *III Workshop de l'Institut de recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA·UB)*, 2017, Santa Coloma de Gramenet.

### COMUNICACIÓ ORAL 5

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Histamine intolerance management in clinical practice: Do putrescine contents justify the exclusion of certain foods? *III Jornada de Joves Investigadores de la Sociedad Española de Nutrición*, 2016, Santiago de Compostela.

### COMUNICACIÓ ORAL 6

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Gestión dietética de la intolerancia a la histamina: Influencia de la putrecina en el metabolismo de la histamina por la enzima DAO. *XII Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2016, Antequera.

### COMUNICACIÓ ORAL 7

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Estimación del riesgo agudo de aumento de la presión arterial atribuible a la tiramina del queso. *XI Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2015, Pamplona.

### 11.2.3. Comunicacions escrites

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 8

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. Biogenic amines in plant-origin foods: Are they frequently underestimated in low-histamine diets? *XV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2019, Alicante.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 9

M. Luz Latorre-Moratalla, Silva M. Benine-Ramos, Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Aminas biógenas en sashimi de atún: la importancia de mantener la cadena de frío. *XV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2019, Alicante.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 10

Sònia Sánchez-Pérez, Francesca Frongia, Oriol Comas-Basté, Salvador Hernández-Macias, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. Dietary management of histamine intolerance: How do the presence of other amines influence on histamine degradation by the DAO enzyme? *XVIII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2019, Soria.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 11

Salvador Hernández-Macias, Gemma Rius-Olivella, Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Teresa Veciana-Nogués, Sara Bover-Cid, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Carmen Vidal-Carou. Estudio de la actividad histaminasa de *Lactobacillus sakei* y del efecto promotor de las lías del cava en su crecimiento. *V Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria ACOFESAL*, 2019, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 12

Montserrat Riu-Aumatell, Oriol Comas-Basté, Antonio Montoro, J. José Moreno, M. Teresa Veciana-Nogués, Stefania Vichi. L'aprenentatge pràctic com a estratègia docent en anàlisi sensorial dels aliments. Relació amb l'avaluació de l'assignatura. *X Trobada de Professorat de Ciències de la Salut*, 2019, L'Hospitalet de Llobregat.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 13

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Roberto Garza-Guajardo, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. What about legumes as

a plant source of the DAO enzyme? *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA)*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 14

Adriana Duelo, Marina Berbel, Hélène Mantecon-Laviguerie, Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Low-histamine diet supplemented with exogenous diamine oxidase (DAO) enzyme is useful for treating migraine in patients with migraine. *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'ACCA*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 15

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Salvador Hernández-Macias, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Is there correspondence between compositional values of tables and those in labels of commercial meat products? *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'ACCA*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 16

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Salvador Hernández-Macias, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Should fresh meat and meat derivatives be placed at different levels of the nutritional pyramid? *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'ACCA*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 17

Montserrat Riu-Aumatell, Elvira López-Tamames, Rita Navarrete-Codina, Ciara Balbo, Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Angela Díaz. Yeast lees as a fermentation promoter during bread production. *XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ) y X Jornada de l'ACCA*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 18

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Judit Rabell-González, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Incertidumbres sobre la intoxicación histamínica. *XIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2018, Salamanca.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 19

Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Montserrat Riu-Aumatell, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. ¿Pueden las lías del

cava mejorar la seguridad de los alimentós fermentados? *XIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad y Calidad Alimentarias (SESAL)*, 2018, Salamanca.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 20

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Salvador Hernández-Macias, Nelly C. Muñoz-Esparza, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Histamine-free diets: Whats about legumes? *XII International Mediterranean Diet Conference*, 2018, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 21

Nelly C. Muñoz-Esparza, Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Are polyamines underestimated antioxidants in food? *IV Workshop de l'Institut de recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA·UB)*, 2018, Santa Coloma de Gramenet.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 22

Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, Montserrat Rivero-Urgell, M. Carmen Vidal-Carou. Estimation of the current polyamine intake in the Spanish population. *IUNS 21st International Congress of Nutrition*, 2017, Buenos Aires (Argentina).

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 23

Sònia Sánchez-Pérez, Oriol Comas-Basté, Salvador Hernández-Macias, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Estimación de la ingesta de histamina para validar la exclusión de alimentos en el tratamiento dietético de la intolerancia a la histamina. *XIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2017, Girona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 24

Salvador Hernández-Macias, Oriol Comas-Basté, Sònia Sánchez-Pérez, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. ¿Pueden las lías del cava ser promotoras del crecimiento de microorganismos fermentadores y probióticos? *XIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2017, Girona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 25

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Sònia Sánchez-Pérez, Adriana Duelo, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Gestión de la intolerancia a la histamina en la práctica clínica: ¿Está justificada la exclusión de ciertos alimentos por

sus contenidos en putrescina? *XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2016, Santiago de Compostela.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 26

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Poliaminas en leche materna y en fórmulas infantiles. *XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2016, Santiago de Compostela.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 27

Oriol Comas-Basté, M. Luz Latorre-Moratalla, Joana Relat, Anna Barceló, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Probióticos con actividad DAO: cuantificación de la reducción de histamina y localización del gen responsable. *VII Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica*, 2016, Sevilla.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 28

Elisabet García-Herrero, M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Complementos alimenticios: estudio de mercado sobre declaraciones saludables en su etiquetado. *VI Congreso Internacional Autocontrol y Seguridad Alimentaria (KAUSAL)*, 2016, Vitoria-Gasteiz.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 29

M. Luz Latorre-Moratalla, Natalia Toro-Funes, Oriol Comas-Basté, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. Nutritional and biofunctional comparative study of commercial almond and soy beverages. *XI International Mediterranean Diet Conference*, 2016, Barcelona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 30

M. Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, M. Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou. La cocción reduce el contenido de histamina de las espinacas. *XI Reunión Anual de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria (SESAL)*, 2015, Pamplona.

#### COMUNICACIÓ ESCRITA 31

Natalia Toro-Funes, M. Teresa Veciana-Nogués, Joan Bosch-Fusté, Oriol Comas-Basté, M. Carmen Vidal-Carou. Estimación del riesgo asociado al consumo de fórmulas infantiles a base de soja por lactantes de 0 a 6 meses. *XIV Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEÑ)*, 2014, Zaragoza.





### 11.3. Evidència de les comunicacions orals i escrites derivades de la tesi doctoral





Congreso de  
Jóvenes Investigadores  
en Ciencias Agroalimentarias



La Universidad de Almería certifica que

**Oriol Comas Basté**  
(Universidad de Barcelona)

ha obtenido PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN EN FORMATO ORAL en el Panel Científico de Seguridad y calidad alimentaria, química agroambiental, nutrición y salud, por su comunicación *Nuevas fuentes de enzimas DAO: del riñón del cerdo a los brotes de legumbres* en el II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias, celebrado el 17 de octubre de 2019 en la Universidad de Almería.

En Almería, a 17 de octubre de 2019,

  
Diego Luis Vazela Martínez  
Vicerrector de Investigación, Desarrollo e Innovación  
Universidad de Almería



Juan Reca Cardaña  
Director de CIAMBITAL Centro de Investigación en  
Agrosistemas Intensivos Mediterráneos y Biotecnología Agroalimentaria  
Universidad de Almería







XVII Congreso  
de la Sociedad  
Española  
de Nutrición

## Alimentación 5S

Saludable | Segura | Satisfactoria | Sostenible | Social

27-29 de junio de 2018 - Barcelona

V Reunión de  
Jóvenes Investigadores  
28 de junio de 2018 - Barcelona

X Jornada de la  
Asociació Catalana  
de Ciències  
de l'Alimentació

### PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL

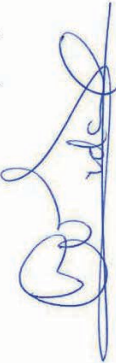
OTORGADO A  
**ORIO COMAS BASTÉ**

con el título:


**“WHAT ABOUT LEGUMES AS A PLANT SOURCE OF THE DAO ENZYME?”**

durante el XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN) y X Jornada de l'Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA),  
celebrado en Barcelona, los días 27, 28 y 29 de junio de 2018

Y para que así conste a los efectos oportunos



**M. Carmen Vidal Carou**  
Presidenta Comité Organizador  
XVII Congreso SEN y X Jornada ACCA



**Luis A. Moreno Aznar**  
Presidente de la Sociedad  
Española de Nutrición (SEN)



ORGANIZA:



CO-ORGANIZA:  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
Campus de Alimentación  
Universidad de Barcelona



CO-ORGANIZA:  
ASOCIACIÓN CATALANA  
DE CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ  
Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació



## EVALUACIÓN DEL RIESGO DE EFECTOS ADVERSOS DE HISTAMINA Y TIRAMINA POR EL CONSUMO DE EMBUTIDOS FERMENTADOS EN GRUPOS SENSIBLES DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

Latorre-Moratalla, M.L.<sup>a</sup>, Comas-Basté, O.<sup>a</sup>, Sánchez-Pérez, S.<sup>a</sup>, Bover-Cid, S.<sup>b</sup>, & Vidal-Carou, M.C.<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy - XaRTA - INSA, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Barcelona), Spain, mcolada@ub.edu  
<sup>b</sup> RTA - Food Safety Programme, Institute for Food and Agricultural Research and Technology, Finca Campi d'Arret s/n, 17121 Monells (Girona), Spain.



La tiramina y la histamina son aminas bioactivas implicadas en la aparición de efectos adversos para la salud en subgrupos poblacionales de riesgo. La ingesta elevada de tiramina puede desencadenar, entre otros, cuadros hipertensivos, principalmente cuando existe una medicación con fármacos que inhiben el metabolismo de esta amina (IMAO o RIMA). En cuanto a la histamina, pueden darse tanto síntomas de intoxicación por ingesta excesiva como por intolerancia, causada por el bloqueo o déficit de la enzima DAO, responsable de la degradación intestinal de esta amina. Los embutidos fermentados, alimentos muy consumidos en nuestro país, pueden fácilmente acumular niveles elevados de estos peligros.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar en qué medida el consumo de embutidos puede contribuir a la aparición de efectos adversos en población española de riesgo.

### METODOLOGÍA

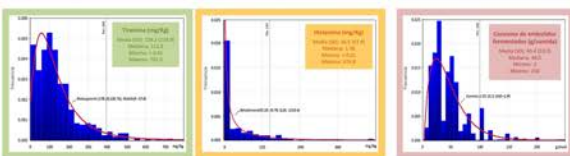
La estimación probabilística de la ingesta de tiramina e histamina se realizó mediante la técnica de simulación de Monte Carlo (@Risk 7.0), combinando las distribuciones del contenido de estas aminas en embutidos fermentados (A) con los datos de consumo de la población española (ENIDE)<sup>1</sup> (B).

Para la estimación del riesgo se consideraron los niveles máximos seguros para cada uno de los subgrupos de población (C), y para estimar el porcentaje de la población española para cada riesgo se utilizaron los diferentes datos recogidos en la tabla D.

A) Distribución del contenido de tiramina e histamina (mg/kg) en embutidos fermentados (n=474).

B) Distribución del consumo de embutidos fermentados (g/comida/persona).

C) Niveles máximos de seguridad (mg/comida) adoptados por EFSA<sup>2</sup> para tiramina y histamina para población sana y sensible.



Tiramina (mg/comida)	Histamina (mg/comida)
Población sana	600
IMAO nueva generación (RIMA) <sup>3</sup>	50
IMAO clásicos <sup>4</sup>	6
	Intolerancia a la histamina
	1 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Población tratada con fármacos IMAO (Inhibidores de monoamina oxidasa A selectivos y no selectivos).  
<sup>2</sup> Pacientes tratados con fármacos IMAO (Inhibidores de monoamina oxidasa).  
<sup>3</sup> EFSA concluyó que "la ingesta de niveles bajos de histamina puede causar efectos adversos en la salud y que por lo tanto los niveles por debajo de los límites de detección se pueden considerar seguros".

D) Porcentajes de población española.

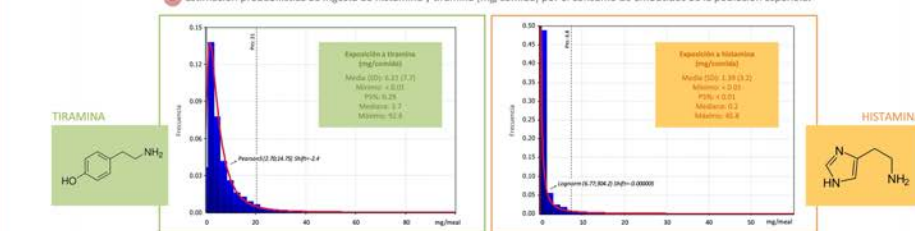
Porcentajes de Población la española <sup>6</sup>	
Potencialmente consumidora de productos cárnicos según encuesta ENIDE <sup>1</sup>	98.5%
En tratamiento con fármacos IMAO (AEMPS) <sup>3</sup>	0.001%
Población diagnosticada con intolerancia a la histamina <sup>4</sup>	1%

<sup>6</sup> Total de población española considerado en el estudio: 46.000.000 habitantes (INE, 2013).

### RESULTADOS

La ingesta media de histamina y tiramina en la población española por el consumo de embutidos fermentados es de 1.39 (±3.2) y 6.21 (±7.7) mg/comida, respectivamente (E). Con esta ingesta, el riesgo de desencadenar una crisis hipertensiva o una intoxicación histamínica en la población sana es despreciable. Los resultados indican que sólo con el consumo de embutidos ya puede haber riesgo en pacientes bajo tratamiento con fármacos IMAO (especialmente IMAO clásicos) así como en personas con intolerancia a la histamina.

E) Estimación probabilística de ingesta de histamina y tiramina (mg/comida) por el consumo de embutidos de la población española.



En los individuos tratados con IMAO de nueva generación (RIMA) el riesgo de crisis hipertensiva por el consumo de embutidos es muy bajo, ya que la probabilidad de superar los 50 mg establecidos como límite seguro es del 0,01%. Sin embargo, los pacientes que toman IMAO clásicos presentan un riesgo elevado, con una probabilidad del 34% de superar en una comida el límite seguro de tiramina (6 mg). No obstante, debido al reducido uso actual de estos fármacos, sólo 3 de cada millón de individuos podrían sufrir estos efectos adversos (F).

Para la intolerancia a la histamina, EFSA indica que la ingesta de niveles bajos de histamina puede causar efectos adversos en la salud y que por lo tanto sólo niveles por debajo de los límites de detección se pueden considerar seguros. El 66% de los embutidos contenían cantidades variables de histamina (A) y por tanto su consumo es susceptible de desencadenar la sintomatología. El riesgo de aparición de los síntomas será variable en función del grado de déficit de DAO. Considerando que aproximadamente el 1% de la población es intolerante a la histamina<sup>4</sup>, la población en riesgo de sufrir síntomas asociados a esta intolerancia por consumo de embutidos alcanzaría los 7.000 casos por millón de individuos (F).

F) Estimación probabilística de la población española con mayor riesgo de sufrir efectos adversos asociados al consumo de aminas presentes en embutidos.



### CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en esta estimación probabilística demuestran que la población intolerante a la histamina es la que tiene una mayor probabilidad de sufrir efectos adversos por el consumo de embutidos fermentados. Estos resultados ponen de manifiesto la conveniencia de trabajar para reducir al mínimo los contenidos de histamina en embutidos fermentados (y otros alimentos) aplicando las medidas higiénicas y tecnológicas adecuadas. Otra manera de contribuir a reducir los efectos adversos en individuos sensibles es incluir el contenido de histamina y otras aminas en el etiquetado de estos productos.

<sup>1</sup> AECOSAN (Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición) (2011). ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española).  
<sup>2</sup> EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9(10), 2393.  
<sup>3</sup> AEMPS (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios) (2015). Informe de utilización de medicamentos (IUM) 14/01/2015.  
<sup>4</sup> Mantz, L., & Nyvle, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. American Journal of Clinical Nutrition, 85, 1185-1196.  
 Acknowledgements: The authors would like to thank the Director General de Recerca of the Generalitat de Catalunya (2014-1438 SGR) for their support and for a grant from the Universitat de Barcelona to the PhD student Oriol Comas Basté. This work was also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology (CICTY) of the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte through the Project AGL 2012-39969.







## ACTIVIDAD DIAMINO OXIDASA (DAO) SÉRICA EN PACIENTES MIGRAÑOSOS

Latorre-Moratalla, M.L.<sup>a</sup>, Comas-Basté, O.<sup>a</sup>, Izquierdo-Casas, J.<sup>b,c</sup>, Soler-Singla, L.<sup>b,c</sup>, Lorente-Gascón, M.<sup>c</sup>, Duelo, A.<sup>d</sup>, & Vidal-Carou, M.C.<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy - XaRTA - INSA, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona.  
<sup>b</sup> Department of Neurology, Hospital General de Catalunya.  
<sup>c</sup> Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya.  
<sup>d</sup> Department of Nutrition, Instituto Clínic del Dèficit de DAO (ICDDAO),  
 Avinguda Prat de la Ribera 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Barcelona), Spain. [mccvial@ub.edu](mailto:mccvial@ub.edu)



### INTRODUCCIÓN

La intolerancia a la histamina se debe a un desequilibrio en la homeostasis de la histamina, debido a una reducción de la actividad diamino oxidasa (DAO) intestinal, causando su acumulación en plasma<sup>1</sup>. Algunos autores han relacionado el déficit de DAO con enfermedades de alta prevalencia en la población, como migraña, enfermedades gastrointestinales (diarrea, enfermedades inflamatorias intestinales o dermatológicas (eccema, urticaria, dermatitis atópica)<sup>1,2,3</sup>.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia del déficit de DAO en pacientes con diagnóstico confirmado de migraña según los criterios actuales de la *International Headache Society* (IHS) y en voluntarios no migrañosos.

### METODOLOGÍA

El estudio se realizó en la Unidad de Cefalea del Hospital General de Cataluña con un total de 198 voluntarios, divididos en dos grupos: un grupo de 137 pacientes diagnosticados de migraña por la Unidad de Cefalea del Hospital de acuerdo con los criterios actuales de la IHS, y un grupo control integrado por 61 voluntarios sin diagnóstico clínico de migraña (Figura 1).

Las muestras de sangre se recogieron mediante punción venosa en un tubo con EDTA después de un período de ayuno de 8 horas. La actividad DAO se determinó mediante un test ELISA, considerando que valores inferiores a 80 HDU/ml (Unidades Degradadoras de Histamina/ml) eran indicadores de déficit de DAO (Figura 1).



Figura 1. Distribución de la muestra poblacional y esquema del protocolo del estudio.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia del déficit de DAO fue muy elevada en el grupo de pacientes con migraña, con un 87% de personas con este déficit enzimático (Figura 2). El valor medio de actividad DAO en pacientes con migraña fue del  $64.5 \pm 33.5$  HDU/mL, valor significativamente inferior ( $p < 0.0001$ ) al obtenido en voluntarios sanos ( $91.9 \pm 44.3$  HDU/mL) (Figura 3). El diagrama de cajas (Figura 4) muestra la distribución de los valores de actividad DAO en ambos grupos, observándose una menor variabilidad en el grupo con migraña. La amplia variabilidad en el grupo control sugiere que quizás fuera conveniente estudiar con más precisión los valores normales de actividad DAO.

El 13% de la población migrañosa sin déficit de DAO y el 44% de la población no migrañosa con déficit de DAO indican que esta deficiencia enzimática puede ser un factor que predispone a la migraña, pero no la única causa. Como es sabido, la migraña tiene una etiología multifactorial. La migraña es uno de los síntomas frecuentemente asociados a la intolerancia a la histamina, pero no el único<sup>1,2,3</sup>. En este estudio no se registró la presencia de otros síntomas asociados a esta intolerancia y, por tanto, no se puede concluir que el 44% de pacientes que muestran déficit de DAO en la población no migrañosa sean realmente asintomáticos para la intolerancia a la histamina.



Figura 2. Porcentaje de déficit de DAO en pacientes migrañosos (izquierda) y en grupo control (derecha).

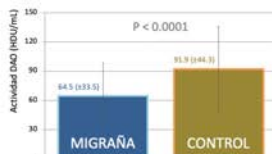


Figura 3. Actividad DAO en pacientes con migraña (n=137) y población control (n=61).

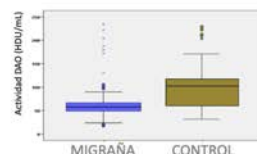


Figura 4. Diagrama de cajas de la distribución de los valores de actividad DAO en pacientes migrañosos y controles.

### CONCLUSIONES

El déficit de actividad DAO fue más frecuente en pacientes con migraña que en la población control. Un 13% de los individuos correctamente diagnosticados de migraña presentaban niveles normales de actividad DAO. Son necesarios más estudios con el fin de conocer con más precisión los valores normales de actividad DAO en población sana para, entre otras cosas, poder establecer con más evidencia la correlación entre el déficit de DAO y la aparición de migraña.

Bibliografía: 1. Maiztegui et al., *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1188-2. Schwelbengen. *Inflamm Res* 2010; 19:219. 3. Kovacska-Hahankovska y col. *Allergol Immunopathol* 2015; 43:498.  
 Acknowledgements: The authors would like to thank the Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya (2014-1438 SGR) for their support and for a grant from the Universitat de Barcelona to the PhD student Oriol Comas Basté. This work was also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) of the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte through the Project AGL 2012-39999.



## A NEW APPROACH FOR THE DIAGNOSIS OF HISTAMINE INTOLERANCE: HISTAMINE METABOLITES UHPLC-FL DETERMINATION IN URINE

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C.

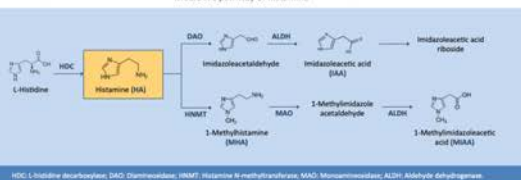


Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona - INSA - XaRTA, Av. Príncep de la Ribera 171, 08521 Santa Coloma de Gramenet (Barcelona), Espanya. [comas@ub.edu](mailto:comas@ub.edu)



Histamine intolerance or food histaminosis is a disorder in the homeostasis of histamine due to a reduced intestinal activity of diamineoxidase enzyme (DAO), which causes an accumulation of this amine in plasma and the appearance of adverse effects. The clinical diagnostic for the identification of histamine intolerants is based on determination of DAO activity in plasma. An alternative to the diagnosis could be the determination of histamine and its metabolites in urine, considering the hypothesis that individuals with insufficient DAO activity could have a distribution profile of histamine and its metabolites in urine significantly different from healthy individuals.

Metabolic pathway of histamine



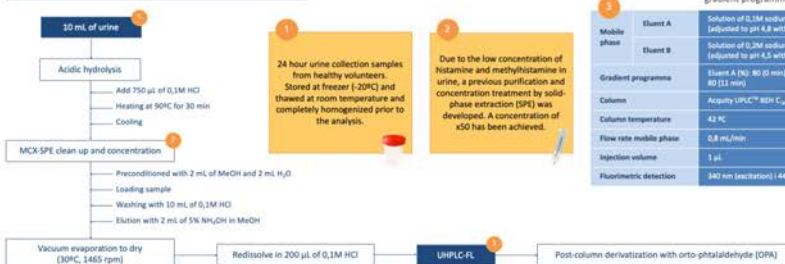
Main characteristics of histamine intolerance

Etiology	
Genetic predisposition	Genetic mutations on chromosome 7q36 resulting in an altered protein with low enzymatic activity
Diseases of gastrointestinal tract	Especially inflammatory or degenerative diseases of the intestine that limit the secretion of DAO
Pharmacological	DAO inhibition by certain drugs (anticholinergics, clovinate acid, metoclopramide, etc.)
Symptoms and associated pathologies	
Nervous system	Headache and migraine
Skin	Hives, itching and atopic dermatitis
Gastrointestinal system	Constipation, diarrhea, irritable bowel syndrome and cyclic vomiting syndrome
Respiratory tract	Sneezing, non-allergic rhinitis and asthma
Cardiovascular system	Changes in blood pressure and heart rhythm disorders
Treatment	
Free histamine diet	Avoidance of histamine containing food
Food supplements	Enzymatic DAO enzyme of porcine origin

### OBJECTIVE

The aim of this work was to develop and validate an analytical method to unequivocally determine histamine and methylhistamine in human urine by Ultra High Performance Liquid Chromatography and Fluorimetric detection (UHPLC-FL).

### MATERIAL AND METHODS



Mobile phase composition, chromatographic conditions and the gradient programme implemented

Mobile phase	Eluent A	Eluent B
	Solution of 0.1M sodium acetate and 10mM sodium octanesulphonate (adjusted to pH 4.8 with acetic acid)	Solution of 0.2M sodium acetate and 10mM sodium octanesulphonate (adjusted to pH 4.5 with acetic acid): Acetonitrile (5,5:9.5)
Gradient programme	Eluent A (N): 80 (5 min) - 70 (8 min) - 0 (0.5 min) - 0 (8.5 min) - 80 (9 min) - 80 (11 min)	
Column	Acquity UPLC™ BEH C <sub>18</sub> (1.7 µm, 2.1 x 10 mm)	
Column temperature	42 °C	
Flow rate mobile phase	0.8 mL/min	
Injection volume	1 µl	
Fluorimetric detection	340 nm (excitation)   445 nm (emission)	

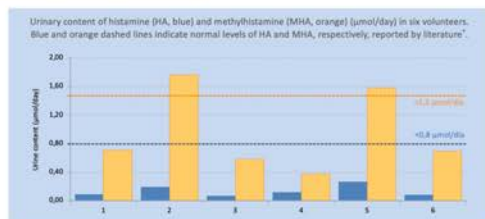
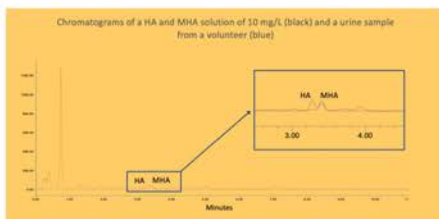


### RESULTS AND DISCUSSION

Summary of validation results

	Linearity		Precision		Recovery			Sensitivity	
	R <sup>2</sup>	RSD (%)	RSD (%)	Addition level I	Addition level II	Cochran's test C <sub>max</sub>	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	
HA	0,9999	2,15	8,12 - 10,83	100,58 (2,27)	97,91 (5,13)	0,16	0,025	0,028	
MHA	0,9999	2,77	6,03 - 8,04	99,95 (2,93)	99,65 (1,71)	0,75	0,035	0,045	

\* Range for both analytes: 0.05 to 10 mg/L; 10 to 8  
 † Relative standard deviation (RSD) for seven determinations.  
 ‡ Acceptable range for relative standard deviation according to Horwitz's formula for inter-laboratory study (1/2 of the interlaboratory study calculated by the formula) = 0.03 mg/L for both analytes (resulting in 0.5 mg/L after x10 concentration by the analytical protocol); 0.04 mg/L for both analytes (resulting in 2 mg/L).  
 § Variance ratio test: Cochran C<sub>max</sub> (6,2/0,005) = 0,8034.



### CONCLUSIONS

The UHPLC-FL technique has been demonstrated as a reliable procedure to determine histamine and methylhistamine in less than 11 minutes of chromatographic elution, showing a satisfactory linearity, precision, accuracy and sensitivity. The applicability of the method has been studied in urine samples from volunteers, resulting a reliable tool for the determination of both compounds and, in hence, a potential new approach for the diagnosis of histamine intolerance.

Volunteers who have symptoms associated with histamine intolerance show a urine content of methylhistamine higher than normal levels, supporting the working hypothesis according to which the decrease in DAO activity would cause an accumulation of the metabolites produced by the enzyme Histamine N-methyltransferase (HNMT).

Acknowledgments: The authors would like to thank the Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2014-1488 SGR) for their support and for a grant from the Universitat de Barcelona to the PhD student Oriol Comas Basté. This work was also supported by the Interministerial Commission for Science and Technology (ICYT) of the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte through the Project AG. 2012-39995.





## Determination of histamine-degrading activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Hernández-Macias, S., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB).  
Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Spain); Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB);  
Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA); [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu)



### Background

Diamine oxidase (DAO) is a homodimeric and ubiquitous enzyme found in microorganisms, plants and animals that catalyzes the oxidative deamination of the primary amino group of histamine<sup>1</sup>. In humans, intestinal DAO acts as a protective barrier against exogenous histamine, specially of food origin (Figure 1)<sup>2,3</sup>. A deficit of DAO activity can lead to the appearance of histamine intolerance, a clinical condition that may be treated by a low-histamine diet and oral DAO supplementation to enhance intestinal histamine degradation<sup>4,5</sup>. As sources of DAO, porcine kidneys and certain legume seedlings are suitable components for the formulation of a DAO supplement<sup>5,6</sup>.

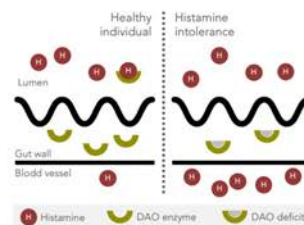


Figure 1. Schematic representation of histamine intolerance by deficit of DAO enzyme.

### Objective

The aim of this work was to develop a rapid and reliable methodology for the *in vitro* determination of DAO activity in food matrices based on an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL.

### Material and methods

The capacity of the DAO enzyme to degrade histamine was tested under controlled optimal conditions (37°C, pH 7.2) in a working solution with a defined initial concentration of histamine. The subsequent analysis of degraded histamine during the reaction time was performed by UHPLC-FL<sup>7</sup>. Specific DAO activity is expressed in mU/mg (nmol of degraded histamine per minute/mg of sample).

The applicability of the method was assayed with 13 different production batches of porcine kidney protein extract, 7 batches of lyophilized pea sprouts and 6 commercialized DAO supplements available in the market.

### Results

#### Method reliability

The proposed method showed satisfactory linearity ( $r=0.9998$ ,  $p<0.001$ ) and sensitivity (LOD=0.025 mU and LOQ=0.038 mU). Precision and recovery data are shown in table 1. A high specificity is one of the key attributes of this method due to the use of histamine as the substrate and the direct quantification of its degradation. Moreover, the lack of interference of catalase, an enzyme commonly found in plant and animal tissues, is another advantage in comparison with other published methods.

Table 1. Precision and recovery results for porcine kidney extracts and lyophilized pea sprouts.

	Precision		Recovery <sup>a</sup>			Cochran's test $C_{max}$ <sup>d</sup>
	RSD (%) <sup>a</sup>	RSDH (%) <sup>b</sup>	Addition level I	Addition level II	Addition level III	
Porcine kidney extract	2.76	3.45-4.60	100.54 (4.98)	102.69 (5.44)	99.14 (2.52)	0.41
Lyophilized pea sprouts	2.80	3.27-4.36	101.28 (0.90)	100.00 (0.76)	100.51 (2.61)	0.05

<sup>a</sup> Acceptable range for relative standard deviations according to the Horwitz equation for single laboratory studies (1/2, 2/3 of the interlaboratory study (calculated by the formula)).  
<sup>b</sup> Mean recovery percentages and standard deviation in parentheses for three addition levels corresponding to enzymatic activities of 0.5, 1.0 and 2.0 mU for porcine kidney extract and 1.0, 2.0 and 4.0 mU for lyophilized pea sprouts.  
<sup>c</sup> Cochran's C variance outlier test,  $C_{max} = 0.25(20) = 0.05(3)$ .

#### Suitability of the method in real samples

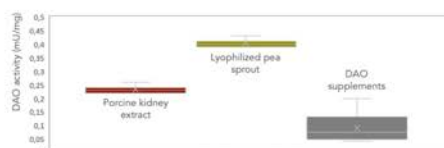


Figure 2. *In vitro* DAO activity of several production batches of porcine kidney protein extract, lyophilized pea sprouts and different commercial DAO supplements.

All analyzed products showed *in vitro* histamine-degrading capacity (Figure 2). Lyophilized pea sprouts were the most effective, with a mean activity of 0.40 ( $\pm 0.01$ ) mU/mg, compared to 0.23 ( $\pm 0.01$ ) mU/mg for porcine kidney protein extracts. The enzymatic activity of the DAO supplements ranged widely from 0.04 to 0.20 mU/mg, despite all being formulated with the same amount of porcine kidney extract (4.2 mg).

### Conclusions

The proposed method allowed the *in vitro* determination of DAO activity in food matrices using histamine as the reaction substrate. Due to the growing awareness of histamine intolerance, it is important to have effective methods for validating the DAO activity of supplements and foods of potential interest for the treatment of this disorder.

#### References

- Schweiberg HG & Bodner E. *Biochim Biophys Acta*. 1997.
- Calinescu C et al. *Anal Bioanal Chem*. 2010.
- Kovacova-Hanuszkova E et al. *Allergol Immunopathol*. 2015.
- Maintz L & Novak N. *Am J Clin Nutr*. 2007.
- Jumaine C et al. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017.
- Biemer L et al. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016.
- Latorre-Moratalla et al. *J Chromatograph A*. 2009.





# IN VITRO DAO ACTIVITY OF PORCINE KIDNEY EXTRACTS AND DAO SUPPLEMENTS



Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Garza-Guajardo, R.I., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Spain); Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA UB), Universitat de Barcelona (UB); Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA); [mcosta@ub.edu](mailto:mcosta@ub.edu)

## BACKGROUND

Porcine kidney protein extracts have been widely described as a source of the enzyme diamine oxidase (DAO)<sup>1</sup>. DAO supplements based on this extract are available on the market to reduce the symptomatology associated with histamine intolerance, a disorder in the homeostasis of histamine due to a reduced intestinal degradation of this amine, mainly caused by a deficiency of DAO<sup>2</sup> (Fig. 1). The intake of gastroresistant capsules or tablets containing DAO enzyme could potentially enhance the degradation of dietary histamine in the intestine thus being a complementary preventive treatment for histamine intolerance. However, there is still few evidence, both *in vitro* or clinical, to demonstrate the efficacy of exogenous DAO supplementation.



Figure 1. Main facts about DAO supplements available on the market.

## OBJECTIVE

The aim of this work was to evaluate the *in vitro* DAO activity of porcine kidney protein extracts and the influence of different extraction conditions on this enzymatic activity. Moreover, the enzymatic activity of dietary supplements available on the market based on DAO enzyme of porcine origin was also studied.

## MATERIAL AND METHODS

*In vitro* DAO activity measurement involves an enzymatic assay where the enzyme is in contact with histamine, its substrate; and the subsequent analysis of degraded histamine by UHPLC-FL (Fig. 2). DAO activity is expressed in mU/mg (nmols of degraded histamine per minute/mg of kidney extract). DAO activity was determined in samples of porcine kidney extracts from 12 different production batches provided by a biotechnology company specialised in the extraction of biomolecules from animal tissues. The influence of different thermic conditions (temperature and time) and the effect of various treatments against biological hazards were also studied. Moreover, different batches of 4 DAO supplements from the market were also evaluated. All samples were analysed per duplicate.

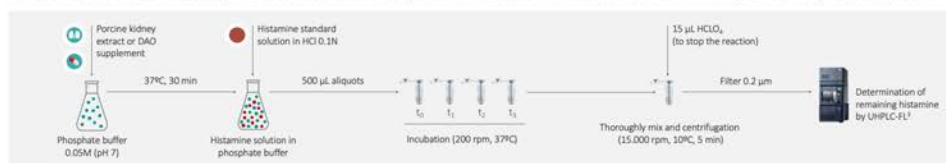


Figure 2. Schematic experimental procedure for the *in vitro* determination of DAO activity.

## RESULTS

### ● Variability of DAO activity among production batches

Very low variability was found on DAO activity of 12 different batches of porcine kidney protein extract, with a mean enzymatic activity of  $0.23 \pm 0.01$  mU/mg.



### ● Influence of treatment conditions on DAO activity

A reduction of the enzymatic activity was observed when the extraction conditions exceeded the standard temperature of 40°C (Fig. 3.A). However, no differences were detected when comparing different treatment length for a given temperature. When considering different strategies against biological hazards, the addition of hypochlorite (1000 ppm) or thymol (0.2%) and the application of irradiations below 15 KGy practically did not affect the enzymatic activity of the extract (Fig. 3.B).

### ● Enzymatic activity of DAO supplements from the market

Great variability was found in the *in vitro* DAO activity among the dietary supplements available on the market, ranging from 0.04 to 0.12 mU/mg (Fig. 4). However, the enzymatic activity obtained for each DAO supplement remained constant within different production batches of the same commercial product. It is worth highlight that all studied DAO supplements are formulated with 4.2 mg of porcine kidney protein extract per capsule.



Figure 4. DAO activity of four different dietary supplements available on the market (1-4).

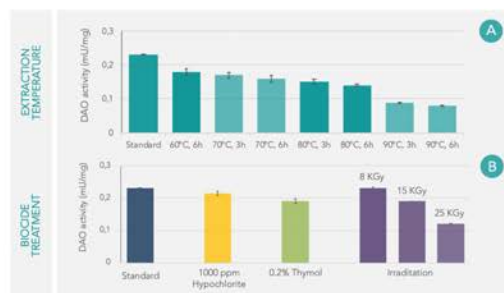


Figure 3. Influence of extraction temperature (A) and different treatments against biological hazards (B) on DAO activity of porcine kidney protein extracts.

## CONCLUSIONS

- The ability of porcine kidney protein extracts and DAO supplements to reduce histamine has been confirmed *in vitro*. Significant differences were observed in the enzymatic activity among commercial DAO supplements currently available on the market. In light of these results, clinical studies are needed to assess the potential usefulness of DAO exogenous supplementation to reduce the symptomatology of histamine intolerance.
- The application of measures to reduce biological hazards, such as the addition of hypochlorite or thymol and the application of irradiations, did not affect the enzymatic activity of the porcine kidney protein extracts.

### References

<sup>1</sup>Kovacova-Hanusikova et al., (2013) Allergol Immunopathol. 43:498-506; <sup>2</sup>Comas-Basté et al., (2017) J Pharm Biomed Anal. 145:379-385; <sup>3</sup>Latorre-Moratalla et al., (2009) J Chromatograph A. 1216: 7715-20.

### Acknowledgements

This work was supported by Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2017 SGR-1376). Oriol Comas-Basté is a recipient of a doctoral fellowship from the University of Barcelona (APF 2015).







# BROTOS DE LEGUMBRES COMO POTENCIAL FUENTE VEGETAL DE ENZIMA DAO

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C.

Departament de Nutrició, Ciències de l’Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l’Alimentació, Universitat de Barcelona (UB); Au. Prat de la Ribera 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet (Spain); Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB); Universitat de Barcelona (UB); Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XaRTA); [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu)



## INTRODUCCIÓN

El uso de enzima diamino oxidasa (DAO) exógena se ha postulado recientemente como una posible estrategia para el tratamiento de la intolerancia a la histamina, un trastorno en la homeostasis de esta amina causado por una reducción de su degradación intestinal<sup>1</sup>. Actualmente, hay en el mercado complementos alimenticios con extracto de proteína de riñón porcino para ayudar a la degradación de histamina a nivel intestinal (Figura 1)<sup>2</sup>. Algunos estudios señalan el potencial de los brotes de ciertas legumbres como fuente de enzima DAO<sup>3,4</sup>. Si se confirma, las legumbres podrían convertirse en una alternativa ventajosa desde una perspectiva productiva y permitiría, además, ampliar el target de este producto.

## OBJETIVO

Estudiar la capacidad de los brotes de diferentes legumbres para reducir la histamina *in vitro* y compararla con la de los extractos de riñón porcino utilizados actualmente como fuente exógena de enzima DAO.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras

- Brotes frescos e liofilizados de lentejas (*Lens culinaris*) (castellana, beluga y castellana ecológica), garbanzos (*Cicer arietinum*), judías (*Phaseolus vulgaris*) (blancas, negras, carilla, moradas and DOP Ganxet), habas (*Vicia faba*), guisantes (*Pisum sativum*) y mungos (*Vigna radiata*).
- Extracto proteico de riñón de cerdo proporcionado por una empresa biotecnológica especializada en la extracción de biomoléculas de tejidos animales.

### Metodología (Figura 2)

- Germinación de las legumbres en oscuridad
- Homogenización y liofilización de los brotes
- Determinación de la actividad DAO\* *in vitro* a través de un ensayo enzimático seguido por el análisis de la histamina remanente mediante UHPLC-FL<sup>5</sup>.

## RESULTADOS

### Capacidad de los brotes de legumbres para degradar histamina *in vitro*

Los brotes frescos de garbanzos, guisantes, lentejas castellanas, lentejas castellanas ecológicas, lentejas beluga, judías carilla y habas mostraron capacidad para degradar histamina *in vitro*, con valores máximos de alrededor de 0.04 µU/mg en el caso de garbanzos y guisantes germinados. Esta actividad enzimática no se observó en los brotes del resto de legumbres analizadas.

La aplicación de un proceso de liofilización de los brotes permitió obtener un producto concentrado, homogéneo y manejable a la vez que no afectó su actividad DAO (Figura 3). Concretamente, los brotes liofilizados de garbanzos, guisantes y lentejas castellanas mostraron la máxima capacidad DAO, con actividades enzimáticas de 0.39-0.41 µU/mg.

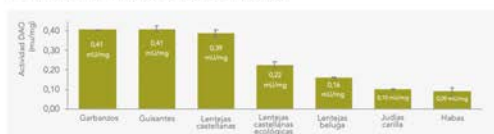


Figura 3. Actividad DAO de los brotes de legumbres germinados en oscuridad y liofilizados.

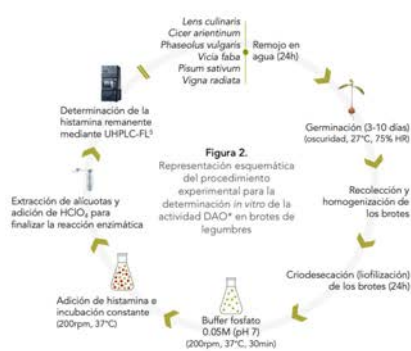
## CONCLUSIONES

- Los brotes de algunas legumbres reducen la histamina *in vitro*, por lo que tienen interés como potencial fuente vegetal de la enzima DAO. En algunos casos, esta actividad enzimática es casi el doble a la de los extractos de riñón porcino utilizados actualmente como fuente exógena de enzima DAO.
- En la actualidad, se está trabajando para establecer la estabilidad de este producto vegetal para, una vez comprobada, plantear su utilización para formular complementos alimenticios, ya sea directamente a través del producto liofilizado o tras la extracción de la enzima a partir de esta matriz vegetal.

### Referencias

- <sup>1</sup>Comas-Basté O et al. J Pharm Biomed Anal. 2017;145:379-385.  
<sup>2</sup>Kovacova-Hanusikova E et al. Allerg Immunopathol. 2015;43:498-506.  
<sup>3</sup>Kivaid N & Riniken T. Proc Estonian Acad Sci Chem. 2007;56:164-171.  
<sup>4</sup>Ebrahimehnejad H et al. J Food Process Technol. 2013;4:242.  
<sup>5</sup>Latorre-Moratalla ML et al. J Chromatograph A. 2009;1216:7715-7720.

Figura 1. Principales datos de los suplementos de enzima DAO disponibles en el mercado.



\*La actividad DAO específica se expresa en µU/mg (pmol de histamina degradada por minuto/mg de extracto).

### Comparación de la actividad DAO de los brotes de legumbres y el extracto de riñón porcino



La actividad DAO de diferentes lotes de extracto proteico de riñón de cerdo, analizada mediante la metodología detallada anteriormente, mostró una muy baja variabilidad, con un valor medio de actividad enzimática de 0.23 ± 0.01 µU/mg.



La actividad DAO obtenida en los brotes liofilizados de garbanzos, guisantes y lentejas castellanas fue prácticamente el doble que la del extracto de riñón de cerdo, mostrando también una muy baja variabilidad (0.40 ± 0.01 µU/mg).

Los brotes de lentejas castellanas ecológicas, lentejas beluga, judías carilla y habas mostraron una capacidad de degradar histamina *in vitro* igual o inferior a la del producto de origen animal.







## HISTAMINE-DEGRADING CAPACITY OF LYOPHILISED LEGUME SPROUTS

O. Comas-Basté; J. Rabell-González; F. Pederzani; S. Sánchez-Pérez; N.C. Muñoz-Esparza; M.L. Latorre-Moratalla; M.T. Veciana-Nogués; & M.C. Vidal-Carou

Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB). Av. Prat de la Riba 171, 08021 Santa Coloma de Gramenet (Spain); Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB); Xarxa de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (XARTA); [osocia@ub.edu](mailto:osocia@ub.edu)

### Introduction

Diamine oxidase (DAO), originally called histaminase, is the enzyme that performs the oxidative deamination of histamine<sup>1</sup>. In humans, intestinal DAO acts as a protective barrier towards exogenous histamine, specially from food<sup>2</sup>. A deficiency of DAO may lead to excess the normal plasmatic levels of histamine and the subsequent appearance of the symptomatology of histamine intolerance<sup>3</sup>. Certain legume sprouts have been described as a source of DAO, and thus could be a suitable component for the formulation of DAO supplements as a complementary treatment strategy for histamine intolerance<sup>4</sup>.

### Objectives

To perform a screening of the *in vitro* histamine-degrading capacity of commercial legumes and to study the stability of the enzymatic activity of the lyophilised product at different storage conditions.

### Methods

#### Samples:

Lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum*), beans (*Phaseolus vulgaris*), broad beans (*Vicia faba*), peas (*Pisum sativum*), soy (*Glycine max*), alfalfa (*Medicago sativa*), grass pea (*Lathyrus sativus*), white lupin (*Lupinus albus*) and mung beans (*Vigna radiata*).

#### Methodology:

Lyophilised legume sprouts of the above-mentioned 10 different species were obtained in our laboratory. *In vitro* DAO activity was measured through an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL analysis of remaining histamine (Figure 1). The stability of the DAO activity of the lyophilised product was assessed at three different storage conditions during 6 months: freezing (-20°C), refrigeration (2°C) and room temperature (±20°C).

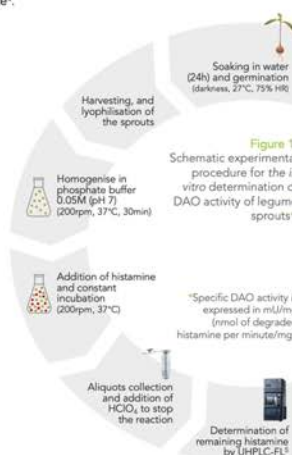


Figure 1. Schematic experimental procedure for the *in vitro* determination of DAO activity of legume sprouts<sup>5</sup>.

### Results

#### Screening of histamine-degrading capacity:

Except for beans and mung beans, all analysed legume sprouts showed *in vitro* histamine-degrading capacity (Figure 2). Concretely, lyophilized pea and grass pea sprouts showed the greatest enzymatic capacity, with a mean DAO activity of 0.40 mU/mg.

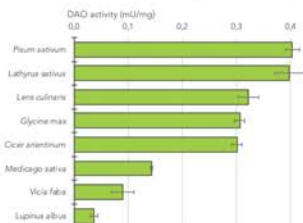


Figure 2. *In vitro* DAO activity of lyophilised legume sprouts germinated during 6 days in darkness.

#### Stability of the enzymatic activity:

Freezing storage of the lyophilized lentil sprouts kept the enzymatic activity intact for at least 6 months (Figure 3). On the contrary, the storage in refrigerator or at room temperature supposed a marked decrease in the enzymatic capacity of the product, with a mean loss of 47% (±0.02%) and 57% (±0.03%) of the initial DAO activity, respectively.

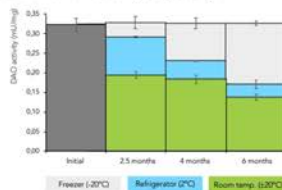


Figure 3. Evolution of the *in vitro* DAO activity of lyophilised lentil sprouts over 6 months of storage.

### Conclusions

Lyophilised sprouts of certain legumes have been demonstrated to be a plant-origin source of DAO enzyme. This matrix could be a suitable component for the formulation of DAO supplements to enhance histamine degradation at intestinal level. Further studies are needed to select the optimal formulation of the final product to guarantee the stability of its enzymatic capacity.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

References: <sup>1</sup>Schweiberger HG et al. *J Neural Transm*. 2013; <sup>2</sup>Kovacovic-Hanukovic E et al. *Allergol Immunopathol*. 2015; <sup>3</sup>Comas-Basté O et al. *J Pharm Biomed Anal*. 2017; <sup>4</sup>Jumarié C et al. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017; <sup>5</sup>Latorre-Moratalla ML et al. *J Chromatograph A*. 2009.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Campus  
de l'Alimentació